

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - ХЕМИЈСКОГ ФАКУЛТЕТА

Предмет: Извештај о оцени научне заснованости и оправданости предложене теме за израду докторске дисертације кандидата **Reyadh El Gahwash**, мастер бихемичара, студента докторских студија Универзитета у Београду - Хемијског факултета.

На редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Хемијског факултета, одржаној 11. 7. 2024. године, изабрани смо за чланове Комисије за подношење извештаја о оцени научне заснованости и оправданости предложене теме за израду докторске дисертације кандидата **Reyadh El Gahwash**, мастер биохемичара, студента докторских студија Универзитета у Београду - Хемијског факултета, пријављене под насловом:

„Production of fructose and aldonic acids by immobilized coupled enzymatic systems based on recombinant A2 mutant of glucose oxidase from *Aspergillus niger* and H5 mutant of cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium*“

„Производња фруктозе и алдонских киселина имобилизованим куплованим ензимским системима заснованим на рекомбинантном А2 мутанту глукоза оксидазе из *Aspergillus niger* и H5 мутанта целобиоза дехидрогеназе из *Phanerochaete chrysosporium* “

На основу доступне документације, а имајући у виду досадашњи рад кандидата, подносимо Наставно-научном већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Биографски подаци кандидата

Reyadh Gomah Amar Elgahwash је рођен 10. 12. 1986. у *Zawiyah* у Либији. Диплому средње медицинске школе је добио у истом месту 2003. године. Завршио је Фармацеутски факултет на Фармацеутском факултету Универзитета Африке у

Триполију у Либији 2008. године. Завршио је Мастер студије на Биохемији на Универзитету у Београду-Хемијском факултету 2012. године одбранивши Мастер тезу по насловом „*Extracellular and Surface Display Expression of Glucose Oxidase Constructs in Different Saccharomyces cerevisiae Strains*“ код Проф. Радивоја Продановић. Докторске студије на Универзитету у Београду-Хемијском факултету је уписао 2012. године и поново уписао 2022. године. Кандидат се бави научно-истраживачким радом из области биохемије, који подразумева протеински инжењеринг, продукцију, карактеризацију и пречишћавање ензима, њихову имобилизацију и карактеризацију добијених имобилизата.

Б. Објављени научни радови и саопштења

Reyadh Gomah Amar Elgawash је коаутор једног саопштења, штампаног у изводу на скупу од међународног значаја:

Научна саопштења са скупова међународног значаја штампана у изводу (M34)

1. Nevena Surudžić, Dragica Spasojević, Mira Stanković, Milica Spasojević, **Reyadh Gomah Amar Elgawash**, Radivoje Prodanović, Olivera Prodanović, Horseradish peroxidase immobilization within micro-beads of oxidized tyramine-alginate for phenol removal from wastewater, 2023, 30th International Conference Ecological Truth and Environmental Research–EcoTER’23, Proceedings 267-271, 2023.

В. Образложење теме

1. Научна област: Хемија

Ужа научна област: Биохемија

2. Предмет научног истраживања

Истраживања планирана у оквиру ове докторске дисертације обухватају производњу и експресију рекомбинантног мутанта Н5 целобиоза-дехидрогеназе из *Phanerochaete chrysosporium* у квасцу *Pichia pastoris* КМ71Н и пречишћавање добијеног рекомбинантног протеина. Такође се планира и експресија А2 мутанта глукоза-оксидазе из *Aspergillus niger* и његово приказивање на површини ћелија квасца *Saccharomyces cerevisiae* ЕВУ100. Ћелије квасца са глукоза-оксидазом на површини

ћелијског зида би се лизирале толуеном и добијени ћелијски зидови умрежили глутаралдехидом. Добијени пречишћени мутант целобиоза-дехидрогеназе би се у куплованом ензимском систему са лаказом искористио за производњу лактобионске киселине, док би се умрежени ћелијски зидови квасца који у себи садрже A2 мутант глукоза-оксидазе, инвертазу и каталазу из квасца искористиле за хидролизу сахарозе и оксидацију глукозе до глуконске киселине, чиме би се у једном кораку произвеле фруктоза и глуконска киселина. Са индустријске тачке гледишта би се добијени биокатализатори могли искористити за производњу фруктозе и алдонских киселина.

