

Univerzitet u Beogradu
Hemijski fakultet

Marica M. Grujić

**Celulaze gljive *Trichoderma harzianum*:
produkcija, kontrola produkcije i
karakterizacija eksprimiranih enzima**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016

University of Belgrade
Faculty of Chemistry

Marica M. Grujić

Cellulases of fungus *Trichoderma harzianum*: production, control of production and characterization of the expressed enzyme

Doctoral dissertation

Belgrade, 2016

MENTORI:

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

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

ČLANOVI KOMISIJE

dr Vladimir Beškoski, docent
Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

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

DATUM ODBRANE

Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za Biohemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu pod rukovodstvom redovnog profesora dr Zorana Vujčića i dr Biljane Dojnov.

Mentoru dr Zoranu Vujčiću se zahvaljujem na neprocenljivoj pomoći u toku planiranja eksperimenata, njihovoj realizaciji, tumačenju rezultata i uobličavanju ovog rada. Neizmernu zahvalnost mu dugujem za sve što me je naučio, prilici da učim, stičem nova znanja, razvijam kreativnost u eksperimentima i velikom razmevanju od prvih istraživačkih koraka. Takođe, veliku zahvalnost dugujem za beskrajno razumevanje i podršku za profesionalno usavršavanje i da istrajem u ovom radu.

Mentoru dr Biljani Dojnov se pre svega zahvaljujem na svesrdnoj pomoći prilikom planiranja i razvijanja eksperimenata, analizi rezultata i njihovom uobličavanju. Neprocenjivu zahvalnost joj dugujem na razumevanju i strpljenu, podršci i savetima tokom mog učenja, rada u laboratoriji i izradi doktorske disertacije. Beskrajnu zahvalnost joj dugujem na svemu što me je naučila, a pre svega što me je naučila da volim svoje eksperimente.

Dr Bojanu Duduku sam veoma zahvalna na prilici da stičem znanja u oblasti molekularne biologije, pomoći i korisnim sugestijama u izradi doktorske disertacije.

Zahvaljujem se dr Vladimiru Beškoski na korisnim sugestijama i pomoći prilikom izrade doktorske disertacije.

Koleginici dr Ivani Potočnik i kolegama sa Insituta za pesticide i zaštitu životne sredine se zahvaljujem na ukazanoj pomoći i pruženom znanju tokom realizacije doktorske disertacije.

Zahvaljujem se dragim kolegama dr Miroslavi Vujčić, dr Nataši Božić, dr Aleksandri Margetić, dr Nikoli Lončaru, Barbari, Marineli, Ivi, Bojani, Anji, Nikoli, Ratku, Sanji i Milici na nesebičnoj pomoći, razumevanju, podršci i divnom druženju u svakom trenutku. Takođe se zahvaljujem i ostalim kolegama sa Hemijskog fakulteta i Centra za hemiju-IHTM.

Veliku zahvalnost dugujem svojim dragim prijateljima na pomoći, druženju i podršci u najtežim trenucima.

Svojoj porodici, roditeljima, bratu i sestri, i Marku dugujem zahvalnost na neiscrpoj pomoći i bezrezervnoj podršci, strpljenu i razumevanju bez kojih ne bih uspela.

Acknowledgment

First, I would like to thank to Dr. Irina S. Druzhinina (Institute of Chemical engineering, Technical University in Vienna, Austria) who enabled me to make a part of my PhD thesis in her professional and great Microbiology research group. I am very thankful for her priceless knowledge, helpful suggestions, motivations, understanding and comprehensive support in each part of my work.

Special thanks to Dr. Lea Atanasova from whom I learnt the beginning vital skills in molecular-biology. She supported me and helped me whenever I needed assistances. Also, I am grateful for our wonderful friendship during the work at TU Vienna.

Furthermore, I would like to thank professor Dr. Christian Kubicek for help, suggestions and support during last three years.

Likewise, I would like to thank all the members of Microbiology group for help, support, understanding and great time in the laboratory.

„Celulaze gljive *Trichoderma harzianum*: produkcija, kontrola produkcije i karakterizacija eksprimiranih enzima“

SAŽETAK

Ova disertacija se bavi ispitivanjem mogućnosti primene izolata gljive roda *Trichoderma harzianum* za produkciju enzima celulaznog kompleksa, optimizacijom uslova za njihovu produkciju upotrebom otpadnih lignoceluloznih materijala, ispitivanjem mehanizma kontrole produkcije i karakterizacijom produkovanih celulaznih enzima.

Razvijen je brz i pouzdan test za selekciju endocelulaznih hiperprodukujućih izolata *Trichoderma* spp., koji je korišćen za analizu sto *Trichoderma* spp. izolata. Obećavajući produceri su identifikovani do nivoa vrste. Najbolji producer endocelulaza je identifikovan kao *Trichoderma guizhouensis* (UB483FTH2) iz grupe *T. harzianum* i korišćen je za produkciju celulaznih enzima.

Optimizovani su uslovi za produkciju celulaznog kompleksa enzima u uslovima tečne fermentacije upotrebom slame kao inducibilnog supstrata. Maksimalna produkcija endocelulaza (28,32 U/g) je dobijena u 3 danu fermentacije, egzocelulaza (0,049 U/g) nakon 5 dana fermentacije i β -glukozidaza (14,1 U/g) u 7 danu fermentacije.

Razvijena je zimogramska metoda za istovremenu detekciju različitih klasa celulaznih izoformi, nakon izoelektrofokusanja. β -glukozidaze su detektovane nakon printovanja na nitroceluloznoj membrani upotrebom eskulina. Endocelulaze su detektovane na poliakrilamidnom gelu sa koopolimerizovanom karboski metil celulozom, dok su egzocelulaze detektovane upotrebom 4-metilumberiferil- β -D-celobiozida kao supstrata.

Ispitana je i upotreba iskorišćenog komposta šampinjona kao novog supstrata za produkciju celulaznih enzima gajenjem 6 izolata *Trichoderma* spp. Produkovana je značajna količina endocelulaza i β -glukozidaza, uz istovremeno smanjenje početnog supstrata za 30%.

Mehanizam regulacije produkcije celulaznih proteina izolata UB483FTH2 je analiziran korelisanjem nivoa transkribovane iRNA za gene *xyl1* i *lae1*, regulatora produkcije celulaza, sa produkcijom svih celulaznih enzima. Pronađeno je da eksprimirani geni, *xyl1* i *lae1*, imaju pozitivan uticaj na produkciju celulaznih enzima i proteina.

Ključne reči: celulaze, *Trichoderma harzianum*, selekcija, zimogram, optimizacija, *xyl1*, *lae1*, iskorišćeni kompost šampinjona.

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Biohemija

„Cellulases of fungus *Trichoderma harzianum*: production, control of production and characterization of the expressed enzyme“

ABSTRACT

This thesis examines application of isolates of *Trichoderma harzianum* for production of cellulase enzyme complex, optimization of their production using lignocellulose waste materials, studying of control mechanisms for production and characterization of the produced cellulases enzymes.

Fast and reliable test for the selection of endocellulase hyper-producing isolates of *Trichoderma* spp. has been developed and used for screening one hundred isolates of *Trichoderma* spp. The promising isolates have been isolated to species level. The best endocellulase producer is identified as *Trichoderma guizhouensis* (UB483FTH) which belongs to the *Trichoderma harzianum* species complex. This strains was used for production of cellulase enzyme complex.

Cellulase production was optimized using wheat straw as a substrate in conditions of submerged fermentation. Maximum of endocellulase production (28.32 U/g) was obtained in 3rd days of fermentation, exocellulase (0.049 U/g) after 5th days and β -glucosidase (14.1 U/g) in 7th days of fermentation.

Reliable zymographic method for simultaneous characterization of cellulolytic complex enzymes after isoelectric focusing has been developed. β -glucosidase is detected after printing on nitrocellulose membrane using esculin as substrate. Endocellulase was detected on polyacrilamide gel with copolymerized carboxymethyl-cellulose and exocellulase were detected using 4-metillumberiferil- β -D-celobioside as a substrate.

Reuse of spent mushroom compost as a new substrate for the production of cellulase enzymes by 6 isolates *Trichoderma* spp. was examined here too. Significant amount of endocellulase and β -glucosidase were produced, while the amount of initial substrate decreased by 30%.

The regulation mechanism of protein production of isolate UB483FTH2 analysed as a correlation of transcribed level of mRNA for genes *xyl1* and *lae1* as a regulators of production of cellulase enzymes. It was found that expressed genes *xyl1* and *lae1* have a positive effect on the production of cellulases proteins and total proteins.

Key words: cellulases, *Trichoderma harzianum*, screening, zymogram, optimization, *xyl1*, *lae1*, spent mushroom compost

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Biochemistry

Lista skraćenica.....	1
1. Uvod.....	3
2. Opšti deo.....	6
2.1 Gljive kao produceri enzima.....	6
2.1.1 Gljive roda <i>Trichoderma</i>	7
2.1.2 Istorijat gljiva roda <i>Trichoderma</i>	7
2.1.3 Morfološke karakteristike gljiva roda <i>Trichoderma</i>	9
2.1.4 <i>Trichoderma harzianum</i>	11
2.1.5 Izolovanje potencijalnih celulolitičkih producera iz prirode.....	13
2.1.6 Identifikacija gljiva <i>Trichoderma</i> spp.	13
2.1.6.1 Biohemijske metode za identifikaciju.....	14
2.1.6.2 Identifikacija sojeva roda <i>Trichoderma</i> tehnikama molekularne biologije.....	14
2.1.6.2.1. Konstruisanje filogenetskog stabla.....	17
2.1.7 Testovi za skrining gljiva producera celulaza.....	21
2.2 Produkcija celulaza.....	22
2.2.1 Celulaze.....	23
2.2.1.1 Endocelulaze.....	24
2.2.1.2 Egzocelulaze.....	25
2.2.1.3 β -glukozidaze (BG).....	26
2.2.2 Sinergizam dejstva celulolitičkih enzima.....	27
2.2.3 Metode za kvantifikaciju celulaza.....	28
2.2.3.1 Metode za kvantifikaciju eksprimiranih proteina.....	29
2.2.3.2 Spektrofotometrijski eseji za određivanje aktivnosti celulaza.....	30
2.2.3.2.1. Određivanje endocelulazne aktivnosti.....	31
2.2.3.2.2 Određivanje egzocelulazne aktivnosti.....	31
2.2.3.2.3 Određivanje β -glukozidazne aktivnosti.....	31
2.2.3.2.4 Određivanje ukupne celulazne aktivnosti (FPU eseji).....	32
2.2.4 Zimogram za celulaze.....	34
2.3 Prirodni supstrati za produkciju celulaza.....	40
2.3.1 Lignocelulozna biomasa.....	40
2.3.1.1 Celuloza.....	42
2.3.1.2 Hemiceluloza.....	42

2.3.1.3 Lignin.....	43
2.3.2 Tipovi lignocelulozne biomase.....	44
2.3.3 Slama kao lignocelulozni otpad.....	44
2.4 Poboljšanje produkcije celulaza filamentoznih gljiva.....	47
2.4.1 Mutageneza.....	48
2.5 Regulacija genske ekspresije celulaza.....	50
2.5.1 Ksilanazni regulatorni protein 1 (XYR1).....	51
2.5.2 Aktivator celulazne ekspresije 2 (ACE2).....	51
2.5.3 Aktivator proteina sa hemom HAP2/3/5.....	51
2.5.4 Aktivator celulazne ekspresije 1 (ACE1).....	51
2.5.5 S-adenozilmetionin-zavisna metiltransferaza LAE1.....	52
3. Naši radovi.....	55
3.1 Izolovanje gljiva roda <i>Trichoderma</i> iz prirode.....	55
3.2 Razvijanje testa za brzu selekciju celulaznih hiperprodujućih izolata gljiva.....	56
3.3 Selekcija endocelulaznih hiperprodukujućeg izolata <i>Trichoderma</i> sp.	56
3.4 Identifikacija gljiva roda <i>Trichoderma</i>.....	58
3.4.1 Identifikacija gljiva roda <i>Trichoderma</i> na nivou internog transkripcionog spejsera (ITS1/4).....	59
3.4.2 Identifikacija gljiva roda <i>Trichoderma</i> na nivou gena translacionog elongacionog faktora 1- α (<i>tef1</i>).....	61
3.5 Produkcija celulaza <i>T. guizhouense</i> TH2.....	64
3.5.1 Ispitivanje uticaja količine supstrata na produkciju celulaza.....	64
3.5.2 Ispitivanje uticaja brzine mešanja na produkciju enzima.....	66
3.5.3 Ispitivanje uticaja inokulacije na produkciju enzima.....	68
3.5.3.1 Suspenzija spora.....	68
3.5.3.1.1 Određivanje broja spora za inokulaciju.....	68
3.5.3.2 Miceliarni inoculum.....	68
3.5.3.3 Miceliarni disk.....	69
3.5.4 Ispitivanje uticaja azota na produkciju celulaza.....	70
3.5.5 Produkcija celulaza tokom fermentacije.....	73

3.6 Razvijanje zimograma za simultanu detekciju pojedinačnih enzima celulaznog kompleksa.....	76
3.6.1 Zimogramska detekcija celobiazee.....	77
3.6.2 Zimogramska detekcija endocelulaza.....	77
3.6.3 Zimogramska detekcija egzocelulaza.....	77
3.7 Upotreba iskorišćenog komposta nakon gajenja šampinjona kao supstrata za produkciju enzima.....	79
3.7.1 Analiza supstrata nakon produkcije enzima gljivama <i>Trichoderma</i>	80
3.7.1.1 Mikroskopska analiza slame.....	80
3.7.1.2 Parametri efikasnosti enzimske produkcije.....	82
3.7.2 Produkcija endocelulaza na otpadnom kompostu.....	82
3.7.3 Produkcija β -glukozidaze na otpadnom kompostu.....	84
3.8 Poboljšanje produkcije celulaza filamentoznih gljiva.....	85
3.8.1 Selekcija mutanata na produkciju celulaza.....	85
3.8.2 Produkcija celulaznog kompleksa mutantima TH2 na slami kao supstratu.....	86
3.9 Regulacija genske ekspresije celulaza.....	89
3.9.1 PCR verifikacija <i>xyr1</i> i <i>lae1</i> gena u izolatima TH2 i TH6.....	89
3.9.2 Korelacija ekspresije <i>xyr1</i> i <i>lae1</i> gena sa produkcijom enzima celulaznog kompleksa.....	90
3.9.3 Korelacija ekspresije <i>cbh1</i> sa produkcijom egzocelulaze.....	93
3.10 Zaključci.....	95
4. Eksperimentalni deo.....	97
4.1 Izolovanje gljiva roda <i>Trichoderma</i> iz prirode.....	97
4.1.1 Priprema hranljivih podloga za dobijanje spora.....	98
4.1.2 Zasejavanje gljiva.....	98
4.2 Razvijanje testa za brzu selekciju celulaznih hiperprodujućih sojeva gljiva i njihova selekcija.....	99
4.2.1. Određivanje koncentracije spora (broj spora/mL).....	99
4.2.1.1 Priprema rastvora spora.....	99
4.2.1.2 Određivanje broja spora upotrebom hemocitometra (Counting chamber komora).....	100
4.2.1.3 Merenje optičke gustine (OD) rastvora spora.....	100

4.2.1.4 Konstruisanje standardne prave za određivanje broja spora.....	100
4.3 Identifikacija gljiva.....	101
4.3.1 Molekularna identifikacija gljiva na nivou ITS1/4 genskog regiona.....	101
4.3.1.1 Ekstrakcija DNA.....	101
4.3.1.1 Lančana reakcija polimeraze (PCR).....	102
4.3.1.3 Agarozna elektroforeza.....	102
4.3.2 Molekularna identifikacija gljiva na nivou gena <i>tef1</i>	103
4.3.2.1 Ekstrakcija DNA.....	103
4.3.2.2 Lančanareakcijapolimeraze (PCR).....	103
4.3.2.3 Agarozna elektroforeza.....	104
4.3.3 Konstrukcija filogenetskog stable.....	105
4.4 Produkcija celulaznih enzima upotrebom slame kao supstrata.....	105
4.4.1 Priprema slame.....	106
4.4.2 Ispitivanje uticaja količine supstrata na produkciju celulaza.....	106
4.4.3 Ispitivanje uticaja brzine mešanja na produkciju celulaza.....	106
4.4.4 Ispitivanje uticaja inokulacije na produkciju celulaza.....	106
4.4.4.1 Suspenzija spora.....	107
4.4.4.2 Miceliarni inoculum.....	107
4.4.4.3 Miceliarni disk.....	108
4.4.5 Ispitivanje uticaja azota na produkciju enzima obogaćivanjem slame prirodnim izvorima azota.....	108
4.4.5.1 Priprema otpada soje.....	108
4.4.5.2 Priprema otpada od susama.....	108
4.4.5.3 Sintetički izvor azota (soli).....	109
4.4.6 Produkcija celulaza tokom vremena fermentacije.....	109
4.4.7 Prekid fermentacije, priprema FT ianaliza FT.....	109
4.4.8 Analiza fermentacionih tečnosti.....	110
4.4.8.1 Određivanje koncentracije redukujućih šećera.....	110
4.4.8.2 Određivanje koncentracije proteina po Bradfordu.....	112
4.4.8.3 Određivanje endocelulazne aktivnosti.....	113
4.4.8.4 Određivanje β -glukozidazne aktivnosti.....	114
4.4.8.5 Određivanje egzocelulazne aktivnosti.....	115
4.5 Simultana zimogramska detekcija celulaza (zimogram).....	116

4.5.1 Izoelektrično fokusiranje uzoraka fermentacionih tečnosti.....	116
4.5.2 Zimogramska detekcija β -glukozidaza.....	118
4.5.3 Zimogramska detekcija endocelulaza.....	118
4.5.4 Zimogramska detekcija egzocelulaza.....	120
4.6 Upotreba iskorišćenog komposta šampinjona kao supstrata za produkciju enzima.....	113
4.6.1 Prekid fermentacije.....	121
4.6.2 Mikroskopska analiza slame.....	121
4.6.2.1 Priprema mikroskopskih preparata slame 121.....	121
4.7 Poboljšanje produkcije celulaznih enzima.....	121
4.7.1 Hemijska mutacija upotrebom NaNO_2	122
4.7.2 Fizička mutacija ultravioletnim svetlom (UV).....	122
4.7.3 Selekcija mutanata.....	123
4.7.4 Produkcija celulaznog kompleksa enzima gajenjem mutanata na slami kao supstratu.....	123
4.8 Kontrola produkcije enzima celulaznog kompleksa enzima izolata <i>T. guizhouensi</i>.....	123
4.8.1 PCR verifikacija <i>xyl1</i> i <i>lae1</i> gena u izolatima TH2 i TH6.....	123
4.8.2 Produkcija celulaznih enzima na mikrokristalnoj celulozi.....	125
4.8.3 Priprema rastvora spora.....	126
4.8.4 Određivanje biomase.....	126
4.8.5 Ekstrakcija RNA molekula i sinteza cDNA.....	127
4.8.6 qPCR analiza <i>xyl1</i> , <i>lae1</i> i <i>cbh1</i>	127
5. Literatura.....	129

Lista skraćenica

MO- mikroorganizam
CMC- karboski metil celuloza (*eng* Carboxymethyl-cellulase)
HEC- hidoksietil celuloza
MC- mikrokristalna celuloza
MUC- 4-metilumeberilferil- β -D-celobiozid
*p*NPC- *p*-nitrophenyl- β -D-celobiozid
*p*NPG- *p*-nitrophenyl- β -D-glukozid
BSA- goveđi serum albumin (*eng* bovine serum albumine)
AA-akrilamid
CBB - Coomassie Brilliant Blue
IEF- izoelektrično fokusiranje
PDA- *eng* potato dextrose agar
FT- fermentaciona tečnost (sirovi ekstrakt)
SSF- *eng* solid –state fermentation (fermentacija na čvrstoj podlozi)
SmF- *eng* submerge fermentation (tečna fermentacija)
AFEX- ammonia fiber explosion-AFEX
STEX- steam explosion
RŠ- redukujući šećeri
DP- stepen polimerizacije
HPLC- *eng* high-performance liquid chromatography
TLC- thin layer chromatography
FPU- filter papir esej (*eng* Filter paper unit)
CAZyme- ugljeno-hidrat aktivni enzimi (*eng* Carbohydrate-Active enZymes)
GH- glikozid-hidrolaze
GT- glikozid-transferaze
PL- polisaharid liaze
CE- ugljeno-hidrat esterase
CBM– celulozni vezujući modul (*eng* cellulose binding modul)
EG- endoglukanaze
CMCase- karboski metil celulaze

CBH- celobiohidrolaze

BG- β -glukozidaze

XYR1- ksilanazni regulatorni protein 1

ACE2- aktivator celulazne ekspresije 2

HAP2/3/5- *eng* heme activator protein complex 2/3/5

ACE1- aktivator celulazne ekspresije 1

LAE1- *S*-adenozilmetionin-zavisna metiltransferaza

CRE1 and 2-*eng* carbon catabolic respression 1 and 2

(ugljenik katabolički represor 1 i 2)

CCR- *eng* Carbon Catabolic respression (*Ugljenik katabolička represija*)

ACE3- aktivator celulazne ekspresije 3 (gen *ace3*)

PCR- *eng* polymerase chain reaction

qPCR- *eng* Real-Time Polymerase chain reaction

CTAB- cetiltrimetilamonium bromid

EDTA -Etilendiamintetraacetat

TE- Tris-EDTA pufer

TBE- Tris-boratni EDTA pufer

1. Uvod

Proces recikliranja celuloze, najzastupljenijeg ugljenog-hidrata u biljkama se odvija pod dejstvom mikroorganizama (MO). MO uključuju različite strategije i različite enzime kojima razgrađuju biljnu biomasu. U zavisnosti od tipa podloge MO produkuju različite enzimске koktele koji obuhvataju mešavinu celulaza, hemicelulaza, pektinaza, ligninaza i drugih proteina. Kompletan kompleks deluje sinhronizovano i sinergistički u postupku razgradnje lignocelulozne biomase [1]. S obzirom na to da se ovi enzimi mogu primeniti u procesu dobijanja biogoriva iz biomase, velika je potražnja za efikasnim enzimskim koktelima koji bi omogućili smanjenje troškova proizvodnje etanola od lignoceluloznog materijala [2]. Celulazni kompleks enzima predstavlja jedan od glavnih predmeta istraživanja u nauci u cilju primene u dobijanju bioetanola. Kao izvor dobijanja celulaznog kompleksa enzima, centar interesovanja predstavljaju filamentozne gljive zbog sposobnosti da proizvode velike količine ekstracelularnih enzima. Filamentozne gljive su u današnje vreme glavni proizvođači celulozitičkih enzima koji se i komercijalno koriste. Vrste iz roda *Trichoderma* su najviše ispitivane i korišćene u industrijskoj proizvodnji usled njihove sposobnosti da sekretuju velike količine hidrolitičkih enzima [3–7].

