

**Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet**

**Nastavno-naučno veće**

**Predmet:** Izveštaj Komisije za pregled i ocenu doktorske disertacije Marice Grujić, diplomirani biohemičar

Na redovnoj sednici Nastavno-naučnog veća Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, održanoj 12.11.2015. godine, određeni smo za članove Komisije za pregled i ocenu doktorske disertacije Marice Grujić, prijavljene pod naslovom: „**Celulaze gljive *Trichoderma harzianum*: produkcija, kontrola produkcije i karakterizacija eksprimiranih enzima**“

Pošto smo podnetu disertaciju pregledali, podnosimo sledeći

### **IZVEŠTAJ**

#### **A. Prikaz sadržaja disertacije**

Doktorska disertacija Marice Grujić pod navedenim naslovom napisana je na 145 strana A4 formata (prored 1,5), sadrži 48 slika, 25 tabela. Rad obuhvata sledeća poglavlja: Uvod, Opšti deo, Naše radove, Zaključke, Eksperimentalni deo, Literaturu i Priloge. Pored navedenog, teza sadrži izvod na srpskom i engleskom jeziku, sadržaj, zahvalnicu na srpskom i engleskom jeziku i biografiju kandidata sa bibliografijom.

U **Uvodu** je dat kraći osvrt na oblast istraživanja i aktuelnost teme rada. Kao cilj istraživanja ove doktorske disertacije navedena su ispitivanja mogućnosti primene gljive *Trichoderma harzianum* za produkciju enzima celulaznog kompleksa, optimizacija uslova za produkciju upotrebom otpadnih lignoceluloznih materijala kao supstrata, ispitivanje mehanizma kontrole produkcije i karakterizaciju produkovanih celulaznih enzima. Planirano je sakupljanje, izolovanje, selakcija i identifikacija potencijalnih celulolitički aktivnih gljiva *Trichoderma* širom Srbije. U cilju selekcije najboljih hiper-produkujućih endocelulaznih izolata planirano je razvijanje novog, brzog, jednostavnog i pouzdanog testa. Na osnovu dobijenih rezultata, u cilju postizanja maksimalne produkcije celulaznog kompleksa enzima, planirana je optimizacija uslova u tačnoj fermentaciji gajenjem selektovanog hiper-produkujućeg endocelulaznog izolata *Trichoderma guizhouensis*, upotrebom slame kao supstrata. Planirano je razvijanje zimograma za simultanu detekciju celulaznog kompleksa enzima u cilju njihove karakterizacije. Upotrebom metoda klasične mutageneze planirano je poboljšanje produkcije celulaznog enzimskog koktela. Planirana je analiza ekspresije gena

*xyl1* i *lae1*, na nivou transkripcije, koji kodiraju za transkripcione aktivatore celulaznog kompleksa enzima, u cilju analiziranja kontrole produkcije.

U **Opštem delu** kandidat opisuje upotrebu filamentoznih gljiva iz roda *Trichoderma* za produkciju industrijski važnih enzima, kao i opšte pojmove o gljivi *Trichoderma harzianum*, načinima njihove identifikacije i navodi primere testova za selekciju celulolitički aktivnih gljiva. Kandidat je detaljno opisao enzime celulaznog kompleksa. Metode za određivanje nivoa pojedinačnih enzima su opisane detaljno, a podeljene su na metode kojima se određuju i karakterišu proteini (analitičke i zimogramske metode) i metode kojima se prati ekspresija gena za kontrolu produkcije celulaznih enzima kojima je posvećena posebna pažnja uz detaljan prikaz pojedinačnih faktora koji utiču na produkciju enzima celulaznog kompleksa. U ovom poglavlju je izdvojena i opisana posebno i ekspresija gena odgovornih za regulaciju produkcije. Dalje su opisani prirodni lignocelulozni materijali kao inducibilni supstrati za produkciju enzima celulaznog kompleksa, glavnim osvrtom na slamu. Ukratko su opisane metode klasične mutageneze koje se koriste za poboljšanje sojeva u produkciji celulaznog enzimskog kompleksa i regulaciju genske ekspresije celulaznih enzima.