3. Циљ научног истраживања

Циљ ове докторске дисертације је развој нових куплованих мултиензимских система за производњу лактобионске киселине из лактозе, као и глуконске киселине и фруктозе из сахарозе употребом протеинског инжењеринга и имобилизацијом умрежавањем глутаралдехидом. Добијени купловани мултиензимски системи би имали побољшане оперативне перформансе за добијање алдонских киселина и фруктозе у вишеструким циклусима употребе.

Специфични циљеви докторске дисертације обухватају:

- Експресија мутаната глукоза-оксидазе A2 повећане активности и специфичности ка глукози и негова имобилизација на површини ћелија квасца;
- Експресија и пречишћавање H5 мутанта целобиоза-дехидрогеназе повећане активности у односу на природни облик ензима;
- Развој куплованог ензимског система глукоза-оксидаза, каталаза, инвертаза имобилизованог у ћелијским зидовима квасца;
- Развој куплованог ензимског система целобиоза-дехидрогеназе и лаказе за производњу лактобионске киселине;
- физичко-хемијска и кинетичка карактеризација добијених куплованих ензимских система;
- одређивање оперативних перформанси имобилизованих биокатализатора;
- испитивање могућности вишеструке употребе имобилизованих биокатализатора за производњу алдонских киселина.

4. Методе истраживања

Током израде ове докторске тезе биће коришћене следеће методе и експерименталне технике:

- 1) **Хемијске методе:** Хемијске реакције као што је глутаралдехидна модификација у циљу имобилизације ензима, и у циљу умрежавања биокатализатора и ћелијских зидова квасца. Танкослојна хроматографија за детекцију моносахарида, дисахарида и алдонских киселина.
- 2) **Инструменталне методе:** Ултравioletна и видљива спектроскопија (UV/Vis) за спектрофотометријско мерење ензимске активности имобилизованих и неимобилизованих ензима и ензимских система у циљу праћења производње алдонских киселина и моносахарида.
- 3) **Биохемијске методе:** хроматографске методе пречишћавања протеина као што су гел хроматографија и јоноизмењивачка хроматографија. Натријум-додецилсулфат полиакриламидна електрофореза и изоелектрично фокусирање за проверу успешности пречишћавања ензима и одређивање њихових молекулских маса и изоелектричне вредности.
- 4) **Методе молекуларне биологије:** ДНК електрофореза, рестрикција и трансформација са плазмидном ДНК, бактерије *E. coli* и квасца *P. pastoris* у циљу добијања генетски модификованих микроорганизама који садрже гене мутаната глукоза-оксидазе и целобиоза-дехидрогеназе.
- 5) **Микробиолошке методе:** ферментације за гајење ћелија квасца *P. pastoris* и бактерије *E. coli* уз контролисање хемијског и биохемијског састава, температуре ферментационе смеше, као и времена трајања ферментације у циљу производње рекомбинантних ензима и плазмида.

5. Актуелност проблематике

Глукоза-оксидаза је ензим који може да оксидује глукозу до глуконске киселине кисеоником, уз ослобађање водоник пероксида. А2 мутант који би се искористио има повећану активност у односу на природни облик ензима. Да би се спречила инактивација глукоза-оксидазе водоник пероксидом, каталаза, која је још увек присутна у ћелијама квасца услед своје молекулске масе непосредно након лизе толуеном, би се трајно задржала у ћелијским зидовима умрежавањем глутаралдехидом. На тај начин би се добио купловани ензимски систем глукоза-оксидаза, каталаза који се до сада показао као ефикасан у производњи глуконске киселине (1). У ћелијском зиду пекарског квасца гајеном на сахарози налази се и инвертаза, која хидролизује сахарозу као јефтину индустријску сировину у фруктозу и глукозу (2) на овај начин, би се добио имобилизовани купловани ензимски систем који се показао као погодан за производњу поред глуконске киселине и фруктозе (3,4).

