

НАСТАВНО – НАУЧНОМ ВЕЋУ

ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА

УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

ПРЕДМЕТ: Извештај Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације Карле Илић Ђурђић, мастер биохемичара

На редовној седници Наставно – научног већа Хемијског факултета Универзитета у Београду, одржаној 10.09.2020. године, одређени смо за чланове Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације кандидаткиње Карле Илић Ђурђић, мастер биохемичара, асистента Хемијског факултета, Универзитета у Београду под називом:

„Протеински инжењеринг лигнинолитичких пероксидаза у циљу унапређења деградације текстилних боја“

Веће научних области природних наука Универзитета у Београду је на седници одржаној дана 27.06.2019. године на захтев Хемијског факултета, број: 493/5 од 17.06.2019. године, дало сагласност на предлог теме докторске дисертације под бројем 61206-2676/2-19.

Комисија је докторску дисертацију прегледала и Наставно – научног већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација Карле Илић Ђурђић написана је на 289 страна, А4 формата, фонт 12, проред 1,5 и садржи 61 слику и 49 табела. Докторска дисертација је подељена на 6 поглавља: Увод (3 стране), Теоријски део (36 страна), Материјал и методе (36 страна), Резултати и дискусија (68 страна), Закључци (4 стране), Литература (11 страна, 218 цитата). Поред наведеног дисертација садржи и Насловне стране на српском и енглеском језику, две стране са именима чланова комисије, Захвалницу (2 стране), Сажетак на српском и енглеском језику (по 3 стране), Листу скраћеница (2 стране), Садржај (3 стране), Биографију кандидата (2 стране), Изјаву о ауторству (1 страна), Изјаву о истоветности (1 страна), и Изјаву о коришћењу (2 стране).

Увод садржи предмет истраживања ове докторске дисертације као и њене циљеве, уз осврт на актуелна истраживања која су од значаја за ову докторску дисертацију. Описани су проблеми примене текстилних боја и њиховог уклањања из животне средине. Описана је примена лигнинолитичких пероксидаза у биокатализи са освртом на лигнин и версатилну пероксидазу и разлике у њиховој специфичности. Такође, описани су проблеми примене ензима у процесима биоремедијације као и могућа решења која су служила као смернице у изради докторске дисертације.

Теоријски део је подељен на шест целина. У целини *Текстилне боје*, говори се о употреби синтетских боја у текстилној индустрији, њиховој токсичности и проблемима приликом њиховог уклањања из животне средине. У другој целини, *Микробиолошка деградација лигнина*, говори се о структури лигниноцелулозне биомасе, организмима способним за њену деградацију и ензимима који учествују у овом процесу. Трећа целина, *Лигнинолитичке пероксидазе*, описује структуру, каталитичке особине, супстратну специфичност и могућности и проблеме који се јављају приликом примене ових ензима. У четвртој целини, *Протеински инжењеринг*, описана је примена протеинског инжењеринга у циљу унапређења индустријски значајних карактеристика ензима као биокатализатора као и различити приступи у овом методу. Пета целина, *Диригована еволуција*, описује могућности примене овог метода у циљу унапређења стабилности и каталитичке ефикасности ензима, као и процесе припреме и претраге насумичних библиотека гена уз примену одговарајућег селекционог притиска, док шеста целина, *Експресија протеина на*

површини ћелија квасца, описује начин експресије ензима на површини ћелија квасца и предности примене овог експресионог система са освртом на одржавање везе генотипа и фенотипа и могућност вишеструке примене ензима имобилизованих на описан начин.

Циљеви истраживања дају кратак преглед истраживања приказаних у овој докторској дисертацији.

Материјал и методе садрже детаљан опис опреме, реагенаса и узорака као и експерименталних метода и процедура коришћених у овој докторској дисертацији.

Резултати и дискусија приказују резултате добивене током израде ове докторске дисертације који су детаљно прокоментарисани и подељени у три целине. Прва целина приказује резултате добивене приликом клонирања и оптимизације експресије гена за лигнин и версатилну пероксидазу на површини ћелија квасца. У другој целини приказани су резултати добивени приликом припреме насумичних библиотека гена лигнин и версатилне пероксидазе и развоја флуоресцентног есеја са тирамид-флуоресцеином као супстратом за примену у флуоресценцијом активираним ћелијском сортирању. Такође, садржи резултате добивене приликом претраге припремљених библиотека гена у циљу унапређења оксидативне стабилности ензима, секвенцирања и карактеризације одабраних мутаната. Трећа целина садржи резултате добивене приликом припреме и претраге сатурационих библиотека гена лигнин и версатилне пероксидазе у циљу унапређења деградације текстилних боја као и резултате добивене секвенцирањем и карактеризацијом изабраних мутаната ензима. Такође, садржи резултате добивене приликом вишеструке примене ензима и њихових изабраних мутаната за деградацију текстилних боја.