Poglavlje **Naši radovi** se sastoji od devet celina u okviru kojih kandidat predstavlja rezultate svojih istraživanja. U prve četiri celine kandidat opisuje načine izolovanja gljiva roda *Trichoderma* iz prirode; postupak razvijanja, kao i upotrebu novog brzog testa za selekciju endocelulaznih hiper-produkujućih *Trichoderma* izolata; identifikaciju odabranih potencijalnih celulaznih producera na molekularnom nivou.

Peti deo Naših radova obuhvata optimizaciju uslova za produkciju enzima celulaznog kompleksa upotrebom soja *T. guizhouensis*. Opisani su uslovi produkcije enzima u uslovima tečne fermentacije upotrebom slame kao inducibilnog supstrata za produkciju celulaznog kompleksa enzima. Ispitana je produkcija enzima pri različitim uslovima količine suptrata, brzina mešanja, inokulacije i različitih izvora azota. U uspešno optimizovanim uslovima fermentacije ispitana je kvantitativno produkcija celulaznog kompleksa enzima tokom vremena. Šesti deo Naših radova obuhvata detaljan opis razvijanja zimograma za istovremenu detekciju pojedinačnih enzima celulaznog kompleksa. U procesu optimizacije, svi enzimi celulaznog kompleksa su detaljno karakterisani upotrebom analitičkih metoda i novorazvijenom zimogramskom tehnikom. U sedmom delu Naših radova su prikazani rezultati istraživanja mogućnosti upotrebe iskorišćenog komposta za gajenje šampinjona kao inducibilnog supstrata za produkciju enzima celulaznog kompleksa u uslovima fermentacije na čvrstoj podlozi. Analizirana je struktura slame pre i nakon gajenja kao i nivo produkcije

celulaznih enzima nakon gajenja nekoliko potentnih sojeva gljiva iz roda *Trichoderma*. Naglašen je i dodatni značaj ovih istraživanja u smanjenju voluminoznosti ovog otpadnog materijala, što predstavlja doprinos za smanjenje zagađenja životne sredine.

U osmom delu Naših radova kandidat prikazuje rezultate poboljšanja izolata *T. guizhouensis* upotrebom metoda klasične mutageneze u cilju povećanja produkcije celulaznih enzima. Opisani su postupci fizičke i hemijske mutacije i selekcija mutanata upotrebom testa koji je razvijen tokom izrade ove teze. Selektovani mutanti su gajeni u optimizovanim uslovima tečne fermentacije upotrebom slame kao supstrata pri čemu je analiziran nivo produkcije celulaznih enzima.

Deveti deo naših radova obuhvata analizu regulacije genske ekspresije enzima celulaznog kompleksa. Prikazani su rezultati nivoa produkovanih gena *xyl1* i *lae1* koji kodiraju za istoimene transkripcione aktivatore celulaznih enzima. Detaljno je opisana i prikazana korelacija između ekspresije ispitivanih gena za transkripcione aktivatore sa produkcijom enzima celulaznog kompleksa u uslovima tečne fermentacije na mikrokristalnoj celulozi. Takođe, prikan je i odnos ekspresije *cbh1* gena sa produkcijom egzocelulaza.

U poglavlju Zaključak sumirani su i prokomentarisani rezultati dobijeni u okviru doktorske disertacije.

U okviru poglavlja **Eksperimentalni deo** kandidatkinja je dala detaljan opis reagenasa i eksperimentalnih procedura korišćenih u ovoj doktorskoj disertaciji. Poglavlja iz eksperimentalnog dela prate poglavlja data u našim radovima.

U **Prilogu** su date sekvencije korišćene za identifikaciju *Trichoderma* izolata, sekvencije prajmera korišćene u radu i eksperimentalne procedure za korišćenje kitove dobijene od proizvođača.

## **B. Kratak opis postignutih rezultata**

Izolovano je i ispitano 100 sojeva *Trichoderma* spp. iz prirode širom Srbije. Upotrebom novog testa za selekciju analizirano je i dobijeno 16 potencijalno dobrih producera endocelulaza, dok je izolat UB483FTH2 selektovan kao najbolji hiper-produkujući endocelulazni proizvođač. Obećavajući izolati su identifikovani do nivoa vrste na molekularnom nivou upotrebom dva tipa filogenetskih markera, ITS1/4 i *tef1*. Soj UB483FTH2 je identifikovan kao *T. guizhouense*.