Prvi korak u biotehnoškim procesima predstavlja pronalaženje potencijalnog celulozitičkog producera među izolatima gljiva. U naučnim istraživanjima opisan je veliki broj testova za skrining i selekciju izolata gljiva roda *Trichoderma* [8]. Međutim, ovi testovi zahtevaju skupe supstrate i toksične boje za bojenje supstrata i dugo traju, te je iz tog razloga neophodno razviti test koji će u najkraćem mogućem periodu dati reproduktivne i tačne rezultate uz ekonomski benefit.

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. Odabir supstrata i priprema samog supstrata za njihovu produkciju je limitirajući korak [9–11]. Lignocelulozna biomasa, sa visokim procentom polisaharida, jedan je 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 bioetanola [12,13]. Slama, kao jedan od najvećih poljoprivrednih otpada, godinama predstavlja temu i izazov u naučnim istraživanjima. Razlog je njena kompleksna struktura s obzirom na to

da je celuloza, inducer celulaza, nepristupačna usled prisustva mreže lignina oko nje. Iz tog razloga, pristupa se brojnim pretretmanima kako bi se „oslobodila“ celuloza i omogućila enzimsku indukciju i proizvodnja fermentabilnih šećera. Ovo predstavlja jedan od ključnih problema u industriji zato što su pretretmani veoma skupi i dugotrajni procesi. Pored toga, produkti nastali pretretmanima mogu imati inhibitorno dejstvo na rast gljiva i produkciju enzima [14,15]. Danas se još uvek traga za pronalaženjem idealnog pretremana i veliki broj israživanja je usmeren samo na rešavanju ovog problema. Jedan od idealnih načina bi bio iskorisljivost netretirane, sirove slame za gajenje i produkciju enzima.

Pored optimizacije uslova za produkciju celulaznih enzima, velika pažnja je usmerena i na analizi dobijene celulazne smeše. Razvijene su brojne spektrofotometrijske i zimogramske tehnike za njihovu analizu, ali veoma je teško napraviti razliku između njih, uzimajući u obzir sinergiju i kompeticiju njihovog dejstva [16–19]. Brza i pouzdana zimogramska tehnika, koja omogućava istovremenu detekciju sva tri enzima iz celulaznog kompleksa (endocelulaze, egzocelulaze i β -glukozidaze), bila bi idealno rešenje za praćenje i kontrolu njihove produkcije.

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 [20]. Međutim, nemogućnost kontrole mutacija na nivou DNA, kao i razumevanje procesa indukcije i sinteze ovih enzima danas se uveliko rešava metodama molekularne biologije. 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 [21]. Overekspresija transkripcionih aktivatora predstavlja jednu od potencijalnih metoda za povećanje celulazne produkcije [22].

U cilju rešavanja postojećih problema u produkciji celulaznog kompleksa enzima, njihove karakterizacije i razumevanja procesa produkcije postavljeni su sledeći ciljevi ovog rada:

- Prikupljanje i izolovanje sojeva gljiva roda *Trichoderma* iz prirode, potencijalnih celulaznih producera.

- Razvijanje testa za brzu selekciju celulaznih hiperprodukujućih izolata gljiva iz roda *Trichoderma*.
- Identifikacija izolata *Trichoderma* spp. koji su ocenjeni kao dobri produceri celulaza.
- Optimizacija uslova za produkciju celulaznog kompleksa enzima upotrebom sirove, netretirane slame kao supstrata u uslovima tečne fermentacije.
- Upotreba iskorišćenog komposta šampinjona kao supstrata za produkciju celulaza.
- Razvijanje zimograma za simultanu detekciju celulaznog kompleksa enzima.
- Poboljšanje produkcije celulaza metodama klasične mutageneze.
- Analiza, na nivou transkripcije, ekspresije gena *xyl1* i *lae1*, koji kodiraju za transkripcione aktivatore celulaznog kompleksa enzima, kao kontrola produkcije.

2. Opšti deo

2.1 Gljive kao produceri enzima

Biotehnologija je tehnologija koja koristi mikroorganizme, njihove produkte ili ćelije u industrijskim procesima za proizvodnju komercijalnih proizvoda [23]. Od mikroorganizama koji se koriste u biotehnologiji filamentozne gljive predstavljaju veliku i značajnu grupu [24].

Eksploatacija filamentoznih gljiva, kao domaćina za proizvodnju industrijskih enzima, organskih kiselina, antibiotika i mnogih drugih proizvoda je razvijena zahvaljujući osobinama koje poseduju [24]. Prva među njima je sposobnost da ekspimiraju i sekretuju velike količine proteina [25]. Gljive iz roda *Aspergillus* se najviše koriste u produkciji industrijskih enzima zato što produkuju najveću količinu hidrolitičkih enzima, pre svega amilaza i proteza, zatim produkuju i glukozo-oksidade, katalaze, pektinaze, lipaze, fitaze i ksilanaze koje se koriste u industriji hrane, tekstilnoj i papirnoj industriji [26,27]. Gljive iz roda *Trichoderma* su najviše poznate po produkciji celulaza, enzimima koji razgrađuju celulozu do monosaharida. Primena celulaza je u proizvodnji bioetanola treće generacije (iz lignocelulolitičkog materijala) što je još uvek predmet istraživanja. Istovremeno, celulaze nalaze primenu i u papirnoj, tekstilnoj i hemijskoj industriji. Razumevanje metabolitičkog sistema gljiva roda *Trichoderma* i manipulacija na nivou DNA, u poslednje dve decenije postali su glavni predmeti izučavanja u nauci [3,6,28]. Genska manipulacija na filamentoznim gljivama je olakšana u odnosu na bakterije zato što one poseduju specijalnu post-translacionu modifikacionu mašineriju koja omogućava glikozilaciju i pravilno uvijanje proteina što garantuje njegovu funkcionalnost. Veliki broj vrsta filamentoznih gljiva je „Food and Drug Administration“ (FDA) odobrio kao „Generally Recognized As Safe“ (GRAS) što je uslov za njihovo korišćenje u industriji [29,30].

Manipulacija filamentoznim gljivama je jednostavna i čini biotehnoške procese ekonomičnim što dodatno doprinosi povećanju baš njihove upotrebe u industrijskim biotehnoškim procesima [31].

2.1.1 Gljive roda *Trichoderma*

Vrste roda *Trichoderma* pripadaju grupi filamentoznih askomiceta koje se u prirodi nalaze kao saprobne gljive. Oportunistički potencijal i prilagodljivost različitim ekosistemima se ogleda u raznolikim staništima sa kojih se mogu izlovati: zemljište, kore drveća, sa drugih gljiva, koreni biljaka i mnogim drugim podlogama [32–34]. Gljive roda *Trichoderma* zbog svojih osobina su korisne čoveku tako što su neke od njih dobri biološki agensi te se koriste u biokontroli patogena biljaka tokom njihovog gajenja, dok su druge, među kojima je najpoznatija *Trichoderma reesei*, poznati biotehnološki sistemi koji se koriste u produkciji celulazanih enzima i kao model za proučavanje produkcije proteina [6,35].

Klasifikacija roda *Trichoderma*:

Carstvo-Fungi

Podrazdeo-Ascomycota

Pod-tip-Pezizomycotina

Klasa-Sordariomycetes

Red-Hypocreales

Familija-Hypocreaceae

Rod-*Trichoderma*

Vrste - 100 filogenetskih vrsta je do sada ukupno identifikovano [36,37].

2.1.2 Istorijat gljiva roda *Trichoderma*

Rod *Trichoderma* je prvi put pronašao i opisao Person 1794. godine i tada je obuhvatao četiri vrste koje su sakupljene u Nemačkoj [38]. Od ovih taksonomskih jedinica jedino jedna vrsta, *Trichoderma viride*, je ostala u rodu *Trichoderma*. Tulasne i Tulasneza su 1865. godine definisali da je *T. viride* aseksualni stadijum gljive *Hypocrea rufa* [39]. Nakon mnogo ispitivanja ova činjenica se i danas zadržala, što njihov pronalazak čini važnim u taksonomiji gljiva. Do 1939. godine „koncept jedne vrste“ koji je formuliso Bisbi se nije širio i samo je nekoliko vrsta dodato [40]. Nove vrste su ispitane 1957. godine kada je Joan Dinglej sakupio i analizirao uzorke na Novom Zelandu. On je izolovao askospore *Hypocrea* kao čiste kulture i opisao je deset vrsta. Međutim, svi su prepoznati kao anamorfi soja *T. viride* [41]. Od 1940. usled morfološke

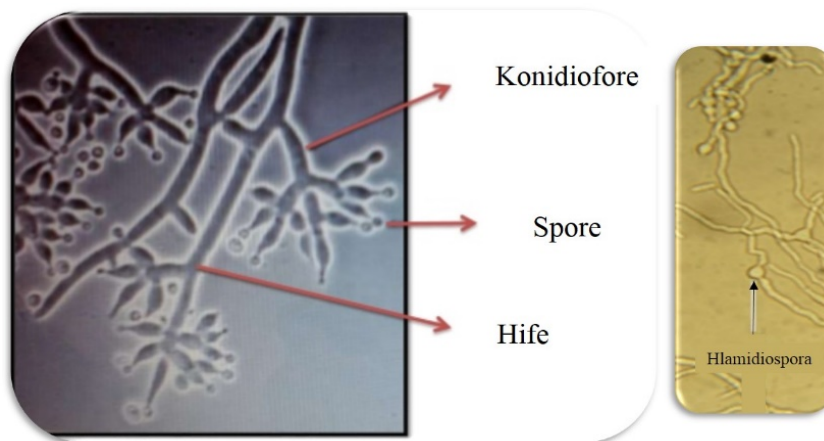
sličnosti između izolovanih vrsta vladalo je verovanje da svi celulolitički aktivni sojevi potiču od soja *T. viride* koji je izolovan tokom Drugog Svetskog rata kao izolat Qm6a [42]. Danas je poznato da je to jedna veoma retka vrsta (Kubicek i Samuel, neobjavljeni podaci) što govori da je u tom periodu usled nedostatka identifikacionih metoda dolazilo do pogrešne identifikacije vrsta. Kasnije, izolat Qm6a je prepoznat kao posebna vrsta i nazvan po njegovom pronalazaču Elwyn T. Reese [42] kao *Trichoderma reesei*. Novu klasifikaciju i reimenovanje, do tada pronađenih, *Trichoderma* dao je Simonsi 1977. godine [43]. Razvojem molekularno bioloških metoda, na osnovu DNA sekvenci soj je identifikovan i poznat kao *T. reesei*. Rifai je 1969. godine publikovao revolucionarnu monografiju *Trichoderma*, gde je pronašao i identifikovao devet „zbirnih“ vrsta koje su veoma blisko povezane u taksonomskom smislu. Potvrdio je da i svaka zbirna vrsta može da obuhvata dve ili više nerazjašnjenjih (zagonetnih) vrsta, što je omogućilo da njegov rad ne bude osporavan u narednih 15 godina [44]. U periodu od 1972. do 1989. godine publikovano je nekoliko radova koji su opisivali životni ciklus mnogih vrsta *Hypocrea* (izolovanih iz Japana i Južne Amerike) i predložena je podela roda na osnovu anatomije i anamorfnе morfologije [45]. Međutim, mnoge od ovih vrsta nisu sačuvane, uzorci nisu bili dostupni i nije se mogao nastaviti rad sa njima. Ovo je bio razlog zašto rodu *Trichoderma* nisu dodate još neke vrste. Jon Biset je 1984. godine grupisao Rifaijevih devet zbirnih vrsta u četiri grupe koje uključuju *Longibrachiatum*, *Pachybasium*, *Trichoderma* i *Hypocreanum*, unutar kojih je napravio razliku između vrsta na osnovu morfolokih osobina [46–50].

Nova paradigma u sistematici gljiva je započeta još 1990. godine razvojem molekularno bioloških metoda za identifikaciju koje se zasnivaju na analizi DNA sekvencija [51]. Razvojem ovih metoda tokom devedesetih godina i kasnije došlo se do novih saznanja u identifikovanju vrsta roda *Trichoderma* i njihove filogenije [36,52–57].

Najpoznatije vrste među njima, koje su ujedno i najviše ispitivane su *T. reesei* koja je interesantna zbog produkcije industrijskih enzima i rekombinantnih proteina, dok su druge *T. harzianum*, *T. viride*, *T. atroviride* i *T. asperellum* poznate kao agensi biološke kontrole fitopatogenih gljiva i kao proizvođači antibiotika. S druge strane, *T. longibrachiatum* je najveću pažnju zaokupirala u oblasti medicine, s obzirom da je oportunistički patogen imunodeficientnih sisara uključujući i ljude [50,58,59].

2.1.3 Morfološke karakteristike gljiva roda *Trichoderma*

U početnim stadijumima rasta kolonije gljiva roda *Trichoderma* su kremaste boje, ali usled sporulacije postaju zelene, žute ili bele boje. Građa tipične kolonije *Trichoderma* je prikazana na slici 1. Osnovna gradivna jedinica gljiva roda *Trichoderma*, koja predstavlja razvojnu jedinicu micelijuma, kao i svih filamentoznih gljiva, je hifa. Specijalizovane hife iz kojih nastaju spore se nazivaju konidiofore koje se granaju i veoma ih je teško definisati i izmeriti usled formiranja kompaktne strukture u različitim koncentričnim krugovima. Glavne grane konidiofora, koje su najduže od vrha, proizvode bočne grane koje mogu dodatno da se granaju. Bočne grane nastaju na ili blizu 90° u odnosu na glavnu granu i njihova veličina je od 5 do 10 μm. Tipične *Trichoderma* konidiofore sa sparenim granama su piramidalnog oblika, što je prikazano na slici 1. Glavne grane, u zavisnosti od vrsti roda *Trichoderma*, mogu da se završavaju dugim, jednostavnim ili razgranatim, ravnim ili krivudavim septama ili sporama. Fijalide, koje predstavljaju prvi inicijalni razvoj konidija u apikalnom (gornjem) smeru, mogu imati različit položaj u odnosu na glavnu granu. Obično su proširene u sredini i mogu biti cilindrične ili sub-globusnog oblika. Takođe, mogu biti gusto grupisane na glavnoj grani ili pojedinačne kao što je slučaj kod *T. longibrachiatum*.



Slika 1. Morfologija *Trichoderma harzianum* nakon gajenja u tečnom medijumu. Micelium sa pločice krompirovog dektroznog agara, levo (preuzeto i modifikovano [60]; Micelijum iz tečnog medijuma sladnog ekstrakta, desno

Gljive roda *Trichoderma* produkuju spore (kao vid aseksualnog razmnožavanja) i one su uglavnom jednoćelijske ili višećelijske, i nalaze se na krajevima ili unutar hifa. Spore se formiraju u uslovima koji nisu povoljni za rast (minimalni metabolički uslovi,

mala količina vode i drugi) [61–65]. Spore mogu biti elipsoidne ili okrugle, slika 1. Veličina im se uglavnom kreće od 3 do 5 μm i nalaze se na fialidama. One su uglavnom glatke, hidrofobne (suve) i mogu biti zelene ili žute boje (npr. *T. virens*, *T. flavofuscum*). Kada se spore ponovo vrata u uslove pogodne za rast (hranljivi medijumi) procesom germinacije od spora se formiraju hife i ostali stadijumi morfogeneze gljiva [66]. Kao rezultat deljenja ili formiranja konidija kod nekih vrsta roda *Trichoderma* formiraju se hlamidiospore [61–64]. Hlamidiospore su spore u mirovanju sa produženim vremenom potrebnim za preživljavanje nepovoljnih uslova sredine. Formiraju se veoma brzo i imaju zadebljane ćelijske zidove koji su bogati lipidima. Hlamidiosporama nedostaje mehanizam za oslobađanje od hife zato što nisu diferencirane membranom kao spore. Njihov biološki značaj se ogleda u tome što one predstavljaju rezistentnu strukturu koja se stvara u limitirajućim ili uslovima koji inhibiraju sintezu makromolekula neophodnih za rast gljiva [67]. Kada se ponovo nađe u povoljnim uslovima za rast iz hlamidiospora se razvija nova hifa [68].

Optimalna temperatura rasta je od 25-30°C dok je optimalan pH za rast i germinaciju od 3,5-5,6 [69]. U zavisnosti od medijuma, formiraju različite kolonije, a spore se formiraju u toku jedne nedelje. Neke vrste mogu da sekretuju žuti pigment prilikom gajenja na krompirovom dekstrozom agaru (*eng.* potato dextrose agar – PDA), dok je za druge vrste karakterističan miris kokosa.

U cilju preživljavanja u ekosistemu gljive iz roda *Trichoderma* ekskretuju veliki broj enzima (celulaze, esteraze, proteaze, hitinaze, N-acetil- β -glukozaminidaze) i sekundarnih metabolita (poliketidea, pirona, terpena) [70]. Upravo iz ovih razloga gljive roda *Trichoderma* nalaze veliku primenu u biotehnologiji, kao enzimski produceri, agensi u bioremedijaciji i kontroli štetnih mikroba.

Vrsta *Trichoderma reesei* je najviše ispitivana kao dobar celulazni producer. *T. reesei* je originalno izolovana kao *T. viride* tokom drugog svetskog rata na Gvadalkanalskom ostrvu (Solomonova ostrva) kao uzročnik oštećenja vojnih šatora, zaštitinika i odeće napravljene od pamuka [42]. To što je prvobitno identifikovan kao *T. viride* ne smatra se greškom, jer je u to vreme taksonomija gljiva bila slabo razvijena. S obzirom na to da do tada biotehnologija nije puno pažnje obraćala na taksnomiju, svi radovi koji su publikovani do kasnih 70-ih godina imenuju ovaj soj kao *T. viride*. Nađeno je da ovaj mikroorganizam degradira pamuk pomoću ekstracelularnih enzima

koji razgrađuju celulozu što predstavlja pionirske radove na gljivama iz roda *Trichoderma* i celulazama (33). Prvi radovi su obuhvatili skrining više od 14000 vrsta gljiva na produkciju celulaza i pronađeno je da originalni soj „*T. viride*” izolat Qm6a zaista najbolji producer [42]. Usledila su istraživanja na poboljšanju produkcije celulaza mutagenезom i optimizaciji uslova fermentacije za produkciju celulaza, koja su u narednih 10 godina dovela do produkcije više od 10 g/L ekstracelularnih celulaza [42]. Selektovan je mutant RUT-C30 koji produkuje više od 30 g/L ekstracelularnih proteina u uslovima industrijskih fermentacija, sa sprečenom kataboličkom represijom [71].