Закључак садржи најрелевантније резултате претходно приказане у докторској дисертацији.

Литература обухвата радове који покривају све сегменте и истраживања приказане у докторској дисертацији.

Б. Кратак приказ резултата

Током израде ове докторске дисертације рађено је на унапређењу деградације текстилних азо боја применом лигнинолитичких пероксидаза, лигнин и версатилне пероксидазе применом протеинског инжењеринга. Гени за лигнин и версатилну пероксидазу су клонирани у вектор који омогућава експресију протеина на површини квасца и урађена је оптимизација експресије оба ензима. Добивени резултати су показали да је за максималну експресију обих протеина неопходно присуство прекурсора за синтезу хема који је неопходан кофактор обих пероксидаза, да је оптимално време експресије ензима 16 часова, као и да је за постизање оптималних услова експресије важна количина ћелија пре и приликом индукције експресије ензима. Примењена су два различита приступа од којих је један био базиран на унапређењу оксидативне стабилности ензима, а други на повећању каталитичке ефикасности ензима за три различите азо боје. У циљу унапређења оксидативне стабилности ензима припремљене су насумичне библиотеке гена са изузетно великим бројем копија мутираних гена (3×10^6 за версатилну пероксидазу и 1×10^6 за лигнин пероксидазу). Експресија пероксидаза на површини квасца омигућила је одржање везе између генотипа и фенотипа, а самим тим и примену флуоресценцијом активiranог ћелијског сортирања за претрагу библиотека гена. У ове сврхе оптимизован је флуоресцентни есеј базиран на тирамид-флуоресцеину као супстрату претходно примењеног за пероксидазу из рена. Сортирање референтних библиотека довело је до значајног обogaћења узорка ћелијама које експримирају ензима. Након сортирања проценат ћелија које експримирају ензим порастао је са 5% на 69% за версатилну пероксидазу и на 71% за лигнин пероксидазу. Након што је потврђена ефикасност есеја приступљено је сортирању насумичних библиотека гена уз примену селекционог притиска (преинкубација ћелија у високим концентрацијама водоник-пероксида). Урађене су две рунде сортирања, а оксидативна стабилност ензима експримираних на појединачним сортираним колонијама је даље анализирана у микротитар плочама. Показано је да је након две рунде сортирања дошло до значајног обogaћења библиотека ћелијама које експримирају варијанте ензима са побећаном оксидативном стабилношћу у односу на дивљи тип ензима, са 1% на 52% за лигнин пероксидазу и 56% за версатилну пероксидазу. По три мутанта ензима са највећом стабилношћу су изабрана за сваки ензим и даље окарактерисана. Ћелије квасца које експримирају ензим или његове мутанте су лизирани уз додатак толуола, а фрагментни

ћелијских зидова обложени ензимима су испрани. Инкубација ћелијских зидова обложених дивљим типовима ензима и мутираним ензимима показала је да је дошло до значајног унапређења оксидативне стабилности. Дивљи сојеви ензима су задржали 10% или мање иницијалне активности након 1 часа инкубације док су најбољи мутанти задржали и до 80% активности. Поред тога, након 10 циклуса деградације боја дивљи типови ензима изгубили су и до 30% активности, док су мутирани ензими цокоро задржали своју почетну активност. Секвенцирање гена мутираних ензима потврдило је присуство већег броја површинских мутација, превасходно мутација које су довеле до увођења додатног наелектрисања на површини ензима, мутација у близини везивних места за јоне калцијума, као и мутација метионина у леуцин. Кинетички параметри за водоник-пероксид одређени су након екстракције химерних протеина са површине квасца и њиховог пречишћавања. Већи број мутираних ензима показао је сличне вредности за каталитичку константу као дивљи типови, али и веће K_M вредности. У циљу унапређења каталитичке ефикасности ензима за деградацију текстилних боја припремљене су сатурационе библиотекe гена са уведеним мутацијама на по две позиције, D165N и D264N за лигнин пероксидазу и V160N и A260N за версатилну пероксидазу. Две припремљене библиотеке гена претражене су у микротитар плочама у циљу проналажења мутираних варијанти ензима са повећаном активношћу приликом деградације три текстилне боје: Evans blue, Amido black 10B i Guinea green. Добивени резултати потврдили су утицај изабраних мутираних позиција на супстратну специфичност ензима и успешно су изоловани мутирани ензими са повећаном каталитичком ефикасношћу за све три тестиране боје. Кинетички параметри изабраних мутаната и дивљих типова ензима за све три боје одређени су након екстракције и пречишћавања химерних ензима. На овај начин добивени су мутанти са до 13 пута већом константом специфичности. Секвенцирање изабраних мутантата показало је разноврсност у типу аминокиселина уведених на изабрана места. Мутације на позицији 160 версатилне проксидазе довеле су до увођења малих, ненаелектрисаних аминокиселина, а на позицији 260 већих, често ароматичних аминокиселина. У већем броју случајева до повећања каталитичке ефикасности дошло је услед благог повећања каталитичке константе и значајног смањења K_M вредности. Ћелијски зидови обложени мутирантима лигнин и версатилне пероксидазе примењени су у вишеструким циклусима деградације наведених боја. Показано је да су лигнин пероксидаза и њени мутанти задржали скоро целокупну активност након 10