Optimizovani su uslovi za maksimalnu produkciju celulaznog kompleksa enzima, gajenjem izolata UB483FTH2, upotrebom sirove, netretirane slame kao supstrata u uslovima

tečne fermentacije. Rezultati su pokazali da se najbolja produkcija celulaznog enzimskog kompleksa dobija u uslovima gajenja na 1,5 g slame pri 150 rpm, na temperaturi od 28°C. Makismalna produkcija endocelulaze je detektovana u trećem danu fermentacije, egzocelulaze nakon petog dana, dok je maksimum  $\beta$ -glukozidazne produkcije postignut nakon sedmog dana fermentacije.

Razvijen je zimogramski test za detekciju sva tri enzima celulaznog kompleksa nakon jednog elektroforetskog razdvajanja. Razvijeni sumultani zimogram za celulaze omogućava detekciju svih tipova celulaza, njihov odnos, kao i razliku između specifičnih tipova čime ih dovodi u direktnu vezu sa ekspresijom celulaza, što obezbeđuje široku upotrebu ovakve zimogramske detekcije u svim vrstama istraživanja na temu produkcije celulaza.

Celulazni izoenzimski profili su analizirani upotrebom novorazvijene zimogramske tehnike. Rezutati pokazuju da se izoenzimski profili menjaju tokom produkcione fermentacije. U prvih 7 dana se uočavaju glavne izoforme i izoforme manjeg intenziteta kod sve tri vrste celulaznih enzima. Nakon toga intenzitet glavnih izoformi se smanjuje, dok se istovremeno pojavljuju nove izoforme koje dominiraju sve do 14 dana. Rezultati dobijeni upotrebom iskorišćenog supstrata za gajenje pečuraka (otpadni materijal) kao inducibilnog celulaznog supstrata, upotrebom 6 sojeva *Trichoderma*, pokazuju da se ovaj supstrat može koristiti za produkciju celulaznih enzima uz istovremeno smanjenje voluminoznosti istog za 30%, čime se smanjuje zagađenje životne sredine. U procesu poboljšanja izolata UB483TH2 metodama klasične mutageneze izolovano je 24 celulilitčki pozitivnih mutanata, od kojih je ukupno pet mutanata selektovano kao dobri hiper-produkujući endocelulazni produceri. Gajenjem mutanata u optimizovanim uslovima fermentacije upotrebom slame kao supstrata dobijeni su rezultati koji pokazuju da se upotrebom metoda klasične mutageneze može povećati produktivnost pojedinačnih celulolitčkih enzima.

Rezultati dobijeni praćenjem ekspresionog profila transkripcionih faktora *xyr1* i *lae1* gena pokazuju pozitivnu korelaciju sa celulaznom aktivnošću i sekretovanim proteinima. Maksimalan nivo iRNA gena za transkripcione faktore je u 24 h (*xyr1*) i 48 h (*lae1*), dok se maksimum produkcije celulaza postiže u 96 h. Takođe, postavljena je pretpostavka da postoji korelacija i između ekspresije ispitivanih gena, odnosno da ekspresija *xyr1* gena ima pozitivan uticaj na ekspresiju *lae1* gena. Nivo produkcije egzocelulaze je praćen i na nivou iRNA i na nivou enzimske aktivnosti čiji se maksimumi poklapaju u 48 času. Ispraćena ekspresija *cbh1* gena pokazuje da ekspresija *xyr1* gena ima dominantan uticaj na ekspresiju celulaznih gena.

### C. Usporedna analiza rezultata kandidata sa rezultatima iz literature

Celulazni kompleks enzima predstavlja jedan od glavnih predmeta istraživanja u nauci s obzirom na to da se ovi enzimi mogu primeniti u procesu dobijanja biogoriva poreklom od lignocelulazne biomase. Kao izvor dobijanja celulaznih enzima, centar interesovanja predstavljaju filamentozne gljive iz roda *Trichoderma* zbog sposobnosti da proizvode velike količine ekstracelularnih enzima. Početni koraci u biotehnološkim procesima predstavljaju pronalaženje potencijalnog celulozitičkog producera među izolatima gljiva. U literaturi je opisan veliki broj testova za skrining i selekciju izolata vrsta *Trichoderma*. Međutim, ovi testovi zahtevaju ili skupe supstrate, ili toksične boje i uglavnom su vremenski zahtevni. Zato je za potrebe izrade ove disertacije bilo neophodno razviti test koji će u najkraćem mogućem periodu (u realnom vremenu) dati reproduktivne i tačne rezultate, uz ekonomski benefit. Razvijen je novi i isplativ test za brzu selekciju hiper-celulozitički produkujućih izolata *Trichoderma*.