Целобиоза-дехидрогеназа је ензим који може да оксидује лактозу уз помоћ акцептора електрона као што је 2,6-дихлоро индофенол до лактобионске киселине (5). Мутант Н5 поседује повећану активност и ефикасност конверзије лактозе до лактобионске киселине (6) и уз употребу лаказе се редуковани 2,6-дихлороиндофенол може поново оксидовати молекулским кисеоником и регенерисати, чиме се добија купловани ензимски систем за производњу лактобионске киселине из лактозе (7).

Алдобионске киселине, се могу користити у различитим гранама индустрије и медицине. Тако се на пример користе као адитив за стабилизацију органа током трансплатације због особине да хелирају метале и смањују оксидативни стрес и оштећење ткива за време складиштења органа (8).

Протеински инжењеринг подразумева промену секвенције гена који кодира одређену аминокиселинску секвенцију протеина у циљу промене протеинске активности и стабилности (9). Протеински инжењеринг се може искористити и за добијање рекомбинантних ензима имобилизованих на површини ћелија квасца, чиме се добија природно имобилизован биокатализатор који је претходним процесом мутација и селекција добио повећану активност/стабилност у односу на природни облик ензима. На тај начин имобилизован ензим има нижу цену добијања, могућност регенерације,

као и олакшане употребе у мултиензимским системима сличним системима који се користе у метаболичком инжењерингу (10).

6. Очекивани резултати истраживања

Применом описаних метода и техника, очекује се да ће предложена истраживања резултовати добијањем нових имобилизованих куплованих ензимских система погодних за добијање алдонских киселина и фруктозе. Очекује се да би добијени купловани ензимски систем мутанта А2 глюкоза-оксидазе, каталазе и инвертазе имао побољшане оперативне особине (активност, специфичност и оперативна стабилност) у реакцијама производње глуконске киселине и фруктозе из сахарозе. Такође се очекује добијање имобилизованог куплованог ензимског система Н5 мутанта целобиоза-дехидрогеназе и лаказе са побољшаним оперативним карактеристикама у односу на постојеће за добијање лактобионске киселине

7. Литература

1. Godjevargova, T., R. Dayal, and S. Turmanova, Gluconic acid production in bioreactor with immobilized glucose oxidase plus catalase on polymer membrane adjacent to anion-exchange membrane.2004. *Macromol Biosci.* 2004 Oct 20;4(10): 950-6. doi: 10.1002/mabi.200400058. *Macromolecular Bioscience.*
2. A. Uroš, P. Srdjan, Purification and characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase isoforms. *Purification and characterisation of Saccharomyces cerevisiae external invertase isoforms.* 2010(3): p. 799804. 2010(3) 799804. *Food.*
3. A.C. Mafra, et al., Gluconic acid production from sucrose in an airlift reactor using a multi-enzyme system, *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 38 (4) (2015) 671–680
4. F.A. Taraboulsi, E.J. Tomotani, M. Vitolo, Multienzymatic sucrose conversion into fructose and gluconic acid through fed-batch and membrane-continuous processes, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 165 (7–8) (2011) 1708–1724.
5. Van Hecke W, et al. 2009. Bubble-free oxygenation of a bienzymatic system: effect on biocatalyst stability. *Biotechnol Bioeng.* 102(1):122–131.
6. Balaz AMJ, BM, Popovic N, Prodanovic OL, Ostafe RV, Fischer R, Prodanovic RM. 2020. Expression, purification and characterization of cellobiose dehydrogenase mutants

- from *Phanerochaete chrysosporium* in *Pichia pastoris* KM71H strain. J Serb Chem Soc. 85(1):10.
7. Splechtna B, et al. 2001. Production of a lactose-free galactooligosaccharide mixture by using selective enzymatic oxidation of lactose into lactobionic acid. Enzyme Microb Technol. 29(6):434–440.
 8. Guibert EE, et al. 2011. Organ preservation: current concepts and new strategies for the next decade. Transfus Med Hemother. 38(2):125–142.
 9. Blazic M, et al. 2019. Directed evolution of cellobiose dehydrogenase on the surface of yeast cells using resazurin-based fluorescent assay. Appl Sci. 9(7):1413.
 10. Front. Bioeng. Biotechnol., 10 January 2022 Sec. Industrial Biotechnology Volume 9 - 2021 <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.794742>.