Sledeća promena u imenu „izolata Qm6a” se desila kada je Samuels identifikovao kao aseksualnu formu („anamorf”) veoma dobro poznate i rasprostranjene saprobe i seksualno reprodukujuće aksomicete *Hypocrea jecorina* [51,72]. Pravila botaničke nomenklature, koja su tada korišćena za nazive gljiva, su diktirala da se koriste imena seksualnih formi (ukoliko su poznati). Zbog toga su mnogi istraživači koristili ime *H. jecorina* pre nego *T. reesei*. Tokom vremena bilo je mnogo napora da se izmene pravila i da se ova gljiva reimenuje u *T. reesei*.

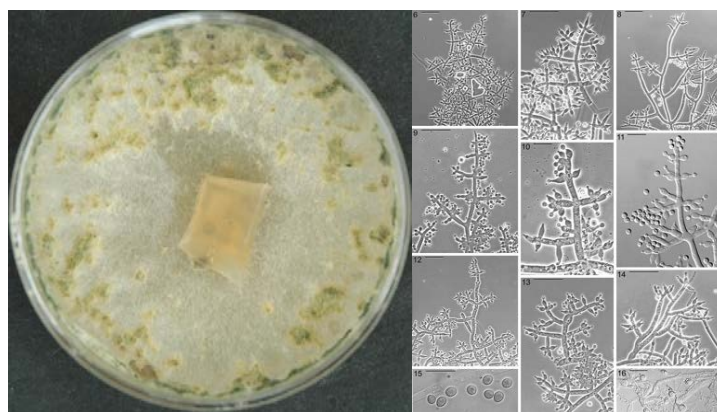
Usled otkrića da je ovaj soj *T. reesei* dobar producer celulaznih enzima on se koristio kao industrijski model za ispitivanje regulacije i biohemijske degradacije celuloznih materijala. Međutim, pozicija *T. reesei* kao izuzetno dobrog producera celulaza je u skorije vreme poljuljana novim rezultatima istraživanja. Najčešći argument se bazira na pronalaženju da u sekvenciranom genomu *T. reesei* se nalazi vrlo mali broj gena koji kodiraju celulaze i hemicelulaze (osam endoglukanaza i dve celobiohidrolaze) [73] kao i to da veliki broj drugih gljiva takođe produkuje celulaze. U novije vreme vrsta *Trichoderma harzianum* je sve cenjenija kao producer celulaza i zato je postala predmet velikog broja naučnih studija na ovu temu [74,75].

2.1.4 *Trichoderma harzianum*

Aseksualna (anamorfna) *T. harzianum* je najpoznatija vrsta roda *Trichoderma*. Poznata je zbog svoje uloge kao agensa u biokontroli patogena i s tim u vezi je glavna komponenta mnogih biofungicidnih agenasa. Iako biologija *T. harzianum* nije detaljno opisana, njena taksonomija je veoma detaljno studirana [36,56,76–78]. Ona je originalno definisana kao „zbirna vrsta” odnosno skup taksonomski veoma bliskih vrsta (nerazjašnjenih) sve dok nije pokazano da se sastoji od sedam genetičkih sojeva koji

ispunjavaju bazične kriterijume filogenetskih vrsta unutar velikih morfoloških vrsta [56]. Kompleksnost ove vrste se ogleda i u tome da je *Hypocrea lixii* telemorf (seksualna faza) *T. harzianum* verovatno nastao genetičkom rekombinacijom u prirodi. Uprkos detekciji genetičkog polimorfizma autori predlažu postojanje posebnog kompleksa *H.lixii/T.harzianum* vrsta [79].

T. harzianum Rifai, prikazana na slici 2, je poznata kao kosmopolitna i opšte prisutna vrsta koja se može naći na različitim podlogama kao što su zemljište, koreni biljaka, gajilišta pečuraka i nedavno je jedna od najčešće izolovanih endofita sa tropskog drveća [34,56,80–82]. Iako postoje pojedini podaci da je *T. harzianum* saprofitni organizam biljaka, novija istraživanja pokazuju i sugerišu da vrste u ovom kompleksu su ili mikoparaziti ili su biokontrolni agensi [55,83].



Slika 2. *Trichoderma harzianum*: rast na PDA podlozi (levo) i mikrografija različitih sojeva (preuzeto iz [84]) iz kompleksa *T. harzianum* (desno)

T. harzianum je odoleo taksonomskoj reviziji uprkos filogenetskoj raznovrsnosti unutar vrste [79,85]. Morfologija pojedinačnih vrsta u *T. harzianum* kompleksima je visoko konzervirana [84]. Konidije i konidiofore su prisutne u celom rodu, dok su varijacije u karakteristikama vidljivog fenotipa unutar grupa ekstremno male. *T. harzianum* je primenjivana u poljoprivredi za tretiranje zagađenih zemljišta i glavni je sastojak nekoliko komercijalno dostupnih bioloških preparata koji se koriste za unapređenje rasta i proizvodnje biljaka (78, 79).

T. harzianum vrste su otvorile i novo poglavlje u biotehnologiji. Ranije se *T. harzianum* veoma retko koristila za produkciju enzima. Međutim, Castro je 2010. godine ispitujući enzimske potencijale filamentoznih gljiva, naročito celulazne enzime, ustanovio da *T. harzianum* sojevi predstavljaju veliki celulolitički potencijal usled sposobnosti za istovremenu produkciju enzima kao što su β -glukozidaza i endocelulaza

za razliku od industrijski važnih sojeva *T. reesei* RUT C30 i *Aspergillus* sp. [86–88]. Takođe je nađeno da produkuju značajne količine lignifikujućih enzima tipa lakaze i lignin peroksidaze [89]. Mogućnost upotrebe ove zanimljive vrste u biotehnologiji danas je predmet velikog broja naučnih studija, a zasnovana je na značajnoj produkciji celulaza novo identifikovanih i pronađenih izolata *T. harzianum*. U poređenju sa celulaznim hiperprodukujućim izolatom *T. reesei* C30 u uslovima tečne fermentacije na velikoj skali, upotrebom istog izvora ugljenika, *T. harzianum* izolati produkuju do 10 puta veće količine celulaza [74,87].

2.1.5 Izolovanje potencijalnih celulolitičkih producera iz prirode

Izolovanje potencijalnih celulolitičkih sojeva iz prirode predstavlja prvi korak u razvoju industrijskih procesa za produkciju ovih enzima. Značaj u potražnji i izolovanju je u tome što novi MO predstavljaju izvor novih proizvoda [90,91] i mogu poslužiti kao model za razumevanje strukture i funkcije koji će kasnije omogućiti unapređenje genetskog i proteinskog inženjeringa [92]. Obećavajući trend za obogaćivanje kultura je usmeren ka ispitivanjima novih staništa u životnoj sredini. U poređenju sa zemljištem, prirodni izvori kao što su industrijski i poljoprivredni otpadni materijali ili gajilišta biljaka i pečuraka postaju sve više potencijalna mesta za izolovanje novih celulolitički aktivnih gljiva [93–99]. Ova mesta su prirodna staništa za veliki broj MO. Pretpostavlja se da je manje od 1% MO na zemlji identifikovano tako da veoma širok dijapazon potencijalno korisnih MO još uvek čeka da bude pronađeno i okarakterisano [90].

Po izolovanju gljive potencijalnog producera iz prirode sledi njihova identifikacija i karakterizacija u smislu nivoa produkcije celulaza koji mogu da postignu. Tek pravilnom identifikacijom sojeva gljiva roda *Trichoderma* je moguće diskutovati o njihovim osobinama, porediti ih po nivou produkcije enzima koji postižu u zavisnosti od drugih produkcionih uslova.

2.1.6 Identifikacija gljiva *Trichoderma* spp.

Ranije su izolati gljiva roda *Trichoderma* identifikovani na osnovu morfoloških karakteristika [100], koja je veoma teška i zahteva posebnu stručnost i često su dobijani pogrešni rezultati. Primena i razvoj biohemijskih (fizioloških) i molekularnih tehnika su doprineli tačnijoj identifikaciji vrsta roda *Trichoderma* [53,54,101,102].

Uvođenje molekularnih metoda za ispitivanje taksonomije gljiva, sredinom devedesitih godina, navelo je istraživače da ponovno preispitaju taksonomiju *Trichoderma* koja se do tada bazirala isključivo na morfološkoj identifikaciji. Pokazano je da skoro polovina *Trichoderma* spp., koji su prethodno morfološki identifikovani i sačuvani u kolekciji kultura se nalaze pod pogrešnim imenom [52]. Pogrešno imenovanje, neopuzdanost i problematičnost fenotipske identifikacije gljiva roda *Trichoderma* potiče od teškog razlikovanja strukturnih elementa i različitosti između sojeva [103,104]. U pokušajima da se prevaziđu ova ograničenja mnoga istraživanja su uključivala i dodatne karakterizacije kao što su analize produkovanih sekundarnih metabolita i biohemijske metode [57,105,106].

2.1.6.1 Biohemijske metode za identifikaciju gljiva roda *Trichoderma*

Biohemijske metode, koje su se koristile za identifikaciju, se baziraju na analizi izoenzimskog profila glukoze-6-fosfat dehidrogenaze, glukoze-6-fosfat izomeraze, 6-fosfoglukonat dehidrogenaze, peptidaze A, B i D i fosfoglukomutaznih enzima [107]. Ova metoda je našla veliku primenu u identifikaciji kliničkih *Trichoderma* izolata [58]. Druga potencijalna biohemijska tehnika za identifikaciju koristi intaktnu-ćelijsku masenu spektrometriju za direktnu identifikaciju hidrofobina u micelijumu i sporama u 32 soja koji predstavljaju 29 vrsta iz roda *Hypocrea/Trichoderma* [108]. Razlog za analizu hidrofobina se ogleda u tome što je primećeno je da su hidrofobinski obrasci karakteristični za vrste i sojeve [109].

2.1.6.2 Identifikacija vrsta roda *Trichoderma* tehnikama molekularne biologije

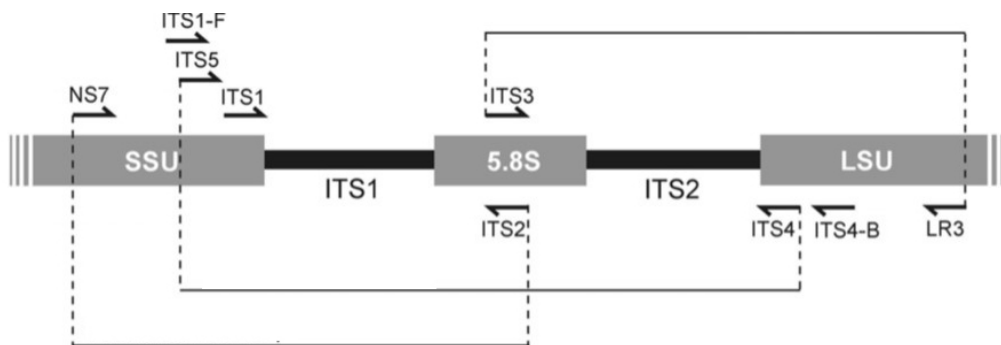
Odnosi između vrsta i njihovih članova mogu biti jedino razjašnjeni filogenetskom analizom koja u osnovi izučava odnose između gena ili genskih fragmenata. Za dobijanje molekularnih podataka koriste se molekularne metode koje se baziraju na karakterizaciji polimorfizma nukleinskih kiselina koji je praćen neograničenim brojem potencijalnih filogenetskih markera. Filogenetski markeri predstavljaju delove kodirajućeg ili ne-kodirajućeg dela molekula DNA, za koji je poznato da ima ili nema varijacije unutar odgovarajuće vrste i čije su sekvencije dostupne za većinu ili sve vrste roda. S tim u vezi filogenetski marker treba da omogućava identifikaciju celog roda na nivou vrste [110–113].

Danas, pored filogenetske analize za identifikaciju vrsta se sve više primenjuje i jedna novija metoda poznata kao „DNA barcoding“ ili detekcija dijagnostikovanog kratkog DNA fragmenta/fragmenata [53,114]. Ova metoda je privukla pažnju kao obećavajuća metoda za identifikaciju već poznatih i/ili za otkrivanje još nepoznatih vrsta svih živih organizama. Ova metoda u osnovi ima za cilj da se pronađu tzv. „univerzalne šifre“ odnosno nekoliko nukleotida koji nedvosmisleno odgovaraju posebnoj vrsti. „DNA barcoding“ ima prednost u odnosu na filogenetsku analizu i analizu sličnosti sekvenci (NCBI blast) iz razloga jer jednostavnija za upotrebu i ne zahteva upoređivanje genetičke udaljenosti od sledećeg rođaka. S obzirom da je za filogenetsku analizu veoma često potrebno analizirati više filogenetskih markera, upotrebom „DNA barcodinga“ dovoljan je samo jedan filogenetski marker čime se smanjuju troškovi molekularne identifikacije. Međutim, nedostatak ove metode je što zahteva prikupljane svih objavljenih i sakupljenih sekvencija i što su te informacije dostupne u samo nekoliko specijalizovanih baza podataka kao što je na primer TrichOkey [53,54,114,115].

Sistematika gljiva je od kraja devedesetih godina prošlog veka, kao standardnu tehniku prihvatila upravno analizu DNA sekvencija [72,110,116,117]. Kao rezultat došlo je do razvoja veoma pouzdane identifikacije vrsti *Trichoderma* i veoma brzog povećanja broja vrsta [34,52,52,118]. Prvih sto molekularno identifikovanih i karakterizovanih vrsta *Trichoderma* je opisano 2006. godine [36]. Uvođenje molekularnih tehnika za identifikaciju omogućilo je da *Trichoderma* i *Hypocrea*, prepoznaju kao filogenetski različite, predstavljaju seksualnu i aseksualnu formu jedne holomorfne vrste [119].

Jednu od ciljnih grupa gena za identifikaciju predstavljaju oni koji kodiraju ribozomalnu RNA i koji su prisutni u svim organizmima u velikom broju kopija. Nuklearna ribozomalna DNA kod gljiva se sastoji iz tri gena koji kodiraju 28S (veliku subjedinicu-large subunit-LSU), 18S (malu subjedinicu-small subunit-SSU) i 5.8S subjedinice. Ovi geni su odvojeni internalnim transkribujućim spejserima (ITS1 i ITS2), što je prikazano na slici 3. Ova jedinica se ponavlja više od 250 puta što ovaj region čini dobrim kandidatom za sekvenciranje. Rezultati sekvenciranja ITS regiona pokazuju da on sadrži od 450-700 bp. Njegova važnost za filogeniju se ogleda u tome što sadrži konzervativni deo i visoko varijabilne delove sekvencije [53]. Prve studije za

identifikaciju gljiva roda *Trichoderma* su sprovedene i bile su zasnovane na sekvencijama internalnog transkripcionog spejsera (ITS) [112,117,120].



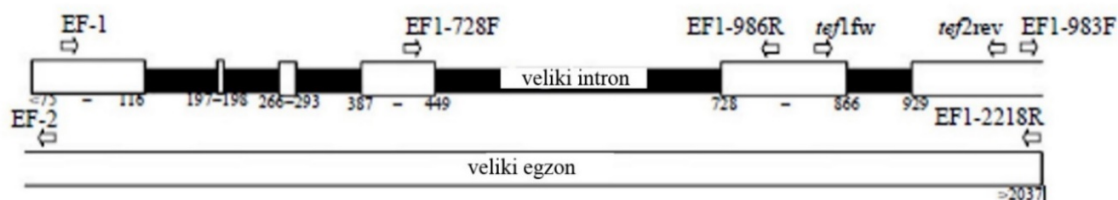
Slika 3. Relativni položaj prajmera i dizajn delova ITS regiona (preuzeto iz [121])

Najčešće upotrebljavani prajmeri za amplifikaciju ITS sekvencije su pronađeni još 1990 god. i prikazani su u tabeli 1 [110]. Mana identifikacije na nivou ITS sekvenci se ogleda u tome što ITS1 i ITS2 daju veoma skromno filogenetsko razdvajanje u poređenju sa drugim filogenetskim markerima (na primer *tef1*). Međutim, i pored toga, ITS region je veoma bitan u „DNA barcodingu“, zato što je primenljiv na veliki broj uzoraka (različite vrste gljiva), daje visoko PCR amplifikacionu tačnost (>90%) dok je verovatnoća tačne identifikacije oko 70% i više [122]. Takođe, danas je dostupno oko 39200 ITS sekvencija poreklom od gljiva što je veliko bogatstvo za identifikaciju i filogenetsku analizu gljiva [123,124].

Tabela 1. Sekvencije prajmera koji se koriste za ampifikaciju delova ili celokupnog ITS regiona gljiva [121]

<i>Prajmeri</i>	<i>Sekvencije prajmera</i>
<i>Forvard prajmeri</i>	
NS7	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC
ITS1-F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
ITS5	GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG
ITS1	TCCGTAGGTAGAACCTGCGG
ITS3	GCATCGATGCAAGAACGCAGC
<i>Reverzni prajmeri</i>	
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS4-B	CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG
LR3	CCGTGTTTCAAGACGGG

U cilju povećanja filogenetske rezolucije, odnosno poboljšanja razdvajanja na nivou vrsta, pored ITS1, 5,8S, i ITS2 koriste se i 18S i 28S rRNA, regioni koji kodiraju translacioni elongacioni faktor 1-alfa (*tef1*), endohitinaze (*echi42=chi18-5*) [125,126] *rpb2* [127], aktin (*act1*) i kalmodulin (*cal1*) [128,129]. Ovi regioni sadrže ili kodirajuće genomske fragmente ili delove sa intronima koji se koriste kao markeri za filogenetsku analizu. Brojne studije su pokazale da su introni u *tef1* genu veoma visoko konzervativni i zbog toga obezbeđuju jednu od najjačih filogenetskih razdvajanja unutar roda [129–131]. Iz tog razloga filogenetski markeri koji kodiraju *tef1* su sve više primenjivani i u identifikaciji *Trichoderma*. Filogenetski markeri ovog gena su dva introna: *tef1_int4* (dugačak intron); *tef1_int5* (kratki intron) i jedan egzon (*tef1_exon6*) što je prikazano na primeru *tef1* gena kod *T. reesei* na slici 4.



Slika 4. Šematska struktura *tef1* gena *T. reesei* i pozicija prajmera koji se koriste za amplifikaciju njegovih različitih delova u filogenetskoj analizi (preuzeto i modifikovano iz [52])

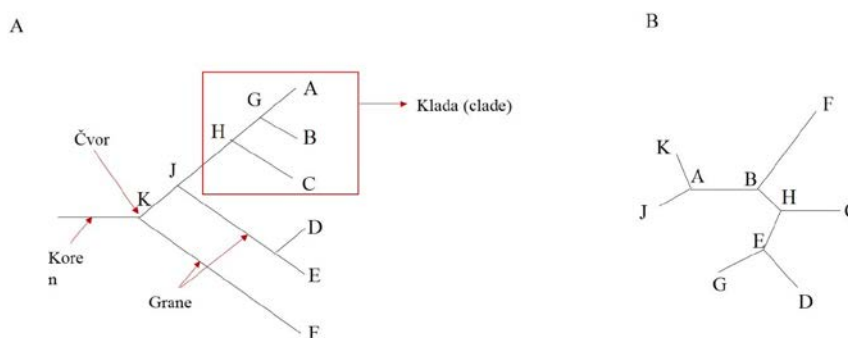
Najviše informacija i doslednih rezultata je dobijeno kombinovanjem filogenetskih markera i njihovom analizom [79,84,132]. Analizom dobijenih rezultata se dobija filogenetsko stablo.