Literaturni podaci ukazuju na veliki značaj u identifikaciji vrsta koje se upotrebljavaju u biotehnološkim procesima. *T. reesei* predstavlja najpoznatiji i najviše primenljivi soj u industriji za proizvodnju celulaza i hemicelulaza. Danas se sve više potencira pronalaženje novih *Trichoderma* vrsta koji poseduju efikasniji set celulaznih enzima. Veliko interesovanje je usmereno na izolatima *Trichoderma harzianum* koje su do sada veoma retko korišćenje u biotehnoškim procesima, a koje su pokazale veliki potencijal. U ovoj doktorskoj disertaciji selektovani endocelulazni hiper-produkujući izolati su identifikovani na molekulskom nivou. Najbolji izolat među njima identifikovan kao *Trichoderma guizhouensis* iz grupe kompleksa vrste je *Trichoderma harzianum* i korišćen je u svim ostalim eksperimentima.

S obzirom na to da su celulazni enzimi inducibilni enzimi i da poseduju veliku kompleksnost i sinergističko dejstvo, optimizacija uslova za njihovu produkciju predstavlja ključni korak u biotehnologiji. Pored optimizacije, izbor supstrata je od ključnog značaja. Značajan broj literaturnih podataka ukazuje na mogućnost iskorišćenja lignocelulozne biomasa kao jednog od najpogodnijih supstrata za produkciju celulaza. Ovo za cilj, sa jedne strane, ima smanjenje zagađenja u životnoj sredini, dok sa druge strane ima primenu u dobijanju enzima neophodnih za produkciju bioetanolu. Slama, koja se karakteriše kao jedan od najvećih poljoprivrednih otpada i svojom kompleksnom strukturom, predstavlja veliki izazov u naučnim i biotehnološkim istraživanjima. Nepristupačnost celuloze u slami, inducira celulaza, povećava industrijske troškove produkcije enzima jer zahteva brojne pretemani. U cilju rešenja ovog problema sve više se pribegava pronalaženju izolata i

optimizaciji uslova gajenja upotrebom sirove, netretirane, slame kao supstrata. U okviru ove doktorske disertacije optimizovani su uslovi za produkciju celulaznih enzima gajenjem izolata *T. guizhouensis* upotrebom sirove, netretirane slame kao supstrata, dok su dobijeni rezultati u skladu sa literaturnim podacima. Takođe, ispitan je uticaj upotrebe iskorišćenog komposta nakon gajenja šampinjona kao inducibilnog supstrata za produkciju celulaznog kompleksa enzima. Dobijeni rezultati su novi u literaturi i pokazuju da se dati supstrat može koristiti kao dobar inducer celulaznog koktela enzima uz njegovo istovremeno uklanjanje. U literaturi su veoma aktuelna istraživanja na temu uklanjanja iskorišćenog komposta za gajenje pečuraka i u tom smislu rezultati ove teze su prepoznati kao značajni i objavljeni su u vodećem međunarodnom časopisu.

Zbog velike kompleksnosti celulaznog kompleksa enzima velika pažnja je usmerena na karakterizaciju i detekciju pojedinačnih enzima u kompleksu, kao i na mehanizam njihovog dejstva. U literaturnim podacima mogu se naći brojne spektrofotometrijske i zimografske tehnike za njihovu analizu, ali veoma je teško napraviti razliku između njih, uzimajući u obzir sinergiju i kompeticiju njihovog dejstva. U okviru ove doktorske disertacije razvijena je brza i pouzdana zimografska tehnika za istovremenu detekciju sva tri enzima iz celulaznog kompleksa. Ovi rezultati su prepoznati kao naučno značajni i objavljeni su u vrhunskom međunarodnom časopisu visoko rangiranom u oblasti analitičke biohemije.