осмочасовних циклуса деградација, а версатилна пероксидаза и њени мутанти су задржали до 70% почетне активности након 10 дванаесточасовних циклуса деградације, при чему су мутанти лигнин пероксидазе уклонили значајно већи проценат боја из реакционе смеше у односу на дивљи тип ензима.

В. Упоредна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе у току израде ове докторске дисертације кандидат је експримирао две лигнинолитичке пероксидазе на површини ћелија квасца, лигнин и версатилну пероксидазу. На површини истих ћелија претходно је експримирана друга изоформа лигнин пероксидазе, док је версатилна пероксидаза први пут експримирана на површини ћелија. Активности и стабилност претходно експримиране лигнин пероксидазе упоредиви су са истим карактеристикама лигнинолитичких пероксидаза експримираних у току израде ове докторске дисертације. Припремљене су насумичне библиотеке гена за лигнин и версатилну пероксидазу са 10^6 или више мутираних ензима, при чему су до сада пријављене библиотеке гена ових пероксидаза максималне величине од 10^5 копија гена. Такође, флуоресцентни есеј базиран на примени тирамид-флуоресцеина претходно примењен за промену енантоселективности пероксидазе из рена имао је једнако добру ефикасност за сортирање ћелија лигнин и версатилне пероксидазе у циљу унаређења оксидативне стабилности ензима. Међутим, ово је први флуоресцентни есеј за лигнинолитичке пероксидазе и у току израде ове докторске дисертације развијен је први систем за сортирање насумичних библиотека гена лигнинолитичких пероксидаза. Обогаћење референтних, али и насумичних библиотека гена након сортирања било је упоредиво са претходно објављеним резултатима за друге ензиме у двоструким емулзијама. Мутације детектоване у структури пероксидаза углавном су биле лоциране на површини ензима и у већем броју случајева резултовале су увођењу наелектрисања на површини ензима, што је у складу са објављеним резултатима за већи број ензима, при чему овај тип мутација има позитиван ефекат на стабилност протеина. Такође, примећена мутација метионина у леуцин је претходно објављена мутација која има значајан утицај на унапређење оксидативне стабилности ензима. Претходно је објављено да регион каталитичког триптофана може да има утицај на супстратну специфичност лигнинолитичких пероксидаза. У току израде докторске дисертације ова хипотеза је потврђена кроз унашређење каталитичке ефикасности ових ензима за деградацију текстилних боја увођењем мутација у датом региону.

Г. Објављени радови и саопштења који чине део докторске дисертације

Из резултата ове докторске дисертације проистекла су четири научна рада од којих су три публикована у врхунским међународним часописима (категорија М21), а један је публикован у истакнутом међународном часопису (категорија М22), као и два саопштења са међународних скупова штампана у изводу (категорија М34).

1. Објављени радови

Врхунски међународни часописи (М21)

Илић Ђурђић, К, Ostafe R, Ђурђевић-Ђелмаш А, Поповић Н, Schillberg S, Fischer R, Prodanović R. Saturation mutagenesis to improve the degradation of azo dyes by versatile peroxidase and application in form of VP-coated yeast cell walls”. *Enzyme and Microbial Technology* (2020) 136:109509.

<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109509>

ИФ=3,553 (2018)

Поље истраживања: Биотехнологија и примењена микробиологија 45/162 (2018) ISSN: 0141-0229

Илић Ђурђић К, Ece S, Ostafe R, Vogel, S, Schillberg S, Fischer R. Prodanović R. Improvement in oxidative stability of versatile peroxidase by flow cytometry-based high-throughput screening system. *Biochemical Engineering Journal* (2020) 157:107555.

<https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107555>

ИФ= 3,371 (2018)

Поље истраживања: Инжењеринг, хемијски 35/138 (2018) ISSN: 1369-703X

Илић Ђурђић, К, Ostafe R, Ђурђевић-Ђелмаш А, Поповић Н, Schillberg S, Fischer R, Prodanović R. Improved degradation of azo dyes by lignin peroxidase following mutagenesis at two sites near

the catalytic pocket and the application of peroxidase-coated yeast cell walls. *Frontiers in Environmental Science and Engineering* (2021) 15:19.