2.1.6.2.1. Konstruisanje filogenetskog stabla

Zajedno sa sistematikom, koja se bavi organizacijom biološkog diverziteta i taksonomijom koja klasifikuje organizme, grupe i gene u odnosu na njihovu evolucionarnu istoriju i/ili sličnost, filogenetska analiza je vizuelno opisana kroz filogenetsko stablo [113,133]. Filogenetsko stablo je dobilo naziv po tome što podseća na strukturu drveta odnosno stabla (prikazano na slici 3A), a i termini koji se koriste za opisivanje njegove strukture takođe odgovaraju različitim delovima ovog drveta (koren, grane, čvor i list). Linije unutar stabla se nazivaju grane. Tačke sa kojima su grane povezane se nazivaju čvorovi. Spoljašnji čvorovi predstavljaju postojeće takse ili taksone (familije organizama ili individua od jedne vrste ili od različitih vrsta) koji se naziva operativna taksonomska jedinica (*eng.* operational taxonomic units – OTUs).

Unutrašnji čvorovi, se nazivaju hipotetičke taksonomske jedinice (*eng.* hypothetical taxonomic units- HTUs) koje pokazuju da su oni hipotetički preciji OTUs odnosno taksona. Grupa taksona, koja dele istu granu se zove klaster i označava da potiču od istog pretka (imaju monofiletičko poreklo), dok parafiletički organizmi ne mogu da formiraju klaster bez uključenja dodatnih sojeva i nemaju istog pretka. Grupa pretka zajedno sa svim potomcima je poznata kao klada (*eng.* clade). Cilj svake filogenetske analize je da se napravi stablo kod koga je svaki takson povezan sa drugim taksonom preko čvora. Ovakvo stablo se naziva „Bifurcating trees” i daje dosta informacija jer može da pokaže koji taksoni su usko povezani. Za razliku od njega, „Polychotomous trees”, kod koga više grana polazi od jednog čvora su obično manje informativni, jer oni pokazuju da su višestruki taksoni povezani, ali ne i kako [134,135].

Prilikom dizajniranja stabla u prvom koraku se dobija „neukorenjeno” filogenetsko stablo (unrooted tree – slika 5B) u kome su individualni taksoni pozicionirani jedni do drugih bez uključivanja direktnog evolucionarnog procesa. Kod ovog stabla ne postoji indikacija ko je zajednički predak za sve taksone. Da bi stablo bilo informativno, odnosno pokazivalo odnos predaka i taksona, neophodno je uraditi ukorenjenje stabla (*eng.* rooted) (slika 5A). Uslov da se „ukoreni” stablo je da jedan ili više taksona formiraju spoljne grupe (*eng.* outgroup rooting), odnosno da su oni daleko povezani sa ostalim, usko povezanim, taksonima. Ostatak taksona formira unutrašnje grupe (*eng.* ingroup). Korenski čvor je čvor koji pridružuje unutrašnje i spoljašnje grupe taksona i na taj način čini njihovog zajedničkog pretka [134].



Slika 5. Struktura A) „ukorenjenog” (*eng.* rooted) i B) „neukorenjenog” (*eng.* unrooted) filogenetskog stabla. Kod „ukorenjenog” filogenetskog stabla A, B, C, D, E i F su spoljašnji čvorovi ili taksoni ili OTUs dok su G, H, I, J, i K unutrašnji čvorovi ili HTU dok K predstavlja čvor korena. A, B, i C formiraju klaster i imaju zajedničkog pretka H sa kojim čine kladu. „Neukorenjeno” stablo nema čvor koren (preuzeto i modifikovano iz [134])

Današnji biodiverzitet je posledica različitih varijacija kao što su mutacije, duplikacije gena, rekombinacije i mnoge druge [136]. Filogenetske metode se baziraju na razmatranju sličnosti između gena (pretpostavljajući da su oni homologni, odnosno da imaju istog pretka) brojanjem identičnih nukleotida ili amino kiselina. Geni usko povezanih vrsta se razlikuju samo u malom broju tačkastih mutacija, dok se geni daleko povezanih vrsta razlikuju u velikom broju substitucija. S druge strane, konzervativni geni su slični kod različitih vrsta i to su geni koji nisu podlegli procesima mutacija tokom evolucije. Primeri takvih gena su geni koji kodiraju za aktivna mesta enzima [134–136]. Za filogenetsku analizu esencijalno je da se homologna mesta uporede jedna sa drugima. Homologe sekvence koje se ispituju se poravnavaju (alajnuju - eng. aligned) tako da homologna mesta formiraju kolone koje se zovu alajment (eng. alignment). Dobijanje ispravnog poravnavanja je lako za usko povezane vrste i može čak biti urađeno i ručno. Za daleko povezane vrste veoma je teško pronaći najbolje poravnavanje [134]. Alajmenti se obično prave i vizuelizuju specijanim programima koji imaju implementirane praktične algoritme kao što su Clustal W [137], MUSCLE [138], Mafft [139], T-Coffee [140] koji se nalaze u verzijama editora kao što su MEGA [141] SeaView [142], TreeView [143] i drugim. Dobijanje dobrog tzv. poravnavanja predstavlja ključni korak u konstrukciji filogenetskog stabla. Trenutno se informacije sekvenci skladište u NCBI bazi podataka (National Center for Biotechnology Information), NLM (National Library of Medicine), EMBL (European Molecular Biology Laboratory), DNA Data Base of Japan (DDJ). Traženje homolognih sekvenci, baziranih na rezultatima sličnosti, mogu biti urađene različitim putem u različitim bankama. Neke organizacije obezbeđuju servise preko svetske mreže kao što je na primer NCBI blast [144].

U zavisnosti od vrste podataka koje koriste, metode za konstrukciju filogenetskih stabala se mogu podeliti u grupe:

Distance methods - daljinske metode (Neighbour joining) je jedna od četiri osnovna pristupa za analizu alajnovanih sekvenci, i algoritmi u ovim metodama su sposobni da izračunaju udaljenost između parova. Ova analiza upoređuje alajnovane sekvence u vremenu i gradi bazu za sve sekvence parova. Prilikom svakog upoređivanja broj promena (bazne substitucije i insercije/delecije) se broji i predstavlja se kao proporcija celokupne dužine sekvence. Konačne procene razlika između svih mogućih parova

sekvenci su poznate kao udaljenost parova. Dobra strana ove metode je što je brza, ali je nedostatak što se ne mogu dobiti pouzdane procene za divergentne vrste. Programi koji sadrže ovaj algoritam su MEGA, PHYLIP i PAUP* [134,135,141,145,146].

Parsimony Methods (MP) - „škrte“ metode predstavlja drugi osnovni način da se konstruiše filogenetsko stablo od alajnovanih sekvenci. Cilj ove metode je da se identifikuju najmanje neophodne promene kako bi se objasnile razlike između posmatranih sekvenci koje filogenija zahteva. Prednost ove metode je što je dovoljno brza za analizu stotine sekvenci. Neodstatak ove metode je što daje loše rezultate u sličajevima velikih varijacija u dužini grana. Programi sa ovom implementiranom analizom su MEGA, PHYLIP i PAUP*[134,141,143,145,146] .

Maximum likelihood (ML) – metoda maksimalne verovatnoće obezbeđuje da se na određenom filogenetskom stablu prikaže mogući model evolucije datih sekvenci. Odlikuje se intenzivnom kompjuterizacijom kao i to da se u analizi razmatraju sva moguća filogenetska stabla. S obzirom na to da se može izabrati model evolucije, metoda može biti korisna za široko divergentne grupe. Prednost ove metode je što se mogu dobiti podaci o kompletnoj filogeniji u prikazanom modelu, dok je nedostatak što je spora. Kao i ostale metode, i ova metoda je implementirana u program MEGA, PHYLIP i PAUP [134,135,145,146].

Bayesian Approaches – Bejzianov pristup omogućava realizaciju složenih modela sekvenci evolucije tj. određivanje vremena divergencije i pronalaženje delova koji su važni u prirodnoj selekciji za detekciju rekombinantnih tačaka. Zasniva se na metodi maksimalne verovatnoće (ML), ali sadrži i „prethodnu verovatnoću“ koja predstavlja verovatnoću hipotetisanja u skladu sa prethodnim informacijama. Prednost je što ova metoda može biti brža u odnosu na ML. Mana je što prethodna distribucija parametara „prethodnu verovatnoću“ mora biti specijalizovana. Primer softwera koji sadrže ovaj program za ovu analizu je MrBayes [134,143,147,148].

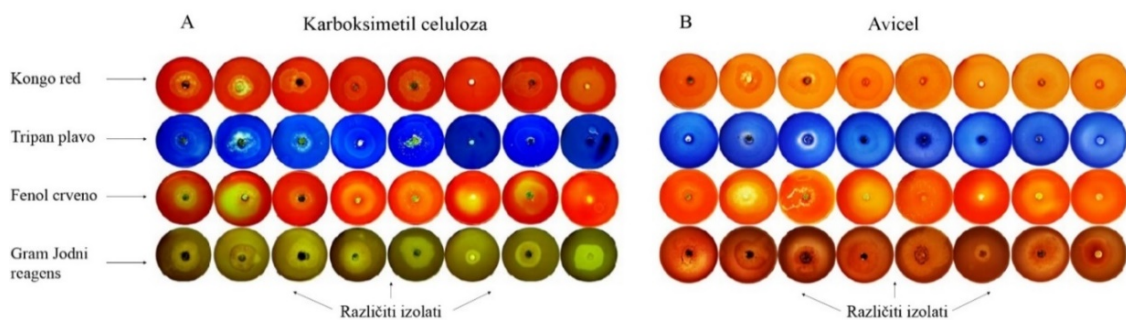
Izolovane sojeve gljiva *Trichoderma*, potencijalne producere celulaza, pored identifikacije do nivoa vrste treba okarakterisati u smislu potentnosti produkcije. U tu svrhu se koriste brzi testovi za skrining gljiva producera celulaza.

2.1.7 Testovi za skrining gljiva producera celulaza

Prvi korak u istraživanjima produkcije i poboljšanja uslova za produkciju enzima je selekcija sojeva gljiva koji proizvode celulazne enzime. Endocelulaza je marker enzim među celulaznim enzimima, koji se koristi za selekciju producera. S obzirom na to da je „glavni“ enzim u celulaznom kompleksu, i da je prvi koji učestvuje u hidrolizi celuloze proizilazi i razlog njegove upotrebe u ovim testovima. Takođe, ovome doprinosi i ekonomičnost za njegovu upotrebu u selekcionim testovima, s obzirom na to da je specifičan supstrat za endocelulazu karboksi metil celuloza (*eng carboxymethyl cellulose*- CMC) najjeftiniji u odnosu na specifične supstrate ostalih celulaza iz kompleksa. Iz ovih razloga najveći deo testova za selekciju sojeva gljiva se zasniva na detekciji endocelulaza [8,149].

S obzirom na to da su celulaze inducibilni enzimi neophodno je da testovi za brzi skrining celulolitički aktivnih gljiva poseduju inducibilne supstrate. Uobičajeno, testovi koji su široko primenjivani u istraživanjima obuhvataju rast MO na pločama agara sa hranljivim medijumom i supstratom za indukovanje produkcije celulaza. CMC ili mikrokristalna celuloza (MC) su najčešće korišćeni sintetički induceri za endocelulazu. Nakon određenog vremena rasta gljiva na agaru (između 48-96 h), proces detekcije celulolitički aktivnih sojeva obuhvata bojenje supstrata indikatorskim bojama. Najčešće korišćeni indikatori su: Kongo crveno, Ramazol Brilliant plava, Gramov jodni reagens, fenol crveno, Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250, Safranin i ostali. Nakon bojenja i obezbojavanja na mestima celulolitički aktivnih gljiva (oko njihovog micelijuma) detektuju se prosvetljene zone u odnosu na ostatak obojenog medijuma. Upoređivanjem veličina zona određuje se nivo produkcije endocelulaza [8,149–151].

Tipovi MO-a i faze njihovih rasta određuju osetljivost testova. Do sada ispitani i korišćeni testovi su pokazali da se nakon 48 h rasta na selekcionim medijumima dobijaju najjasnije zone [152]. Na osetljivost testa takođe utiču i vrste indikatora.



Slika 6. Izgled ploča agara u testovima skrininga izolata za produkciju celulaznih enzima. A) Izolati skriningovani upotrebom karboksi metil celuloze i B) Avicela, kao supstrata uz istovremeno testiranje indikatorskih boja (Kongo crveno, Tripan plavo, Fenol crveno i Gram jodni reagens) (preuzeto i modificirano iz [152])

U mnogim istraživanjima se najčešće za bojenje CMC-a koristi Kongo crveno [8,149,152]. Međutim, novije studije su pokazale da se najbolje bojenje i kontrast CMC medijuma dobija upotrebom Fenol crvenog (slika 1A). Upotrebom mikrokrystalne celuloze (Avicel), kao inducibilnog supstrata, najbolji rezultati su dobijeni upotrebom Gram jodnog reagensa [152]. Različiti tipovi bojenja CMC i Avicela su prikazani na slici 6.

Danas se još uvek traga za testovima koji će omogućiti bržu detekciju celuloitički aktivnih sojeva gljiva, koji će biti više pouzdani, ekološki primenljiviji i ekonomski više isplativiji. Poseban izazov je u skraćanju vremena kultivacije ispitivanih sojeva gljiva, a da se pri tome dobije dovoljno ekstracelularnih enzima da se mogu detektovati promene u medijumu.

2.2 Produkcija celulaza

Celulaze imaju široku primenu u hidrolizi celuloitičkog materijala, što ih čini veoma značajnim za naučna istraživanja. Usled sposobnosti da produkuju velike količine celulaza filamentozne gljive se najviše primenjuju. Gljive iz roda *Trichoderma* predstavljaju najviše eksploatisane filamentozne gljive u cilju produkcije celulaza u biotehnološkim procesima. Među njima, izolat *T. reesei* je najviše ispitivan i korišćen kao model sistem za ispitivanje i praćenje produkcije celulaza [35]. Poboljšani sojevi *T. reesei*, mutanti, dobijeni tehnikama klasične mutageneze, su veoma dobri produceri celulaza i proizvode ih i prodaje nekoliko kompanija: „Genencor-Danisco A/S-Dupont“, „Iogen Crop“, „Novozymes“, „Cellic“, „Roal“ i „Meiji Seika Kaisha Ltd“.

2.2.1 Celulaze

Celulaze su enzimski kompleks, koga čine endocelulaza, egzocelulaza i celobiazaza, koji razgrađuje β -1,4- glikozidne veze u molekulu celuloze što za rezultat ima dobijanje molekule glukoze i kratkih celodekstrina. Celulaze su inicijalno ispitivane u cilju razgradnje lignocelulozne biomase za dobijanje stočne hrane, u papirnoj, tekstilnoj, hemijskoj industriji i za dobijanje biogoriva [153–155]. Na osnovu klasifikacije International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) celulazni enzimi *Trichoderma* sp. pripadaju grupi hidrolaza i svrstani su u grupu EC 3. Opis vrsta celulaza sa EC brojevima, reakcijama i proizvodima hidrolize su prikazani u tabeli 2 [156].

Tabela 2. Klase celulaznog kompleksa enzima na osnovu IUBMB klasifikacije sa alternativnim imenima i reakcijama hidrolize (podaci preuzeti i modifikovani iz [156])

Vrsta celulaze	EC ime	EC klasifikacija	Alternativna imena	Reakcija hidrolize koju katalizuju	Proizvodi hidrolize
Endocelulaza	Celulaza	3.2.1.4	β -1,4-endocelulaza Endoglukanaza 1,4- β -endoglukanaza Karboksi metil celulaza (CMCaze); Endo-1,4- β -glukanaza	β -1,4- D- glikozidne veze u molekulima celuloze	oligosaharidi različitih dužina
Egzocelulaza	Celobiozo-1,4- β - celobiozidaza	3.2.1.91	Celobiohidrolaza Egzoglukanaza Egzocelobiohidrolaza β -1,4-celobiohidrolaza Celobiohidrolaza	β -1,4- D- glikozidne veze u molekulu celuloze i celotreoze	celobiozu sa redukujućeg i ne-redukujućeg kraja celuloze
β -glukozidaza	β -glukozidaza	3.2.1.21	Celobiazaza	β -1,4- D- glikozidne veze na krajevima β -D-glukozidnim ostacima	β -D-glukoze

Ugljeno-hidratni aktivni enzimi, ili CAZim (CAZyme-Carbohydrate-Active enZymes), obuhvataju enzime koji imaju ulogu u hidrolizi, modifikaciji ili razgradnji glikozidnih veza. Oni su kategorisani u različite familije u CAZim bazi podataka [157,158]. Ove kategorije obuhvataju: glikozid-hidrolaze (GH), glikozid-transferaze (GT), polisaharid liaze (PL)- i ugljeno-hidrat esterase (CE). U grupu CAZim spadaju i celulozni vezujući moduli (CBM – eng. cellulose binding module) koji su neophodni za adheziju enzima za ugljeno-hidratnu podlogu. Enzimi celulaznog kompleksa prikladaju

familiji glikozidaza koju kodira oko 200 gena. Najnovije oznake enzima (imena) u CAZim banci za enzime mogu se objasniti na primeru CEL7A gde je CEL – ime celulaza, 7 označava GH familiju i A označava da je prvi pristupio u familiji 7. U tabeli 3 su prikazana stara i nova imena svih celulaza [157].

Tabela 3. CAZim familija ugljeno-hidratnih aktivnih enzima okarakterisanih u *T.reesei*

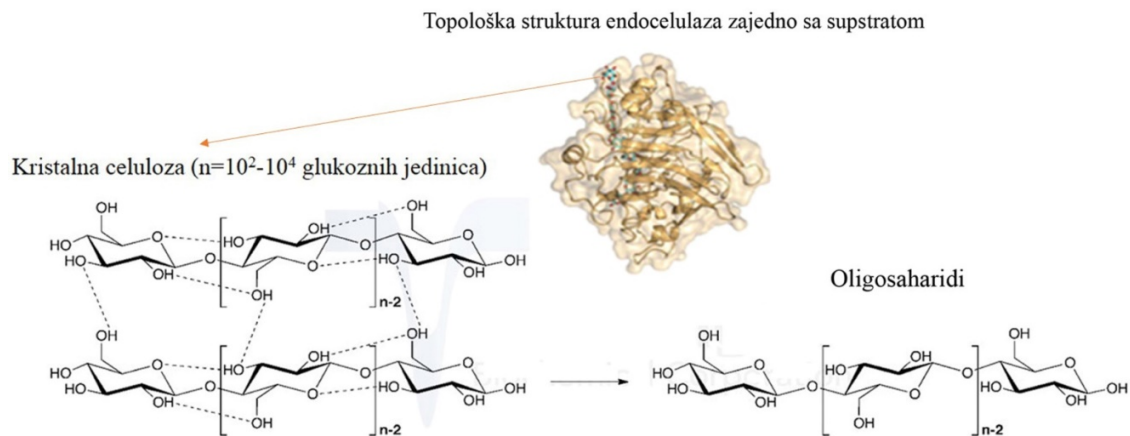
(preuzeto i modifikovano iz [35])

CAZime familija	Skraćeno ima	Opis
GH7	Cel7A/CBH1	Celobiohidrolaze
GH6	Cel6A/CBHII	Celobiohidrolaze
GH7	Cel7B/EGI	Endocelulaze
GH5	Cel5AEGII	Endocelulaze
GH12	Cel12A/EGIII	Endocelulaze
GH61	Cel61A/EGIV	Endocelulaze
GH61	Cel6B	Endocelulaze
GH61		Endocelulaze
GH45	Cel45/EGV	Endocelulaze
GH3	BGLI	B-glukozidaze

2.2.1.1 Endocelulaze

(Endo- β -1,4-D-glukanaze (EG), β -1,4-endoglukan hidrolaze, β -1,4-(endo) glukanaze ili CMCaze)

Endocelulaze (EC 3.2.1.4) ili CMCaze predstavljaju enzime koji nasumično hidrolizuju β -1,4-veze u celulaznim lancima stvarajući oligosaharide sa redukujućim i ne redukujućim krajevima. Kao rezultat hidrolize oslobađaju se celodektrini i nerastvorni celulozni fragmenati (slika 7B). Različiti MO, arhee, biljke i životinje proizvode različite endocelulaze i one pripadaju pripadaju familiji 5–9, 12, 44, 45, 48, 51,74. Endocelulaze gljiva mogu ili ne, da poseduju celulozno-vezujući modul (CBM) koji je preko spojnice (linker) povezan sa katalitičkim delom celulaznih enzima. Aktivno mesto endocelulaza je u obliku pukotine ili žleba, što je prikazano na slici 7A, gde se vezuju i ujedno razgrađuju celulozni lanci [159–163].