U cilju povećanja produkcije enzima, manipulacija izolatima na nivou DNA molekula godinama predstavlja metodu izbora u nauci i industriji. Klasične metode mutacije izolata dovele su do poboljšanja izolata u produkciji i brzini rasta. U ovoj doktorskoj disertaciji takođe su korišćene tehnike klasične mutageneze koje su doprinele do povećanja produkcije celulaznih enzima u izolovanim i ispitivanim mutantima. Nemogućnost kontrole mutacija na nivou DNA kao i razumevanje procesa indukcije i sinteze ovih enzima danas se uveliko rešava metodama molekularne-genetike. S obzirom da se najveća kontrola njihove produkcije dešava na nivou transkripcije, pažnja je usmerena na pronalaženju, karakterizaciji i uticaju transkripcionih faktora na njihovu produkciju. U okviru ove doktorske disertacije analizirana je korelacija između ekspresije gena transkripcionih aktivatora celulaza *xyr1* i *lae1*, i produkcije celulaznih enzima, kao i korelacija između ekspresije ispitivanih transkripcionih aktivatora. Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima što ovaj izolat čini pogodnim sistemom za dalje usavršavanje, analiziranje procesa produkcije celulaznih enzima i premenu u biotehnoškim procesima.

#### **D. Objavljeni i saopšteni radovi koji čine deo disertacije**

## 1. Radovi saopšteni u međunarodnim časopisima:

M21:

1. Dojnov B, Grujić M, Vujčić Z, Reliable simultaneous zymographic method of characterization of cellulolytic enzymes from fungal cellulase complex, *Electrophoresis* 2015, 36, 1724–1727

M22:

1. Grujić M, Dojnov B, Potočnik I, Duduk B, Vujčić Z, Spent mushroom compost as substrate for the production of industrially important hydrolytic enzymes by fungi *Trichoderma* spp. and *Aspergillus niger* in solid state fermentation, *International Biodeterioration & Biodegradation* 104 (2015) 290-298

## 2. Radovi saopšteni na skupu međunarodnog značaja štampani u izvodu (M 64)

1. M. Grujić, B. Dojnov, Z. Vujčić: Fungal xylanase production using agricultural waste, *Belgrade Food International Conference, Food, health and well being, Belgrade 2012*.
2. M. Grujić, B. Dojnov, Z. Vujčić: Iskorišćeni kompost šampinjona kao supstrat za produkciju industrijski značajnih enzima gljiva *Trichoderma sp.* i *Aspergillus niger* ATCC 10864, IX kongres mikrobiologa Srbije - „Mikromed 2013”, Beograd, 2013.

### E. Zaključak

Na osnovu svega izloženog može se zaključiti da je u podnetoj disertaciji pod naslovom „Celulaze gljive *Trichoderma harzianum*: produkcija, kontrola produkcije i karakterizacija eksprimiranih enzima“ kandidat, Marica Grujić, uspešno odgovorila na sve postavljene zadatke koji se tiču produkcije, kontrole produkcije i karakterizacije eksprimiranih celulaznih enzima. Rezultati istraživanja proistekli iz ove doktorske disertacije objavljeni su u okviru tri rada od kojih je jedan štampan u vrhunskom međunarodnom časopisu (kategorije M-21), jedan štampan u istaknutom međunarodnom časopisu (M-22) i saopšteni na dva skupa međunarodnog značaja. Deo rezultata je trenutno u fazi publikacije u vrhunskom međunarodnom časopisu. Komisija smatra da rezultati objavljeni u okviru ove doktorske disertacije predstavljaju značajan naučni doprinos u produkciji, kontroli produkcije i karakterizaciji celulaznih enzima poreklom iz gljiva *Trichoderma harzianum*, kao i naučnu i industrijsku primenu razvijenih testova i metoda za analizu celulaznih producera i enzima. Istovremeno Komisija smatra da se ova disertacija uklapa u savremene trendove biohemije i biotehnologije dajući značajan doprinos teoriji i praksi produkcije i karakterizaciji celulaznih enzima u cilju proizvodnje bioetanola.

Na osnovu svega izloženog Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, da podnetu doktorsku disertaciju Marice Grujić prihvati i odobri njenu odbranu.

**Beograd,**

**Komisija**

**10.10.2016**

---

dr Zoran Vujčić, redovni profesor  
Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu,

---

dr Biljana Dojnov, naučni saradnik  
Centra za hemiju IHTM-a,  
Univerziteta u Beogradu

---

dr Vladimir Beškoski, docent  
Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

---

dr Bojan Duduk, naučni savetnik  
Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine, Zemun u  
Beogradu