Г. Закључак

Комисија оцењује да је предложена тема научно заснована и актуелна, као и да ће очекивани резултати представљати напредак и значајан допринос у области биохемије.

У складу са Законом о високом образовању и Статутом Универзитета у Београду - Хемијског факултета, сматрамо да кандидат испуњава све неопходне услове за одобрење израде докторске дисертације. Имајући у виду напред наведено Комисија предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Хемијског факултета да кандидату **Reyadh Gomah Amar Elgahwash**, мастер биохемичару и студенту докторских студија Универзитета у Београду – Хемијског факултета, одобри израду докторске дисертације под **измењеним насловом** у односу на онај који је кандидат предложио, а који гласи:

„Production of fructose and aldonic acids by immobilized coupled enzymatic systems based on recombinant A2 mutant of glucose oxidase from *Aspergillus niger* and H5 mutant of cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium*“

„Производња фруктозе и алдонских киселина имобилизованим куплованим ензимским системима заснованим на рекомбинантном A2 мутанту глукоза-оксидазе из *Aspergillus niger* и H5 мутанту целобиоза-дехидрогеназе из *Phanerochaete chrysosporium* “

За ментора Комисија предлаже др Радивоја Продановића, редовног професора Универзитета у Београду - Хемијског факултета. Списак радова предложеног ментора објављених у научним часописима са SCI листе, који квалификују ментора за вођење докторске дисертације кандидата су дати у Прилогу 1 овог Извештаја.

У Београду,
1. 8. 2024.

Комисија:

др Радивоје Продановић, редовни професор
Универзитет у Београду – Хемијски
факултет

др Зоран Вујчић, редовни професор
Универзитет у Београду – Хемијски
факултет

др Марија Гавровић Јанкуловић, редовни професор
Универзитет у Београду – Хемијски
факултет

др Оливера Продановић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду – Институт за мултидисциплинарна истраживања

Прилог 1

Изабрани радови предложеног ментора др Радивоја Продановића, редовног професора:

1. Popović N, Pržulj D, Mladenović M, Prodanović O, Ece E, Ilić Đurđić K, Ostafe R, Fischer R, Prodanović R. Immobilization of yeast cell walls with surface displayed laccase from *Streptomyces cyaneus* within dopamine-alginate beads for dye decolorization. *International Journal of Biological Macromolecules*, (2021), 181: 1072–1080. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.115>;
2. Pantić N, Spasojević M, Stojanović Ž, Veljović Đ, Krstić J, Balaž AM, **Prodanović R**, Prodanović O. Immobilization of Horseradish Peroxidase on Macroporous Glycidyl-Based Copolymers with Different Surface Characteristics for the Removal of Phenol. *J Polym Environ*. 2022 Jul 5;30(7):3005–20. <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02364-3>
3. Stanišić MD, Popović Kokar N, Ristić P, Balaž AM, Senćanski M, Ognjanović M, Đokić VR, **Prodanović R**, Todorović TR. Chemical Modification of Glycoproteins' Carbohydrate Moiety as a General Strategy for the Synthesis of Efficient Biocatalysts by Biomimetic Mineralization: The Case of Glucose Oxidase. *Polymers (Basel)*. 2021 Nov 10;13(22):3875. <https://doi.org/10.3390/polym13223875>
4. Blažić M, Balaž AM, Tadić V, Draganić B, Ostafe R, Fischer R, **Prodanović R**. Protein engineering of cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium* in yeast *Saccharomyces cerevisiae* InvSc1 for increased activity and stability. *Biochem Eng J*. 2019 Jun;146:179–85. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.03.025>
5. Spasojević D, Prokopijević M, Prodanović O, Zelenović N, Polović N, Radotić K, **Prodanović R**. Peroxidase-Sensitive Tyramine Carboxymethyl Xylan Hydrogels for Enzyme Encapsulation. *Macromol Res*. 2019;27(8):764–71. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.03.025>