Slika 7. Endocelulaze A) topološka struktura endocelulaze i zajedno sa supstratom (sagledane se dve strane pri kojima se žleb jasno vidi) (preuzeto iz [164]); B) Reakcija endocelulaza i oslobađanje proizvoda (preuzeto i modificirano iz [165])

Bitne komponente *T.reesei* celulaznog kompleksa predstavljaju CEL7B i CEL5A koje čine preko 10% (Seiboth et al., 2012). U tabeli 4 je prikazana procentualna zastupljenost endocelulaza kod gljive *T. reesei*.

Tabela 4. Procentualna zastupljenost sekretovanih endocelulaza u *T. reesei*

Naziv	Količina u odnosu na ukupne celulaze (%)
Cel5A	1-10
Cel5B	nije poznato
Cel7B	5-10
Cel12A	<1
Cel45A	nije poznato
Cel61A	nije poznato
Cel61B	nije poznato
Cel74A	nije poznato

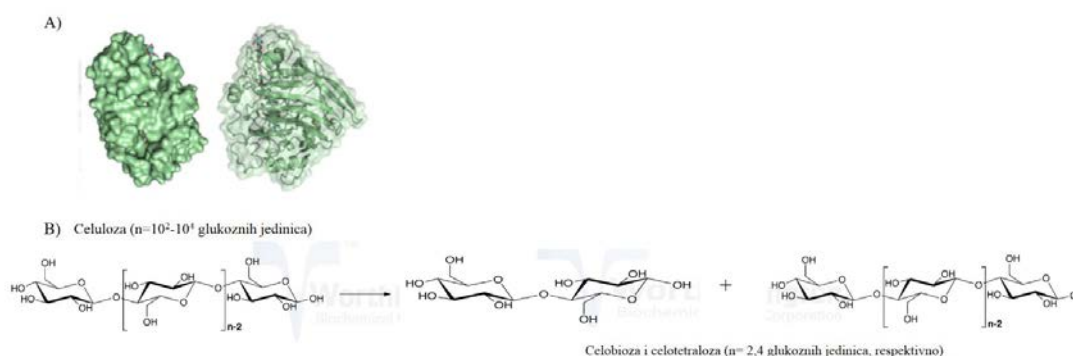
2.2.1.2 Egzocelulaze

(1,4- β -celobiohidrolaze (CBH), 1,4- β -D-glukan celobiohidrolaze, egzo-1, 4- β -D-glukanaze)

Egzocelulaze (EC 3.2.1.91) su enzimi koji hidrolizuju lance celuloze sa redukujućih (CBHI) i neredukujućih (CBHII) krajeva i čiji su proizvodi hidrolize celobioza ili celotetroza (slika 8B). One su najviše izučavane celulaze. Egzocelulaze

gljiva pripadaju porodici 6 i 7, ali ih proizvode i bakterije i pripadaju porodici 5, 9, 48 i 74 [166,167].

Topološka struktura CBH je prikazana na slici 8A. Aktivno mesto egzocelulaze je u obliku tunela (prolaza) koga formiraju dve petlje. Tunel može da prekriva celo aktivno mesto, kao što je slučaj kod CBHI egzocelulaza ili delimično, kao što je slučaj kod porodice 48. Nakon vezivanja za celulozu, egzocelulaze povlače krajeve celuloznih lanaca kroz svoje aktivno mesto, oslobađaju celobiozu, zatim dalje klize niz lanac celuloze gde se ponovo započinje sledeći korak hidrolize [168,169].



Slika 8. A) Topološka struktura egzocelulaze zajedno sa supstratom (sagledane se dve strane pri kojima se vidi katalitičko mesto u obliku tunela) (preuzeto iz [164]); B) Reakcija egzocelulaza sa oslobođenim proizvodom (preuzeto i modifikovano iz [170])

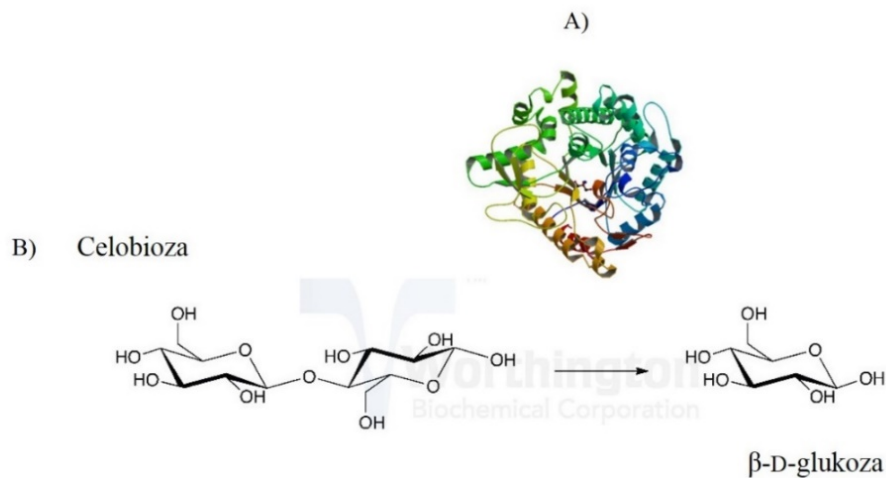
U celuloznom kompleksu enzima egzocelulaze, CBHI i CBHII, predstavljaju 70-80% od totalnih celuloza *T.reesei* koje se proizvode u uslovima u prisustvu inducera celuloza. Egzocelulaza CBHI (Cel7A) predstavlja 60% od svih ukupnih sekretovanih celuloza i zato je najispitivnija celuloza na nivou molekularne biologije dok egzocelulaza CBHII (Cel6A) predstavlja 15-20% od ukupnih sekretovanih celuloza [171].

2.2.1.3 β -glukozidaze (BG)

(1,4- β -glukozidaze, β -D-glukozidaze glukohidrolaze, celobiazе)

β – glukozidaze su enzimi koji hidrolizuju rastvorne dekstrine i celobiozu do glukoze (slika 9B) i ovi enzimi nemaju CBM. Aktivnost BG na nerastvornoj celulozi je zanemarljiva. Krajnji produkt hidrolize je glukoza koja je poznata kao inhibitor i egzocelulaza i endoglukanaza. Aktivno mesto BG je u obliku džepa (slika 9A) koja

omogućava vezivanje glukoze i hidrolizu glikozidne veze kojom se odvaja od celobioze ili celodektrina.



Slika 9. β -glukozidaza A) Kristalna struktura poreklom iz gljive *Trichoderma reesei* (preuzeto iz [172]; B) Reakcija β -glukozidaze (preuzeto i modifikovano iz [173])

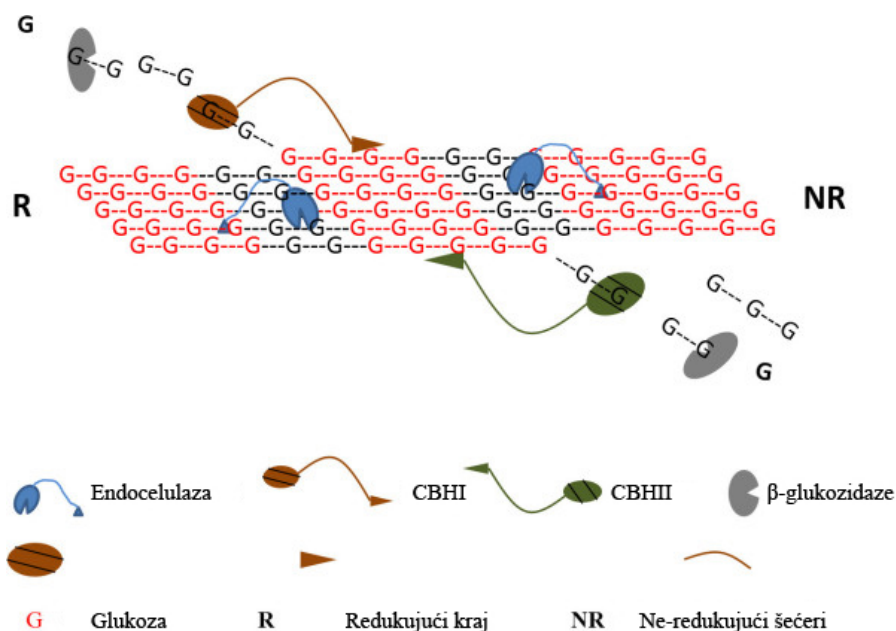
BG pripadaju familijama 5–9, 12, 44, 45, 48, 51,74. Gljive proizvode β – glukozidazu oko 1% od ukupnih totalnih sekretovanih proteina kod *T. reesei*, što otvara veliko polje u istraživanjima i pronalaznju izolata koji imaju veći potencijal u produkciji ovog enzima [166,174–176].

2.2.2 Sinergizam dejstva celulolitičkih enzima

Sinergizam svih enzima celulaznog kompleksa je od vitalnog značaja za kompletnu hidrolizu celuloznih materijala. Iako se sprovode brojne studije da se ispita odnos egzo- i endocelulaza za maksimalni sinergizam. Teško je doneti zaključak usled različitih varijacija u komponentama enzima, supstratima, koncentracijama enzima i supstrata kao i produktima njihovog dejstva i reakcionog vremena. Sinergistički mehanizam hidrolize celuloze je prikazan na slici 10, gde su za model korišćeni enzimi celulaznog kompleksa *T. reesei* [155,177].

Ovaj model pokazuje da se ceo proces dešava simultano i brzina limitirajućeg koraka je depolimerizacija nerastvorne celuloze. U ovom modelu endocelulaze hidrolizuju naizmenično unutrašnje celulozne veze, prvenstveno u više dostupnim amorfnim regionima čime se kreiraju novi celulozni krajeve koji predstavljaju startne tačke dejstva CBH enzima za dalju degradaciju polimera [153]. Aktivnošću CBH

enzima dobijaju se produkti koji su istovremeno induceri i supstrati za produkciju β -glukozidaza. Kao krajnji proizvod njihov sinergizma dobijaju se fermentabilni šećeri.



Slika 10. Dejstvo tri glavna celulazna enzima na površinski deo celuloze. Molekuli glukoze (G) su prikazani crvenom bojom u kristalnom regionu i crnom bojom u amorfnom regionu (preuzeto i modifikovano iz [178])

Za potpunu hidrolizu celulaze potrebna je aktivnost i drugih proteina koji nemaju enzimsku hidrolizu. Primer je protein svolenin (SWO1) koji otvara rigidnu kristalnu strukturu kristalne celuloze umetanjem između lanaca celuloze, čime povećava dostupnost celuloze enzimima. [179]. Takođe, postoji i nekoliko proteina i enzima koji su sakriveni u genomu *Trichoderma*. Ovi geni kodiraju CIP1 i CIP2 koji se eksprimiraju u celulazno indukujućim uslovima. CIP1 funkcija još uvek nije poznata, ali se veruje da ima ulogu kao i glikozid hidrolaze. Za CIP2 je pronađeno da ima ulogu glukuronil esteraza [180].

2.2.3 Metode za kvantifikaciju celulaza

Nivo produkujućih enzima se danas kvantifikuje na dva nivoa: nivo transkripcije i na nivou ekspersije. Zbog kompleksnosti samog celulolitičkog sistema razvijeno je više metoda za kvantifikaciju pojedinačnih enzima celulaznog kompleksa. Za određivanje aktivnosti celulaznih enzima uglavnom se koriste celulolitički eseji koji se

baziraju na spektrofotometrijskim metodama [181,182]. Metode za određivanje celulazne aktivnosti koje se danas široko primenjuju su predložene od strane IUPAC-a (International Union of Pure and Applied Chemistry [183]).

2.2.3.1 Metode za kvantifikaciju eksprimiranih proteina

Detekcija i kvantifikacija enzimske aktivnosti predstavlja određivanje količine enzima prisutnog u definisanim uslovima, odnosno pri optimalnoj temperaturi i uslovima pH, kao i koncentraciji supstrata. Enzimska aktivnost se određuje na osnovu količine dobijenog proizvoda nastalog pri dejstvu enzima, a izražava se brojem enzimskih jedinica po 1 mL (U/mL). Za određivanje celulazne aktivnosti (individualnih ili celokupnih celulaza) najviše se primenjuju stop eseji koji se zasnivaju na prekidanju enzimske reakcije u određenom vremenu pri optimalnim uslovima, gde se kvantifikuje nastali proizvod. U zavisnosti od tipa supstrata, eseji za detekciju celulaznih enzima mogu biti kolorimetrijski, fluorescentni ili se u novije vreme proizvodi celulazne hidrolize određuju upotrebom HPLC-a (high performance liquid chromatography). Za kvantifikaciju i karakterizaciju enzima celulaznog kompleksa koriste se rastvorni i nerastvorni supstrati.

Rastvorni supstrati

U rastvorne supstrate spadaju celulozni derivati, celodekstrini čiji DP (degree of polymerization (DP) – stepen polimerizacije) iznosi 2-6 šećerne jedinice kao i mnogi drugi. Ovi supstrati se obično koriste za određivanje individualnih celulaznih aktivnosti. Celodekstrini se dobijaju delimičnom kiselom hidrolizom celuloze. U zavisnosti od DP celodekstrini koji imaju DP 6, ili manji, su rastvorni u vodi. Povećanjem DP smanjuje se njihova rastvorljivost [184]

Hromogeni *p*-nitrofenil glukozidi i fluorogeni metilumberiferil-D-glukozidi se takođe dobijaju od celodektrina i koriste se za analiziranje inicijalne kinetike celulaza, reakcione specifičnosti ili inhibicione konstante celulaza u prisustvu dodate celobioze i glukoze [185,186]. Najčešće korišćeni supstrati su *p*-nitrofenil- β -D-celobiozid koji se koristi za detekciju egzocelulaza, dok se *p*-nitrofenil- β -D-glukopiranozid koristi za određivanje aktivnosti β -glukozidaze. Aktivnošću celulaznih enzima kao proizvodi nastaju celobioza ili glukoza i *p*-nitrofenol. Kao proizvod hidrolize metilumberiferil-D-

celobiozida i metilumberiferil-D-glukopiranozida oslobađaju se celobioza i glukoza, fenol i 4-metilumberilferon koji je fluorescentni molekul i koji omogućava detekciju ovih enzima.

Jonski substituisani supstrati, kao što je na primer CMC, koja se obično koristi za određivanje endocelulazne aktivnosti, je tip viskoznog supstrata i njena rastvorljivost u vodi zavisi od pH i jonske jačine. Postoji i nejonski substituisana celuloza kao na primer hidoksietil celuloza (HEC), koja se takođe koristi za određivanje endocelulazne aktivnosti. Slično kao i CMC, HEC se koristi u viskozimetrijskim testovima [187] prilikom čega se endocelulazna aktivnost određuje na osnovu količine redukujućih šećera upotrebom DNS reagensa [188].

Nerastvorni supstrati

U nerastvorne supstrate za celulaze spadaju: pamuk, Whatman No.1 filter paper, celuloza dobijena iz bakterija, mikrokristalna celuloza i amorfna celuloza, obojena celuloza, α -celuloza i pretretirana celuloza.

Primeri visokokristalne celuloze su pamuk i bakterijska celuloza. Pamuk se dobija nakon obrade prirodnog pamuka koji uključuje uklanjanje voska, pektina i boja. Od dugih vlakana pamuka se dobija Whatman No.1 filter papir. Mikrokristalna celuloza koja se naziva hidroceluloza ili Avicel (komercijalno ime) se dobija kiselom hidrolizom kore drveta. Međutim, MC i dalje sadrži značajnu frakciju amorfne celuloze što ga čini dobrim supstratom za određivanje egzocelulazne aktivnosti usled niskog nivoa DP. Međutim, ipak i neke endocelulaze mogu da hidrolizuju Avicel i s tim u vezi nije ispravna terminologija avicelaze. Amorfna celuloza se dobija mehaničkim i hemijskim pretretmanima kristalne celuloze [189–191].

2.2.3.2 Spektrofotometrijski eseji za određivanje aktivnosti celulaza

Efikasnost hidrolize celuloze celulaznim kompleksom se može kvantifikovati na dva načina. Prvi se bazira na određivanju aktivnosti individualnih enzima iz celulaznog kompleksa (endocelulaza, egzocelulaza i β -glukozidaza), dok se drugi tip bazira na merenju krajnjeg stepena hidrolize supstrata (celuloze), čijom kvantifikacijom se zapravo određuje ukupan celulolitički kapacitet [16,153].

2.2.3.2.1. Određivanje endocelulazne aktivnosti

Aktivnost endocelulaza se može meriti kroz smanjenje viskoznosti supstrata ili određivanjem povećanja redukujućih krajeva tokom reakcije. Preporučuje se i upotreba hromofornih supstrata gde se hromofore mogu osloboditi od oligosaharida koji se mogu određivati HPLC ili TLC tehnikom (*eng* thin layer chromatography-tankoslojna hromatografija). Određivanje endocelulazne aktivnosti preporučeno od IUPAC se bazira na hidrolizi CMC-a kao supstrata [153]. Metoda se zasniva na kvantifikaciji nastalih redukujućih šećera, upotrebom 3,5-dinitrosalicilatnog reagensa (DNS) [192]. Ova metoda se najčešće koristi za određivanje endocelulazne aktivnosti.

2.2.3.2.2 Određivanje egzocelulazne aktivnosti

Kao supstrat za detekciju egzocelulaza koristi se 4-metilumbeliferil- β -D-laktozid gde se kao proizvod oslobađa laktoza, fenol i 4-metilumbeliferon (fluorescentni molekul). Međutim, ovaj supstrat se nije pokazao kao efektivan za određivanje CBHII aktivnosti. Iz tog razloga za određivanje egzocelulazne aktivnosti veliku primenu je našao *p*-nitrofenil- β -D-celobiozid (*p*NPC). Kao proizvodi nastaju celobioza i *p*-nitrofenol koji u baznim uslovima postaje intenzivno žute boje što omogućava njegovu spektrofotometrijsku detekciju merenjem apsorbancije na 405 nm. Mana ovog supstrata je ta što ga hidrolizuje i β -glukozidaza. Određivanje egzocelulazne aktivnosti je moguće uz inhibiciju β -glukozidaze dodatkom D-glukono laktone [193]. Za određivanje egzocelulazne aktivnosti koriste se i drugi supstrati kao što su: bakterijska mikrokristalna celuloza i 4-metilumbeliferil- β -D-celobiozid (MUC) [194].

2.2.3.2.3 Određivanje β -glukozidazne aktivnosti

Određivanje aktivnosti BG se zasniva na upotrebi obojenih ili fluorescentnih produkata kao što su *p*-nitrofenil- β -D-1,4-glukopiranozid [195], β -naftil- β -D-glukopiranozid, 6-bromo-2-naftil- β -D-glukopiranozid [196]. Takođe, aktivnost BG može biti određena i upotrebom celobiozida koji nisu hidrolizovani aktivnošću endo- i egzocelulaza ili upotrebom celodekstrina [192,197]. Najčešće korišćeni hromogeni supstrat je *p*-nitrofenil- β -glukozid (*p*NPG) gde se za kvantifikaciju meri količina

oslobođenog *p*-nitrofenola. Ukoliko se koriste oligosaharidi ili disaharidi kao supstrati, oslobađanje glukoze može da se meri i upotrebom Trinderovog reagensa.

2.2.3.2.4 Određivanje ukupne celulazne aktivnosti (FPU esej)

Prednost individualnih eseja se ogleda u mogućnosti određivanja hidrolitičke moći samih enzima i u radu sa velikom količinom uzoraka. Međutim, ovi eseji poseduju veliki broj mana koje potiču od prirode samih supstrata, sinergizma kao i kompeticije između enzima unutar celulaznog kompleksa [16,153]. Kako bi se standardizovali uslovi za određivanje aktivnosti sva tri enzima, tj. totalnih celulaznih enzima, razvijen je esej za određivanje ukupnih celulaznih enzima tzv. FPU esej (eng. filter paper unit assay). Ovaj esej je preporučen i od strane IUPAC za praćenje saharolitičkog kapaciteta celulaznog sistema [192]. Međutim, problem ovog eseja se ogleda u tome što celulazna aktivnost zavisi od uslova eseja (pH, vreme eseja ili dodatak ili ne β -glukozidaza u cilju produkcije odgovarajuće koncentracije glukoze), a samim tim zavisi i upoređivanje između uzoraka [198,199]. Kompleksnost, vremenska zahtevnost i ekonomska nezahvalnost su ključne mane ovog eseja [181]. Iz ovih razloga danas se još uvek traga na pronalaženju novih i optimizaciji postojećih testova za detekciju celulaza [198,200,201].