<https://doi.org/10.1007/s11783-020-1311-4>

ИФ=4,053 (2019)

Поље истраживања: Науке о животној средини 68/265 (2019) ISSN: 2095-2201

Истакнути међународни часопис (M22)

Ilić Đurđić K, Ece S, Ostafe R, Vogel S, Balaž AM, Schillberg S, Fischer R, Prodanović R. Flow cytometry-based system for screening of lignin peroxidase mutants with higher oxidative stability. *Journal of Bioscience and Bioengineering* (2020) 129(6), 664-671.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.12.009>

ИФ=2,366 (2019)

Поље истраживања: Биотехнологија и примењена микробиологија 85/162 (2018) ISSN: 1389-1723

2. Саопштења са међународних скупова штампана у изводима (M34)

Ilić Đurđić K, Ostafe R, Schinkel H, Ece, S, Schillberg S, Fischer R, Prodanović R. Improvement of the oxidative stability of fungal ligninolytic peroxidases by FACS-based high throughput screening system. FEBS 3+ conference: From molecules to living systems, Syófok, Hungary, September, 2-5, 2018. p. 92.

Ilić Đurđić K, Ostafe R, Schillberg S, Fischer R, Prodanović R. Improvement in azo dyes degradation by saturation mutagenesis of lignin peroxidase catalytic tryptophan environment". IX BDS conference: Diversity in Biochemistry, Belgrade, Serbia, November, 14-16, 2019. p. 103.

Поред наведених публикација и саопштења који су проистекли из ове дисертације, кандидат је коаутор на још два научна рада из категорије M22 и једног саопштења на скупу од међународног значаја (M34).

Д. Провера оригиналности докторске дисертације

Оригиналност докторске дисертације Карле Илић Ђурђић је проверена употребом програма iThenticate на начин прописан Правилником о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду (Гласник Универзитета у Београду, бр. 204/22.06.2018.). Утврђено је да је степен подударности од 4% настао као последица цитата, личних имена, библиографских података коришћених у литератури, тзв. општих места и података у вези са темом ове дисертације, као и претходно публикованих резултата истраживања проистеклих из дисертације, што је у складу са чланом 9. овог Правилника. Стога сматрамо да је утврђено да је докторска дисертација Карле Илић Ђурђић у потпуности оригинална, као и да су у потпуности поштована академска правила цитирања.

Б. Закључак

На основу приказаних података и резултата, Комисија је закључила да је у поднетој дисертацији под називом „Протеински инжењеринг лигнинолитичких пероксидаза у циљу унапређења деградације текстилних боја“, кандидат Карла Илић Ђурђић успешно одговорила на задате циљеве у оквиру којих је изоловала мутанте лигнин и версатилне пероксидазе са унапређеном оксидативном стабилношћу у односу на дивље типове ензима применом дириговане еволуције и флуоресценцијом активираниог ћелијског сортирања и мутанте истих пероксидаза са значајно унапређеном каталитичком ефикасношћу за деградацију три текстилне азо боје применом сатурационе мутагенезе и претраживањем конструисаних библиотека гена. Такође, кандидат је развио систем базиран на мутираним лигнинолитичким пероксидазама погодан за примену у процесима биодеградације. Резултати научно – истраживачког рада кандидата постигнути у оквиру ове докторске дисертације су објављени у четири научна рада, три у врхунским међународним часописима (категорије M21) и један у истакнутом међународном часопису (категорије M22), а који су уједно од великог значаја за разумевање супстратне специфичности лигнинолитичких пероксидаза и примену ових ензима у индустријске сврхе. Резултати добијени током израде докторске дисертације су приказани и саопштени на два међународна скупа (категорије M34). На основу изложеног Комисија предлаже Наставно – научном већу Хемијског факултета Универзитета у Београду, да поднету докторску дисертацију Карле Илић Ђурђић под насловом „Протеински инжењеринг лигнинолитичких проксидаза у циљу унапређења

деградације текстилних боја“ прихвати и одобри њену одбрану за стицање академског звања доктора биохемијских наука.

Београд, 17.09.2020.

КОМИСИЈА:

Član komisije:

dr Tanja Ćirković Veličković

Redovni profesor

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Ghent University, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent, Belgija

Ghent University Global Campus, Incheon, Južna Koreja

Dopisni član SANU

Član komisije:

dr Marija Gavrović-Jakulović

Redovni profesor

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Član komisije:

dr Zoran Vujčić

Redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Član komisije:

dr Nataša Božić

Naučni savetnik

Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju –
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,
Univerzitet u Beogradu