Supstrati za ovaj esej su nerastvorni supstrati kao što su Whatman No.1, pamuk, bakterijska MC i druge. Ovu metodu je razvio Mandel 1979. godine [202] i izvodi se upotrebom 1×6-cm tračica Whatman No. 1 filter papira kao standardnim supstratom koji je dostupan i nije skup. Prva usavršavanja ovog eseja su započeta od strane Ghose [203]. Nivo oslobođenih redukujućih šećera se određuje DNS metodom. Po ovoj FPU metodi 0,5 mL rastvorenog enzima oslobađa 2,0 mg glukoznog ekvivalenta u 60 min. Uslovi eseja kao što su pH i temperatura zavisi od osobina celulazanih enzima, tipa celulaza i porekla enzima.

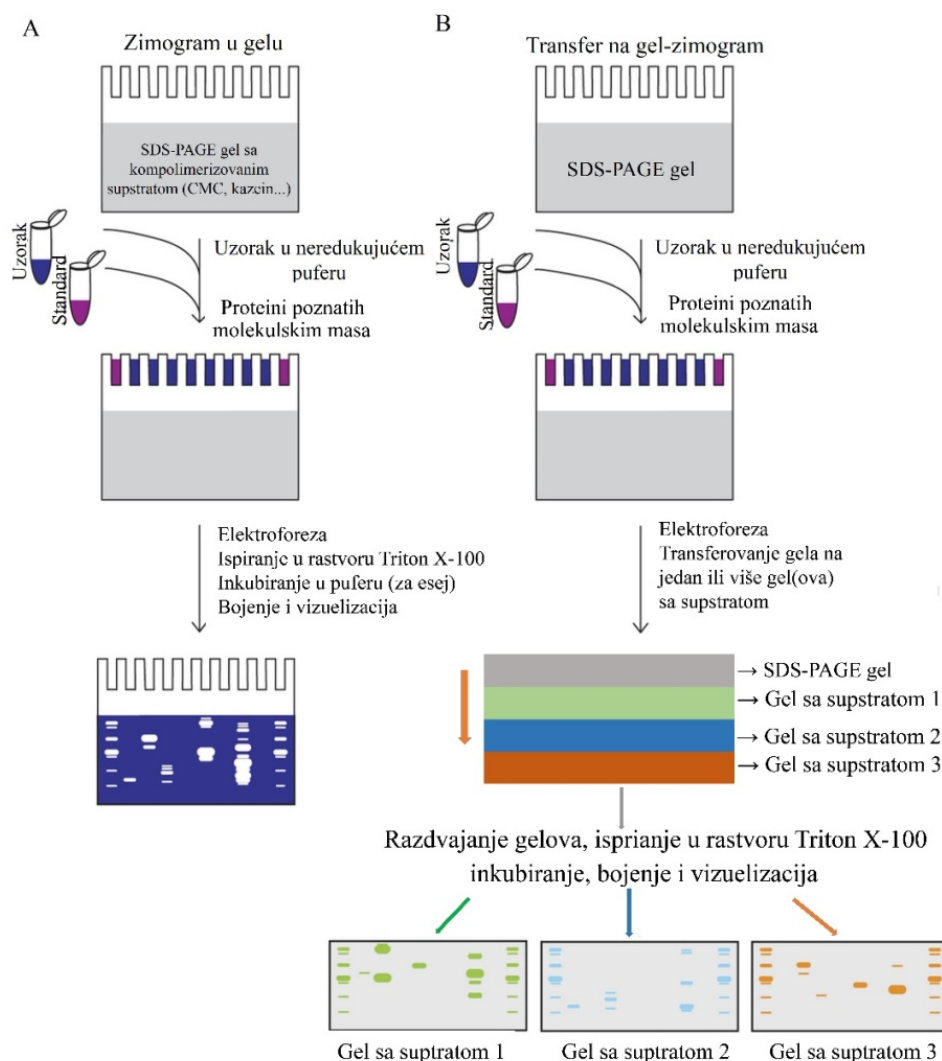
2.2.4 Zimogram za celulaze

Termin „zimogrami" je uveden 1962. godine i označava vizuelizaciju enzimske aktivnosti konverzijom supstrata [204]. Zimogramskom tehnikom, procesom hidrolize ciljnih enzima, supstrat se konvertuje u reakcioni proizvod, koji može biti vizuelizovan. Ovom tehnikom se, pored enzima, mogu analizirati ćelije i tkivni ekstrakti, sekretomi

ćelija ili tkiva, a kao supstrati se mogu koristiti proteini i peptidi, oligosaharidi i polisaharidi, lipidi i nukleinske kiseline.

Zimogramska tehnika obezbeđuje kvalitativne i kvantitativne podatke: molekulsku masu proteina ili prisustvo različitih izoformi enzima. Zimogramska detekcija u gelu, drugačije nazvana i indirektni zimogram, nastala je 1978. godine [205]. Ova metoda se zasniva na elektroforetskom razdvajanju proteinskih uzoraka u poliakrilamidnom (PAA) gelu nakon čega se u drugom gelu koji sadrži supstrat za enzime i koji je printovan na PAA gel detektuje enzimsko aktivnost. Kasnija optimizacija zimograma je obuhvatala inkorporaciju supstrata za određeni enzim u PAA gel koji se ujedno koristi i za elektroforetsko razdvajanje – direktni zimogram [206–208]. Obe opisane zimogramske detekcije se najčešće koriste u denaturišućim elektroforetskim uslovima (SDS PAGE).

U cilju dobijanja bolje rezolucije i veće količine podataka urađene su brojne varijacije zimograma u gelu. SDS-PAGE zimogrami su spojeni sa izoelektrofokusanjem (IEF) i na taj način je dobijena druga dimenzija tj. 2D elektroforeza i zimogrami. Ova metoda omogućava analizu individualnih proteina i primenjuje se za kompleksne uzorke. Takođe, dobijene individualne proteinske trake se dalje mogu dodatno analizirati npr. sekvenciranjem datog proteina [209,210]. Šematski primeri zimogramske detekcije su prikazani na slici 11.



Slika 11. Zimogramska detekcija A) u gelu sa kopolimerizovanim supstratom i B) transfer na gel sa kopolimerizovanim supstratom (preuzeto i modifikovano iz [211])

Prva zimogramska detekcija endocelulaza je obuhvatala razdvajanje proteina SDS-PAGE-om, na koji je printovan gel sa agarom i kopolimerizovanim supstratom CMC. Danas se agar smatra zastarelom metodom i zamenjena je PAA gelom zbog lakšeg rukovanja i dobijanja bolje rezolucije. Uobičajeno se endocelulaze detektuju upotrebom sekundarnog direktnog zimograma sa inkorporiranom CMC [212,213]. Međutim, mana ove tehnike je u tome što se nakon SDS-PAGE mogu detektovati samo renaturisani proteini. Drugi tip zimogramske detekcije endocelulaza obuhvata razdvajanje enzima IEF i detektovanje enzima nakon printa na PAA gel sa inkorporiranom CMC [214,215]. Ovako se analiziraju nativni proteini.

Ovakvi tipovi zimogramske detekcije su primenjivani i za ostale celulazne enzime (egzocelulaza i β -glukozidaza). Razlika je u primeni različitih supstrata za detekciju. Fluorescentno obeleženi supstrat 4-metilumbeliferil- β -D-glukozid se primenjuje kao supstrat za zimogramsku detekciju β -glukozidaznih izoformi [18]. Kao drugi tip supstrata ranije se koristio *p*-nitrofenil- β -D-glukozid kao supstrat. Kao rezultat β -glukozidazne aktivnosti detektuju se trake žute boje. S obzirom da ove trake daju veoma slab kontrast, rezolucija ovakvog zimograma je veoma loša [216]. Supstrat sličan ovome je i 6-bromo-2-naftil-*p*-D-glukozid. Na mestima aktivnosti se detektuju crveni precipitati kao diazonijum soli [217]. Mana ovog zimograma je što zahteva veoma brz rad. Supstrat koji se do sada pokazao kao najprimenljivi za detekciju β -glukozidaza je eskulin. Reakcija između eskulina i glukoze uz dejstvo β -glukozidaze prelazi u eskuletin koji zajedno sa jonima gvožđa daje crn precipitat [218].

Zimogramska detekcija egzocelulaze zahteva prethodnu inhibiciju β -glukozidaze [18]. Kako bi se postigla inhibicija β -glukozidaza, neophodno je gel nakon razdvajanja proteina inkubirati u rastvoru glukonolaktona, koji se koristi kao inhibitor β -glukozidaza. Nakon inhibicije β -glukozidaza, gel se inkubira u rastvoru supstrata, 4-metilumbeliferil- β -D-celobiozida, za detekciju egzocelulaza [18,219]. Vizuelizacija egzocelulanih traka, plave boje, postiže se izlaganjem gela UV svetlosti [18].

Višeslojne ili istovremene zimogramske detekcije enzima su razvijene poslednjih godina kao posebne kategorije zimograma. Na ovaj način je moguće detektovati dva ili više enzima u jednom istom uzorku [18,220]. Potreba za simultanim zimogramskim detekcijama više enzima je proistekla iz potrebe za brzim detektovanjem više različitih industrijski značajnih enzima u istom uzorku. Simultana zimogramska detekcija različitih vrsta celulaza još uvek nije razvijena iako postoji potreba za tim.

Pored spektrofotometrijskih i zimogramskih tehnika za određivanje nivoa produkovanih enzima, nivo produkcije se može pratiti i metodama molekularne biologije kojima se određuje nivo eksprimiranih gena.

2.2.5 Metode za praćenje ekspresije gena (PCR i qPCR)

Za detekciju nivoa genske ekspresije (kvantifikacije transkripcije) najčešće se koriste metode: Northern blot i hibridizacija *in situ* [221], reverzna transkripciona polimerazna lančana reakcija (reverse transcriptase polymerase chain reaction - qRT-PCR)

[222] i cDNA biočip [223]. Od svih ostalih metoda jedino RT-qPCR se odlikuje velikom osetljivošću i fleksibilnošću.

qRT-PCR predstavlja molekulanu metodu za praćenje i kvantifikaciju genske ekspresije koja se zasniva na enzimskoj amplifikaciji definisane sekvencije transkribovane u molekul RNA. Prednost ove metode ogleda se i u tome da omogućava zaobilaženje kloniranja. Pored toga, može se koristiti za analizu pojedinačnog nukleotidnog polimorfizma, genotip, određivanje broja kopija čak i proteinsku analizu. Postupak praćenja genske ekspresije obuhvata nekoliko koraka [224]: izolovanje RNA, sintezu cDNA i qRT-PCR amplifikaciju.

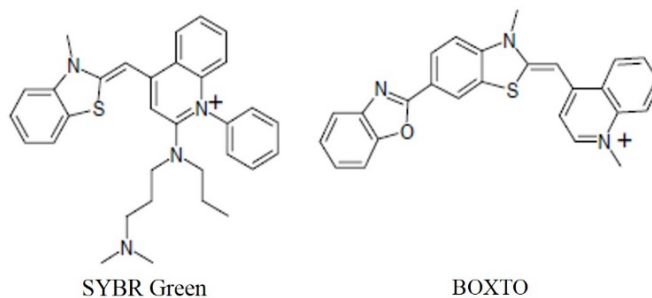
Proces izolovanja RNA i cDNA sinteza su kritični koraci u procesu transkripcione analize. S obzirom na to da se molekul RNA reverznom transkripcijom transkribuje u molekul cDNA, koncentracija cDNA je odraz koncentracije molekula RNA. U procesu sinteze cDNA najveća efikasnost se dobija upotrebom oligo(dT) prajmera koji se hibridizuju za poly(A) rep na molekulu RNA koji je prisutan kod eukariotskih iRNA i na taj način započinju reverznu transkripciju od samog (3') početka RNA. Enzim reverzna transkriptaza koristi ovaj poly(A) i oligo(dT) templat za sintezu prvog lanca cDNA molekula. Na ovaj način sintetisana cDNA se koristi za kvantifikaciju qRT-PCRom. Ovakav tip qRT-PCR metoda predstavlja qRT-PCR iz dva koraka koji obuhvata prvo sintezu cDNA i nakon toga njenu kvantifikaciju. Pored ovog tipa takođe se koristi i qRT-PCR u jednom koraku u kome se reverzna transkripcija i kvantifikacija gena odigravaju zajedno (u jednoj reakcionoj smeši) [224].

U qRT-PCR tehnici kvantifikacija količine amplifikovanog produkta je povezana sa intenzitetom fluorescencije koji se dobija upotrebom fluorescentnog „reporter molekula“. Koriste se dva tipa fluorescentnih reportera: fluorescentne boje i hibridizacione fluorescentne probe [223,225].

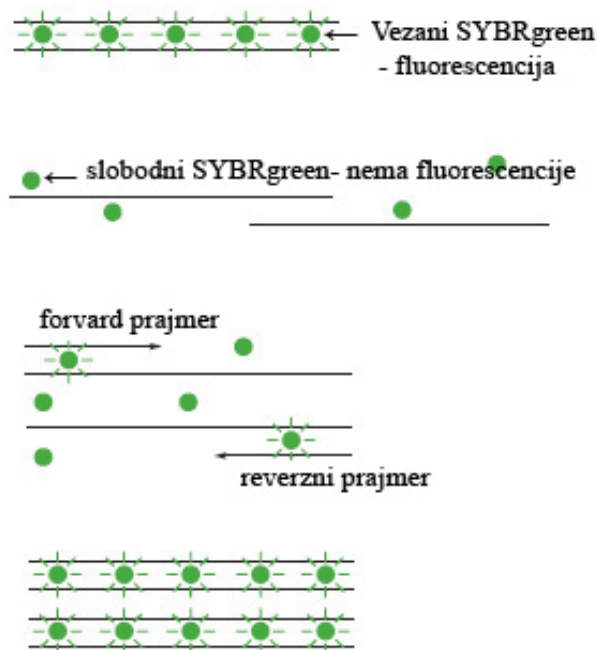
Fluorescentne probe

Detekcija i kvantifikacija fluorescentnim bojama se zasniva na njihovoj interkalaciji sa dvolančanim molekulom DNA. U rastvoru PCR smeše, pre uspostavljanja interkalacije, ove boje ne fluoresciraju. Međutim, nakon vezivanja za dvolančanu DNA njihova fluorescencija se povećava oko hiljadu puta [226]. Što je veći broj dvolančanih molekula DNA, čija se koncentracija povećava tokom PCR-a, dolazi i

do povećanja broja vezivanja fluorescentnih reportera za novonastale molekule, što za posledicu ima i povećanje intenziteta fluorescencije. Najpoznatije fluorescentne boje koje se danas koriste su: SYBRGreen i BOXTO (slika 12) [227,228]. Šematski prikaz qPCR upotrebom SYBRGreen-a je prikazan na slici 13.



Slika 12. Asimetrične boje SYBRGreen [2-[N-bis-(3-dimethylaminopropyl)-amino]-4-[2,3- dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene]- 1-phenyl-quinolinium] i BOXTO (4-[6-(benzoxazole-2-yl)-(3-methyl)-2,3-dihydro- (benzo-1,3-thiazole)-2-methylidene)]- 1-methyl-quinolinium chloride

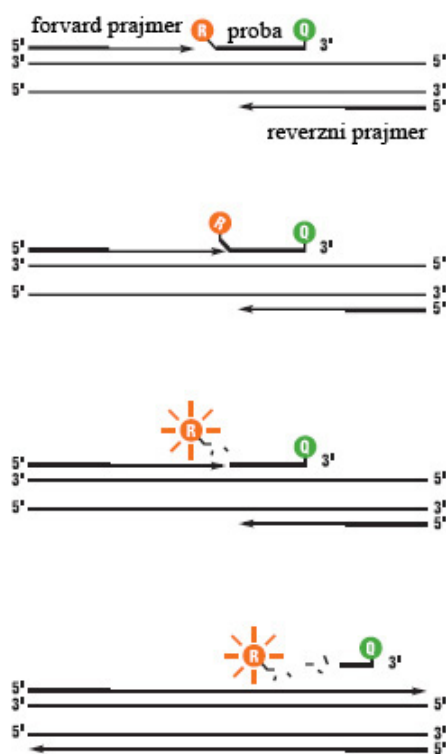


Slika 13. Šematski prikaz procesa qPCR upotrebom SYBR Green-a
(preuzeto i modificovano iz [229])

Hibridizacija fluorescentne probe

Ove probe obezbeđuju veću specifičnost u odnosu na fluorescentne boje. Sadrže oligonukleotidne probe za detekciju qPCR produkta od interesa. U nedostatku

specifične ciljane sekvencije u reakciji, fluorescentne probe ne hibridizuju i ne fluoresciraju. Kada probe hibridizuju sa ciljanom sekvencijom od interesa dolazi do fluorescencije, koja je u direktnoj vezi sa količinom amplifikovanog ciljanog molekula u svakom PCR ciklusu. Primer jedne hibridizacione probe je TaqMan, koji se najčešće upotrebljava (slika 14). Linearna proba je na 5' kraju obeležena fluorescentnim donatorom, dok je na 3' kraju obeležena fluorescentnim akceptorom. Održavanjem ova dva molekula, donor i akceptor formu, u neposrednoj sredini, fluorescencija od donora je smanjena i ne može se detektovati. Najčešće se koriste fluorofore rodamin i fluorescein. Probe su dizajnirane da se vezuju za jedan lanac DNA nizvodno od prajmera za detekciju u 5' pravcu. Kako u procesu elongacije DNA polimeraza ide u 5' smeru i ima 5'-3' nukleaznu aktivnost, u trenutku kada naiđe na probu dolazi do dislociranja probe i njene razgradnje čime se donor oslobađa u rastvor. Nakon odvajanja donora i akceptora fluorescentni donor može da emituje fluorescenciju [230].



Slika 14. Hemija mehanizma TaqMan probe (preuzeto iz [229])

Intenzitet fluorescencije se povećava tokom vremena sa brojem PCR ciklusa. Ove podatke sakuplja qPCR instrument u sistemu tokom vremena. Prvi ciklus na kome instrument može da napravi razliku amplifikovane fluorescencije u odnosu na pozadinu

se naziva Ct vrednost ili prag ciklusa i ona je direktno povezana sa početnom ciljanom koncentracijom za uzorak. Što je veća koncentracija uzorka na početku to je veća i brža detekcija Ct vrednosti. Postoje dva načina kvantifikacije ove metode, a to su apsolutna i relativna. Apsolutna kvantifikacija je direktna i precizna i zasniva se na konstrukciji standardne prave napravljene od serije razblaženja kontrolnog templatata poznate koncentracije. Ona se primenjuje u slučajevima kada je važno dizajnirati eksperimente u kojima je neophodno odrediti tačan nivo templatata. Relativna kvantifikacija se odnosi na merenje relativne koncentracije gena od interesa u nepoznatom uzorku upoređenom sa kontrolnim uzorkom. Razlika u Ct vrednosti između nepoznatog uzorka (isptivanog gena) i kontrolnog gena predstavlja ekspresiju gena.

Instrument za qPCR je onaj koji je sposoban za kombinaciju amplifikacije, detekcije i kvantifikacije. Tri kompetirajuća instrumenta su poznata: ABI Prism 7700 (Perkin-Elmer–Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), Lightcycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) i Biorad Instruments. Biorad se pokazao kao najbolji s obzirom da može da prati 4 različita fluorescentna reportera u bilo kom vremenu i koji može da se koristi za bilo koju alternativnu RT-fluorescenciju [230].

Za obradu podataka postoje programi koje se koriste kao što su: REST, QPCR, qBase SARS i mnogi drugi [231–234]. Pored programskog izračunavanja može se koristiti i izračunavanje upotrebom formule (prikazana ispod) koju je izveo Livak [235,236].

$$\text{Relativna genska ekspresija} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{isptivanog uzorka}) - \Delta Ct (\text{kontrolne})$$

$$\Delta Ct (\text{nepoznatog gena}) = Ct \text{ targetnog gena i referentnog gena za isptivani uzorak}$$

$$\Delta Ct = Ct (\text{targetni gen}) - Ct (\text{referentni gen})$$

$$\Delta Ct (\text{kontrolne}) = Ct \text{ razlika targetnog gena i referentnog gena za isptivani uzorak}$$

$$\Delta Ct = Ct (\text{targetni gen}) - Ct (\text{referentni gen})$$

Ct (cross threshold) – predstavlja osnovni princip u realnom vremenu PCR i važna je komponenta u proizvodnji preciznih reproduktivnih podataka. Definiše se kao frakcija PCR broja ciklusa na kojoj je fluorescentni reporter veći od threshold-a. S obzirom da su svi proračuni u logaritamskoj osnovi 2, svaki put kada se u toku PCR

amplifikacije duplira DNA, Ct vrednost se smanji za 1, ali se ne prepolovi. Iz tog razloga neophodno je za izračunavanje relativne genske ekspresije uvrstiti broj dva.

- t (threshold) – proizvoljan nivo fluorescencije i može biti podešen za svaki eksperiment tako da bude prisutan u svim delovima amplifikacije.

Kvantifikacija nivoa eksprimiranih celulaza kod gljiva je nezaobilazni deo istraživanja bilo koje produkcije. Ekspresija celulaza je pod komplikovanom kontrolom koja započinje supstratnom indukcijom. Opšte je poznato da celulaze, i drugi hidrolitički enzimi spadaju u inducibilne enzime kod filamentoznih gljiva, što znači da je njihova ekspresija moguća samo u prisustvu nekog inducibilnog supstrata [237]. Prvi korak u izučavanju mehanizma produkcije celulaza je poznavanje inducera i dobar izbor istih.

2.3 Prirodni supstrati za produkciju celulaza

Najefikasniji supstrati za rast celulazno produkujućih gljiva i indukciju celulazne produkcije su kompleksni prirodni supstrati koji u svojoj hemijskoj osnovi poseduju celulozu. To su razne vrste lignocelulozne biomase i slama kao najzastupljeniji lignocelulozni otpadni materijal.

2.3.1 Lignocelulozna biomasa

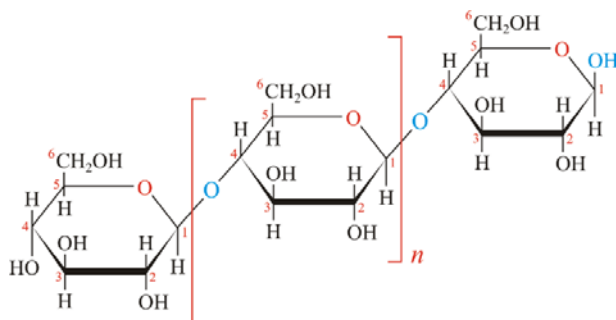
Lignocelulozna biomasa predstavlja najzastupljeniju obnovljivu biomasu čija proizvodnja kroz proces fotosinteze širom sveta iznosi 1×10^{10} tona. Struktura lignocelulozne biomase je veoma kompleksna i sastavljena je od: celuloze, hemiceluloze i lignina, i dugih manjih komponenata. S obzirom na to da su celuloza i hemiceluloza šećerni polimeri lignocelulozna biomasa se smatra izvorom fermentabilnih šećera što je baza za veliki broj istraživanja u smislu njene iskoristljivosti [238,239].

2.3.1.1 Celuloza

Celuloza je glavna komponenta ćelijskih zidova biljaka i najzastupljeniji obnovljivi organski izvor na Zemlji. Godišnja produkcija celuloze je na nivou desetina miliona tona što govori o njenoj ekonomskoj vrednosti. Zastupljenost celuloze u biljnim

ćelijama zavisi od tipa biljke i kreće se od 35-50% suve mase, dok je na primer kod pamuka čak 100%. Koristi se kao sirovina u papirnoj, tekstilnoj, farmaceutskoj i hemijskoj industriji [240].

Celuloza je linearni homopolimer sastavljen od D-glukopiranoznih jedinica povezanih β -1,4-glukozidnim vezama. Hemijska formula celuloze je $(C_6H_{10}O_5)_n$ (slika 15) gde je n stepen polimerizacije (DP) i kreće se u opsegu od stotinu do nekoliko desetina hiljada.



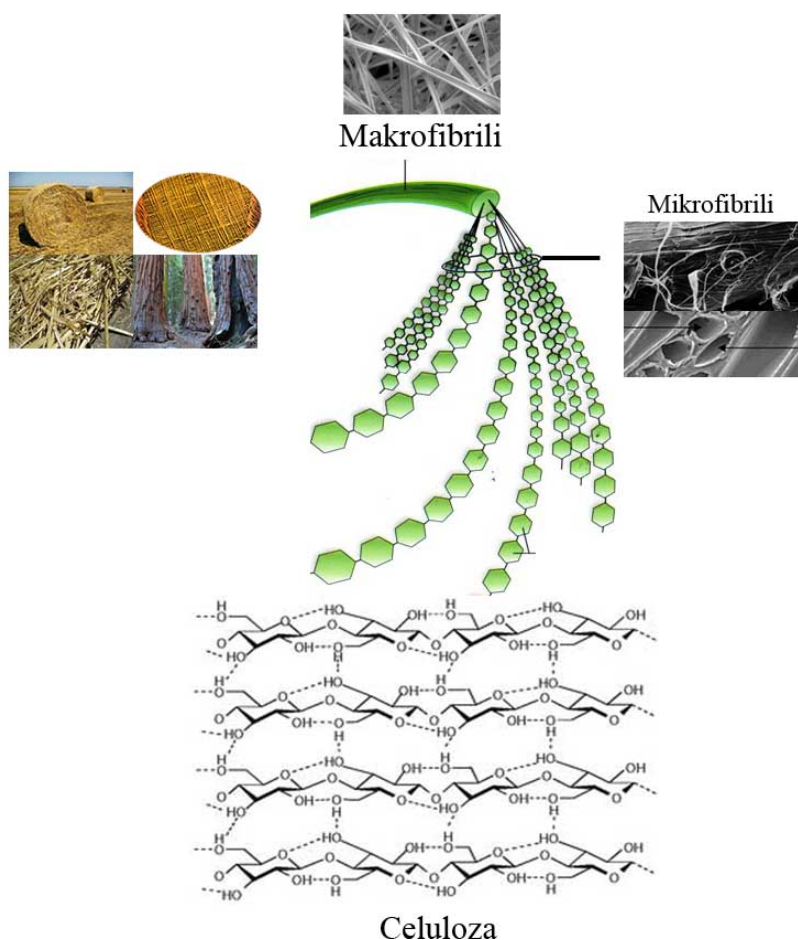
Slika 15. Deo strukture celuloze (preuzeto iz [241])

Celuloza se odlikuje i veoma kompleksnom fizičkom strukturom. Prvi nivo strukture se odnosi na hemijsku strukturu ili stehiometrijsku strukturu jedne ili više strukturne jedinica jednog molekula lanca. Drugi nivo strukture se odnosi na veličinu jednog molekula polimera. Agregaciona struktura (sekundarna struktura) je ceo polimer, dok treći nivo strukture predstavlja pakovanje molekula polimera u agregacionoj strukturi, formiranje uvijenih formi i kristalne strukture. Glavnu strukturu u hijerarhiji čini polimer od koga zavise osobine celuloze kao što su tačka topljenja, gustina, rastvorljivost, viskozitet, adhezija i druge. Paralelni lanci glukoze, različite dužine (sadrže oko 60-80 glukoznih molekula), formiraju fibrile koji se skupljaju u snopove praveći mikrofilamentoznu strukturu koja je uglavnom iste dužine (Zhang et al.,2005).

Makrofilamenti se sastoje od više mikrofilamenata i njihova dužina je zavisna od tipa biljnog materijala. Prostor koji čine vodonične veze između molekula fibrila predstavljaju kristalni region celuloze dok ostali deo predstavlja amorfnu regiju. S obzirom na to da hemiceluloza ispunjava ovaj prostor između fibrila, i da su mikrofilamenti okruženi ligninom proces delignifikacije čini mikrofilamente i fibrile dostupnim. Fizička struktura celuloze je predstavljena na slici 16.

Zbog svoje prirode celuloza je nerastvorna u vodi i bubri usled sposobnosti da absorbuje 8-14% vode unutar normalnih atmosferskih uslova (20°C, 60%, relativne

vlažnosti). Termalna razgradnja započinje na oko 180°C dok se potpuna razgradnja dešava na 300-375°C [242].

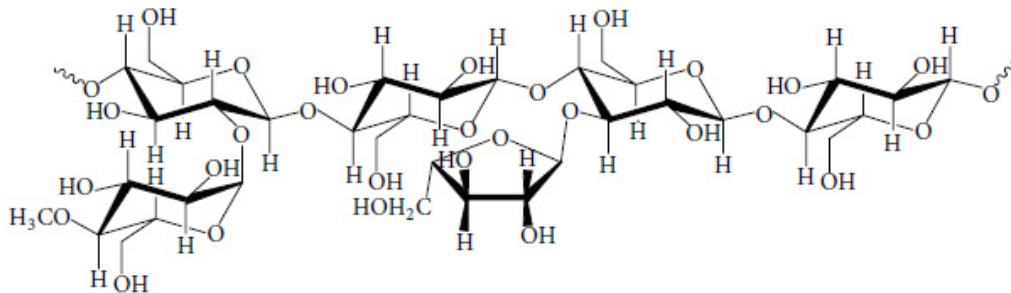


Slika 16. Hijerarhijska struktura biljne celuloze
(preuzeto i modifikovano iz [243])

2.3.1.2 Hemiceluloza

Termin hemiceluloza je zajednički termin koji se koristi da predstavi familiju polisaharida kao što su arabino-ksilani, gluko-manani, galaktani i drugih koji su pronađeni u ćelijskom zidu biljaka i imaju različit sastav i strukturu u zavisnosti od izvora i metode ekstrakcije. Najznačajniji tip polimera iz grupe hemiceluloze je ksilan. Molekul ksilana (slika 17) uključuje povezane β -1,4-D-ksilopiranoze jedinice sa granajućim lancima 4-oksimetil-glukuronske kiseline. Važni aspekt strukture i sastava hemiceluloze izostaju zbog nedostatka kristalne strukture, uglavnom zbog visoko razgranate strukture i acetil grupa povezanih u polimerni lanac. Hemiceluloza se

rastvara u alkalnim sredinama, dok se kompletna hidroliza, do monmera, postiže zagrevanjem u rastvoru hidroksida [240,244,245].

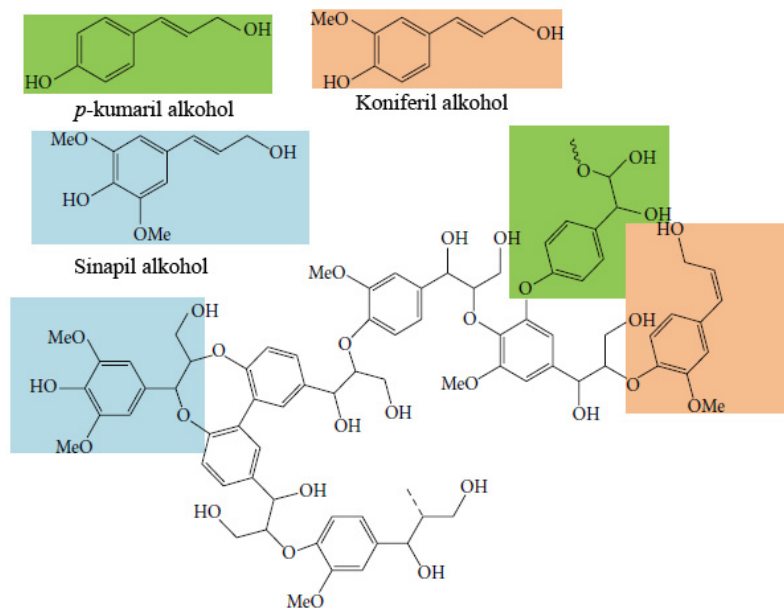


Slika 17. Struktura ksilana (preuzeto iz [246])

U sastav lignoceluloznog materijala pored celuloze i hemiceluloze ulazi i lignin koji obavija hemicelulozu i celulozu kao mreža.

2.3.1.3 Lignin

Lignin je najstroženi prirodni polimer. To je anamorfnu trodimenzionalni polimer sa fenilpropan jedinicama kao predominantnim gradivnim blokovima. Tri glavne komponente (monomera) lignina čine *p*-kumaril alkohol, koniferil alkohol i sinapil alkohol na osnovu kojih može biti podjeljen u tri tipa (istoimena kao i monomeri). Struktura lignina je prikazana na slici 18.



Slika 18. Struktura lignina (preuzeto iz [246])

Lignin se ponaša kao nerastvorna trodimenzionalna mreža i igra važnu ulogu u izdržljivosti i razvoju ćelija jer utiče na transport vode i hranljivih materija i metabлита u biljnoj ćeliji.

Lignocelulozna biomasa je usled ovakve strukture veoma nepristupačna za iskorišćavanje u cilju dobijanja fermentabilnih šećera. Kako bi se povećala dostupnost celuloze i hemiceluloze i povećala iskorišljivost lignocelulozne biomase ovaj materijal zahteva preretman koji nije ekonomski isplativ [247,248].

2.3.2 Tipovi lignocelulozne biomase

Postoji nekoliko grupa otpadnog materijala koji spadaju u lignocelulozne biomase, a razlikuju se po sastavu, poreklu i strukturi: poljoprivredni, industrijski i šumski [240,249,250].

Poljoprivredni ostaci kao što su kukuruz, pirinčane i pšenične slame, šećerna trska i drugi predstavljaju jedan od najvećih izvora obnovljive lignocelulozne biomase. Slama pšenice, pirinča i šećerne trske su potencijalno najveći izvori za proizvodnju etanola. Odlikuju se većom količinom hemiceluloze u odnosu na druge lignocelulozne biomase (25-35%). Takođe, komunalni i industrijski otpad predstavljaju potencijane sirove materijale za produkciju bioteanola. Upotreba ovih sirovina ima veliki značaj u smanjenju ekoloških problema, preradi papira i uklanjanju prehrabjenih nus proizvoda [251].

Šumski otpadni materijali se smatraju drugom generacijom sirovina za produkciju biogoriva. Oni predstavljaju značajan izvor lignocelulozne biomase što svakako povećava njihovu potražnju u cilju produkcije celulaznih enzima.

2.3.3 Slama kao lignocelulozni otpad

Pšenica (*Triticuma aestivum* L.) je najčešće gajena žitarica na svetu. Gaji se u 115 zemalja, u različitim klimatskim uslovima [252]. U poslednjih 100 godina proizvodnja pšenice je znatno povećana, a u 2008. godini proizvedeno je oko 650×10^9 kg suve pšenice. Uzimajući u obzir da je odnos ostatka – slame i roda 1,3 može se reći da se oko 850×10^9 kg pšenice proizvede zajedno sa slamom, koja na ovaj način predstavlja najveći poljoprivredni otpad. Slama koja se dobija nakon žetve pšenice ili se ostavlja na polju, gde se pri procesu obrade zemljišta vraća u zemlju, ili se spaljuje ili se

uklanja sa zemljišta u zavisnosti od državnih regulativa. Uklanjanje slame sagorevanjem je problem zato što ovim procesom dolazi do zagađenja vazduha. Svakodnevno se radi na pronalaženju novih načina uklanjanja slame uz mogućnost njenog iskorišćavanja. Razgradnjom slame se dobijaju prosti šećeri koji se mogu koristiti za dobijanje etanola ili drugih hemikalija pomoću odgovarajućih MO. Zato je slama zauzela važno mesto u biotehnologiji produkcije bioetanola druge generacije [14,252–254].

Struktura slame

Tri glavne komponente slame čine celuloza, hemiceluloza i lignin. Pored ovih komponenti u slami se takođe nalaze proteini, minerali (kalcijum i fosfor), silikati i drugi čija je procentualna zatupljenost prikazana u tabeli 5 [255].

Tabela 5. Hemijski sastav slame [256]

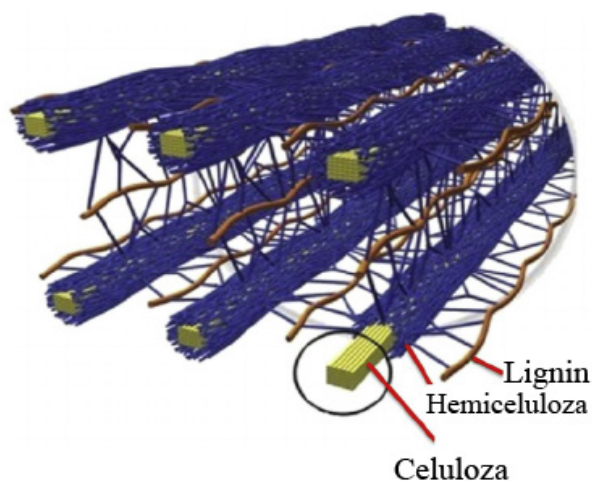
Komponente	Procenat (%)
Suva masa	89-94
Proteini	3,6
Celuloza	33,7-40
Hemiceluloza	21-26
Lignin	11-22,9
Pepeo	7-9,9
Silikati	4,5-5,5
Kalcijum	0,18
Fosfor	0,05

Zbog svog sastava slama je našla brojne industrijske primene kao što su proizvodnja celuloze, u bioremedijaciji, povećanju plodnosti i organskog sastava zemljišta, proizvodnji drvenog uglja i medicini. Takođe je i predmet istraživanja naučnika u smislu novih primena [257–259].

Cilj svake biotehnoške proizvodnje je ekonomska isplativost, te poljoprivredni otpadni materijal sve češće zamenjuje skupe i sintetičke supstrate. Filamentozne gljive mogu vrlo efikasno da iskoriste ove poljoprivredne otpadne materijale i od njih stvore više vredne proizvode. Slama je jeftin supstrat koji se može koristiti u produkciji enzima filamentoznim gljivama. Veliki broj ekstracelularnih hidrolitičkih enzima je produkovan upotrebom slame u uslovima tečne fermentacije kao i fermentacije na čvrstoj podlozi (solid state- fermentation –SSF) [260–262]. Zbog velikog procenta

celuloze u svom sastavu slama je najviše korišćena kao supstrat za produkciju celulaznih enzima s obzirom na to da celuloza indukuje produkciju ovih enzima u gljivama [263,264].

Celuloza, hemiceluloza i lignin su upakovani u slami na specifičan način, što je prikazano na slici 19, tako da predstavljaju kompaktnu strukturu koja nije dostupna za enzimsku hidrolizu. Celulozni lanci u slami su čvrsto upakovani i povezani sa ligninom preko hemiceluloze [15].



Slika 19. Organizacija celuloze, hemiceluloze i lignina u lignocelulozonoj biomasi (preuzeto i modifikovano iz [265])

Kako bi se celuloza i hemiceluloza oslobodile i postale dostupne za fungalne enzime pribegava se raznim pretretmanima slame kao što su:

1. fizički
2. hemijski
3. fizičko-hemijski

Pretremani dovode do smanjenja i narušavanja fibrilne strukture materijala čime se povećava dostupnost supstrata za enzimsku hidrolizu. Međutim, ove metode su energetski veoma zahtevne i uglavnom se kombinuju. Hemijski tretmani se zasnivaju na uklanjanju hemiceluloze ili ligninskog dela, rastvaranjem lignina u kiselim rastvorima i hemiceluloze u alkalnim rastvorima. Pretretman amonijačnom eksplozijom fibrila (ammonia fiber eksplozion-AFEX) i eksplozija parom pod pritiskom (steam explosion – STEX) se smatraju najefikasnijim fizičko-hemijskim metodama. STEX pretretmanom dolazi do dekompozicije materija usled tretiranja visokim pritiskom pare. AFEX

predstavlja alkalnu metodu u kojoj se lignocelulozni materijal izlaže amonijačnom rastvoru pod visokim pritiskom i visokim temperaturama prilikom čega dolazi i do dekompozicije materijala i uklanjanja hemiceluloze [266–268]. Pored povećanja dostupnosti supstrata, pretretmanima se izbegavaju degradacije monosaharida (naročito pentoza), minimizira formiranje inhibitora za sledeći korak fermentacije i povećava mogućnost iskorišćenja lignina. Ali, sa druge strane preskakanje ovog koraka u tehnološkoj obradi slame predstavlja biotehnološki izazov te je razgradnja supstrata *in situ* danas aktuelna problematika u naučnom svetu. Razlog za tim je što produkcija celulaznih enzima i produkcija bioetanola dobijenih direktnom upotrebom biomase smanjuje troškove njihove proizvodnje što je jedan od ključnih faktora u industriji [269,270].

Pored izbora dobrog inducera za podizanje nivoa produkcije celulaza potrebno je izučavati i koristiti i druge metode. Razvoj tehnika molekularne biologije je omogućio da se upravo korišćenjem ovih tehnika menjaju produceri na nivou gena odgovornih za celulaze što za posledicu ima poboljšanje nivoa njihove produkcije.

2.4 Poboljšanje produkcije celulaza filamentoznih gljiva

Cilj industrijske biotehnologije je da ovlada metaboličkim aktivnostima ćelija MO, biljaka i životinja kako bi produkovala širok opseg različitih jedinjenja koje se koriste u raznim industrijama. Tehnikama molekularne biologije se poboljšavaju MO u cilju povećanja metaboličkog kapaciteta, sa ciljem poboljšanja profitabilnosti proizvodnje.

Genska ekspresija je proces u kome se genska informacija, zapisana u molekulu DNA u redosledu nukleotida konvertuje u funkcionalni produkt, protein. Najbitniji intermedijer u procesu genske ekspresije je molekul RNA [230]. Mesta kontrole ekspresije gena su mesto početka transkripcije, promotor, pojačivači i utišivači gena. Kao rezultat promene uslova opstanka, rasta i diferencijacije dolazi do izmene u obrascima ekspresije gena [224].

Procesi manipulacije MO se odavno primenjuju i u današnje vreme spadaju u „staru biotehnologiju“. Primer ove biotehnologije je fermentisana hrana kao što su jogurt, sir, vino i drugi. Početkom devedesith godina moderna industrijska mikrobiologija zajedno sa napredovanjem biohemije, inžinjerina i genetike dovodi do

primene čistih kultura i razvoj sojeva za produkciju proteina koji su uključeni u proces osnivanja nove biotehnologije [271,272].

Glavni cilj poboljšanja sojeva MO je da opstaju u uslovima limitirajućih katalitičkih procesa. Pažnja je usmerena na poboljšanje sojeva za povećanje proizvodnje primarnih i sekundarnih metabolita. S obzirom na to da je priroda biosintetskih procesa filamentoznih gljiva veoma složena i ima različite biohemijske prekursore koji se javljaju u toku rasta i diferencije gljiva, teško je pratiti promene koje nastaju poboljšavanjem sojeva [273].

Svi procesi biosinteze i regulacije su kontrolisani zapisom nuklotidnih sekvencija. S tim u vezi, za poboljšavanje sojeva je neophodno preurediti i manipulirati sekvencijama čime se „reprogramira“ DNA. Na ovaj način se zaobilaze kritične tačke u biohemijskim procesima. Manipulacija na nivou DNA uključuje mutacije, genetičke rekombinacije i moderne tehnike prekrajanja gena za ciljani proces (DNA „splicing“). Nekada je potrebna kombinacija jedne ili više tehnika kako bi se dobili poboljšani sojevi [274].

2.4.1 Mutageneza

Mutacije su promene jednog ili više nukleotida na specifičnom mestu DNA lanca. Mogu biti povezane sa promenama jednog nukleotida (tačkasta mutacija), kroz supstituciju, deleciju ili reorganizaciju jednog ili više nukleotidanih baznih parova. Međutim, mutacijama se mogu dobiti i pogrešna spajanja DNA molekula. Mnoge mutacije se dešavaju sa malom učestalošću, u bilo kojoj tački gena. Mutacije mogu biti i spontane kada su posledica odgovora organizma na promenu životne sredine što takođe može dovesti do poboljšanja produktivnih performansi soja [274]. Poboljšanje sojeva kroz mutacije se postiže upotrebom različitih fizičkih ili hemijskih agenasa. Primeri poznatih mutagena faktora su prikazani u tabeli 6.

Tabela 6. Primeri mutagena koji se koriste za poboljšavanje sojeva [274]

Mutageni	Posledice mutacija	Uticaj na DNA	Relativni efekat
X zraci, gama zraci	Jednolančane ili dvolančane prekide u molekulu DNA	Delecija, promene u strukturi	visok
Ultravioletno zračenje	Dimerizacija pirimidina	Transferzije, delecije, tranzicije u smeru GC→AT, okvir čitanja	srednji
5-Hlorouracil 5-Bromouracil	Dvojno sparivanje	AT→GC, GC→AT tranziciju	slab
2-Aminopurin dezaminacioni agensi	Greške u replikaciji DNA	AT→GC, GC→AT tranziciju	slab
Hidroksilamin (NH ₂ OH)	Dezaminacija citozina	GC→AT tranziciju	srednji
Azotasta kiselina (HNO ₂)	Dezaminacija A, C I G	Bidirekciona translacija, delecija; AT→GC i/ili GC→AT	visok
N-metil-N-nitro-N-nitrozoguanidin	Metiovanje	GC→AT tranziciju	visok
Etidijum bromid, akridinske boje	Interkalacija između dva bazna para	Promena okvira čitanja, gubljenje plazmida i mikrodelecija	slab
Fag, plasmid, DNA transpozovanje	Bazna supstitucija, prekidi u DNA molekulu	Delecija, duplikacija i insercija	visok

Mnogi mutageni faktori poruzrokuju prekide u DNA lancima kroz proces delecije, adicije, transverzije ili supstitucije baza ili razgradnje DNA lanaca. Efikasna naizmenična selekcija je zavisna od kulture, tipa mutacije, vremena izloženosti mutanta, uslovima tretmana i povećanja prizvoda detekcije [274,275].

Ovaj empirijski postupak mutacija ima dugu istoriju kao što je to na primer proizvodnja penicilina kod koga originalni soj proizvodi oko 50g/l, dok mutiran soj proizvodi oko 4000 puta više. Pored ovih postoji veliki broj mutiranih sojeva koji se koriste u industriji za proizvodnju enzima. Upotrebom kombinovanih UV i hemijskih mutagena dobijen je soj *A. terreus* koji produkuje 7 puta veću količinu enzima u odnosu na početni soj. Jedan od hipercelulolitički produkujućih sojeva koji se industrijski najviše primenjuje je soj *Trichoderma reesei* RUT-C30 dobijen serijom fizičkih i hemijskih mutacija koji produkuje dva puta više ekstracelularnih proteina u odnosu na početni soj, i kod koga je katabolička represija prevaziđena [71].

Poboljšanje produkcije celuloza kod gljiva zahteva detaljno poznavanje regulacije ekspresije kako bi se moglo delovati na više nivoa sa ciljem podizanja nivo produkcije.

2.5 Regulacija genske ekspresije celulaza

Primarna funkcija celulaza jeste hidroliza celuloze, čime se oslobađaju oligomeri koji se daje razgrađuju za produkciju bioetanolu. *Trichoderma reesei* je soj koji se već godinama koristi kao model za izučavanje regulacije biohemijske razgradnje celuloze upotrebom enzima celulaza. Celulaze *T. reesei* su inducibilni enzimi, odnosno njihovi transkripti se ne formiraju tokom rasta gljive već isključivo u prisustvu inducera. Metabolisani monosaharidi, proizvodi hidrolize celuloze, dovode do represije produkcije celulaza, čak i u prisustvu inducera. U prisustvu određenih molekula, intracelularni signalni molekuli dovode do aktiviranja odgovarajućih transkripcionih regulatora i odgovarajućih metaboličkih enzima. Ovo ukazuje na to da je kontrola celulolitičkih enzimskih sistema predmet višestruke kontrole. Ferman je regulaciju genske ekspresije celulaza i hemicelulaza prikazao upotrebom DNA biočip-a (Micro array) metode da se najznačajnija regulacija dešava na nivou transkripcije [276]. Ova regulacija je spoj zajedničkog efekta odgovarajućih transkripcionih faktora koji uključuju aktivatore i represore. Najpoznatiji među njima, ujedno i najviše ispitivani, su aktivatori XYR1, ACE2 i HAP2/3/5, a među represorima ACE1 i katabolički represor CRE1 [277–281].

2.5.1 Ksilanazni regulatorni protein 1 (XYR1)

XYR1 je cink-binuklearni protein koji je spada u klasu transkripcionih faktora specifičnih za gljive. Vezuje se za GGCTAA- motiv, organizovan kao invertovana ponavljajuća sekvencija gena, koji je prisutan u genima promotora za celulaze i hemicelulaze [282]. XYR1 je glavni aktivator celulaza i hemicelulaza na nivou genske ekspresije. On je ortolog *xlnR* gena koji kodira XlnR proteina (ksilanolitički transkripcioni aktivator R) koji je prvi put izolovan iz *Aspergillus niger*-a kada je pokazano pozitivno delovanje na transkripcionom nivou [283]. Konsesusna sekvencija, najčešće prisutna sekvencija nukleotida na ovoj poziciji, koja se nalazi kod XYR1 je pronađena kod svih inducibilnih *H. jecorina* (danas *T. reesei*) celulaznih promotora. Delecija *xyr1* gena dovodi do izostanka produkcije celulaza kod *H. jecorina* (odnosno *T. reesei*) na celulozi i soforozi kao supstratima, što potvrđuje njegovu esencijalnu funkciju u ekspresiji celulaznih i hemicelulaznih gena [22]. Nivo ekspresije glavnih

celulaznih gena *cbhI* i *cbhII* je u korelaciji sa transkripcionim nivoom *xylI* gena [277,282].

2.5.2 Aktivator celulazne ekspresije 2 (ACE2)

Drugi važan aktivator ekspresije celulaznih gena je cink binuklearni klaster DNA-vezujući protein ACE2 koji aktivira ekspresiju glavnih celulaznih i ksilanaznih gena. DNA vezujući motiv, za koji se vezuje protein ACE2, je prisutan u *cbhI* promotoru (5'-GGCTAATAA) celulaza za koji se takođe vezuje i XYR1. Za vezivanje ACE2 za ovaj promotor potrebna je njegova fosforilacija ili dimerizacija [279,281,283].

2.5.3 Aktivator proteina sa hemom HAP2/3/5

Indukcija *cbhII* (Cel6A) promotora je zavisna od CCAAT kutije za koju se vezuje HAP2/3/5 proteinski kompleks. Njih kodiraju geni *hap2*, *hap3* i *hap5* koji su slični sa Hap homolozima u drugim organizmima. HAP2, 3 i 5 sadrže histonski motiv i dovode se u povezanost sa organizacijom hromatinske strukture. Postavljena je hipoteza da konzervirana uloga CCAAT sekvencije u celulaznim promotorima ima konzervativnu ulogu u stvaranju otvorene strukture hromatina neophodnu za potpunu transkripcionu aktivaciju, ali precizna regulacija nije poznata [279,284].

U 2014. godini je otkriven još jedan aktivator celulaza *ace3* čija „over-ekspresija“ se dovodi u vezu sa povećanjem ksilanaze i celulaze [285]. Delecija ovog gena dovodi do smanjenja ksilanazne aktivnosti i ima veoma veliki uticaj na smanjenje celulazne produkcije. Takođe, on je povezan sa transkripcijom *xylI* gena. Njegova „over-ekspresija“ dovodi do povećanja, dok delecija dovodi do značajnog smanjenja transkripcije *xylI* gena [285].

2.5.4 Aktivator celulazne ekspresije 1 (ACE1)

ACE1 sadrži tri Cys2His2 „cink finger“ regiona i pokazano je da se vezuje za 8 mesta koja sadrže sekvenciju 5'-AGGCA u *cbhI* promotoru. Delecija *ace1* dovodi do povećanja ekspresije svih glavnih celulaznih i hemicelulaznih gena gajenih na indukujućim medijumima (sofrozi i celulozi) [286].

Ovo ukazuje na to da on deluje kao represor na celulaznu i ksilanaznu produkciju, a u isto vreme i na represiju *xylI* ekspresiju. Isptivanja urađena na sojevima

kod kojih je deletiran *ace1* i *ace2* gen ima isti uticaj kao i kad je deletiran samo *ace1* gen. Ovo se verovatno dešava kao posledica XYR1 aktivnosti [278,281].

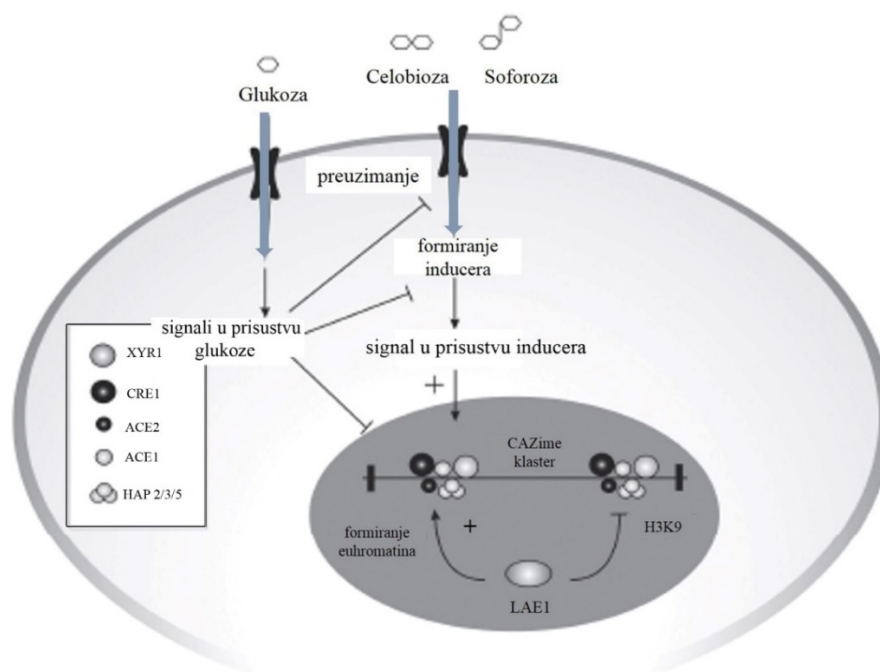
Ekspresija glavnih celulaznih gena kod *H. jecorine* (*T. reesei*) i drugih filamentoznih gljiva se ne dešava u uslovima rasta na glukoznom medijumu. Katabolizam glukoze i drugih monosaharida obezbeđuje visok nivo proizvodnje ATP i naziva se ugljenična katabolička represija (*eng carbon catabolic repression-CCR*). Glavnu ulogu u CCR ima Cys2Hys2 transkripcioni faktor CRE1 analog kod *A. nidulans* CreA [287].

Pokazano je da se CRE1 vezuje za dva susedna motiva SYGGRG u *cbh1* i *xyn1* promotorima *H. jecorine* (*T. reesei*). Delecija *cre1* gena dovodi do ekspresije celulaznih gena u prisustvu glukoze i povećanja produkcije enzima u indukujućim uslovima [288]. CreA funkcioniše kao dvostruki mehanizam represirajući ekspresiju transkripcionih aktivatora XlnR i takođe ekspresiju gena pod njegovom regulacijom. U skladu sa tim, veruje se i da je *xyr1* kod *T. reesei* pod regulacijom CRE1. Pored CRE1 kod *A. nidulans* dodatni proteini mogu biti uključeni u CCR. CreB čiji je CREII ortolog *T. reesei* pokazano je da ima uticaj na produkciju celulaza. Narušavanje strukture gena *cre2* dovedi do povećanja produkcije celulaza u uslovima rasta na sofrozi, laktozi i celulozi [289,290].

2.5.5 S-adenozilmetionin-zavisna metiltransferaza LAE1

LAE1 je globalni regulator koji deluje na ekspresiju višebrojnih gena koji kodiraju za sekundarne metabolite u nekoliko gljiva, i može da modifikuje heterohromatinsku strukturu u *A. nidulans*. Takođe je pokazano da je ekspresija gena za lignoceluloznu degradaciju kontrolisana ortologozima *T. reesei* LAE1. Kod *lae1* deletiranih mutanata dolazi do potpunog gubitka ekspresije svih sedam celulaza koje su isptivane, pomoćnih enzima za degradaciju lignoceluloze, β -glukozidaze i ksilanaze. Povećana ekspresija *lae1* rezultuje u značajnom povećanju transkripcije celulaznih gena. LAE1 modelovanje ekspresije gena je zavisno od funkcije celulaznog regulatora XYR1, ali je i *xyr1* ekspresija takođe LAE1 zavisna. Dokazano je da *lae1* ekspresija nije očigledno povezana sa H3K3 ili H3K8 trimetilacijom kod CAZyme kodirajućeg regiona što sugeriše da LAE1 ne utiče na CAZyme gensku ekspresiju preko direktnog modelovanja H3K4 ili H3K9 metilacije. Ovo ukazuje da je metiltransferaza LAE1

esencijalna za produkciju celulaza kod *T. reesei*, ali kroz mehanizam koji je potrebno tek identifikovati. Kako bi se naučilo više o LAE1 ispitivan je efekat delecije i „over-ekspresije“ *lae1* na ekspresiju gena u genomu *T. reesei*. Pronađeno je da LAE1 pozitivno reguliše 7 od 17 poliketida (neribozomalnih peptid sintaza), gene koji kodiraju ankirin proteine, preuzimanje gvožđa, heterokarion nekompatibilnost proteina, PTH11-receptor i oksidaze/monoksigenaze [291–293].



Slika 20. Regulacija geneske ekspresije u *T. reesei*. Regulacija celulaznih gena je određena na transkripcionom nivou kataboličkom represijom (indukovanom D-glukozom) ili specifičnim inducerima dobijenim razgradnjom celuloze (celobioza) ili transglikozilacijom (soforoze) produktima. Ugljeno hidratna represija (CCR) može da deluje na različitom nivou: preuzimanje inducera, formiranje inducera i direktna represija celulaza i transkripcionih aktivatora geneske ekspresije. Pozitivna regulacija se postize aktivatorima XYR1, ACE2 i HAP kompleksom, dok se negativna postiže preko CRE1 i ACE1. Celulazna ekspresija je dodatno regulisana na hromatinskom nivou preko LAE1. Potencijalne mete su formiranje ehromatina i H3K9 metilovanje (preuzeto i modifikovano iz [71])

Gljive su razvile sofisticirani mehanizam koji je fleksibilan i odmah odgovara i adaptira se na promene u životnoj sredini. Taj mehanizam obuhvata detekciju ugljenika i signalizaciju koja je obezbeđena hijerarhijskom asimilacijom i sa dva glavna kontrolna kola: indukcija i generalna CCR. U prisustvu glukoze ili drugih monosaharida, koji se veoma lako i brzo preuzimaju u ćelije, dolazi do aktiviranja CRE1, transkripcionog faktora koji se vezuje za promotorne regione celulaznih i ksilanaznih gene (*xyn1* i

cel7a). CCR može da deluje na ekspresiju celulaznih gena na dva načina: ili da represira individualne celulazne gene ili transkripciju njenih aktivatora (isključenje inducera). Isključivanje inducera je fenomen pri čemu ugljeni hidrati sprečavaju preuzimanje indukujućeg izvora ugljenika. Na primer, kada je glukoza prisutna CRE1 deluje da spreči preuzimanje inducera celulazne produkcije (celobiozu ili laktozu). Na slici 20 su pokazani putevi regulacije genske ekspresije celulaza [21,289,290,293].

Velika produkcija celulaza zahteva prisustvo inducibilnih izvora ugljenika koji mogu biti dobijeni od celuloze kao što su soforoza i celobioza. Za inicijalnu inducer produkciju (celobiohidrolaze) postoje razne teorije s obzirom da se celulaze ne ekspimiraju konstitutivno. Jedna od najprihvatljivijih teorija je da ipak postoji veoma nizak nivo bazalne ekspresije celulaza koje se proizvode i koje deluju na nesolubilnu celulozu i formiraju inducer ili prekursor inducera oslobađanjem male količine di- i oligosaharida. Ovi oligosaharidi se preuzimaju i mogu da indukuju dalju biosintezu celulaza. Pronađeno je da je Cel6A (CBHII) predominantna celulaza kod micelijuma *T. reesei* i delecija gena *cel6a (cbhII)* dolazi do usporenog rasta i produkcije celulaza na celulozi. Uklanjanje drugog gena koji kodira CBHI (*cel7b*) mutanti nisu mogli da rastu na podlozi sa celulozom i za njihov rast je potrebno bilo dodavati dodatne inducere celulaza.

Soforoza (2-O-beta-D-glukopiranozil-alfa-D-glukoza) je jedan od najjačih inducer celulaza. Pored ovog šećera, laktoza i L-soforoza su veliki induceri celulaza. Međutim, soforoza ne može da se koristi u industrijskim fermentacijama, jer istovremeno utiče na ćelijski rast i veoma se brzo metaboliše kroz ćelije. S obzirom da je laktoza solubilna i jeftinija od drugih inducera, kao što su celobioza i soforoza, našla je veliku primenu u produkciji celulaza (fermentacijama) i rekombinantnih fermentabilnih proteina. Obligatorno prisustvo inducera celulazne genske ekspresije podrazumeva povezanost sa njihovim promotornim regionima [294,295].

3. Naši radovi

Produkcija celulaza gljivama roda *Trichoderma* je kompleksan problem i veoma aktuelan u naučnim krugovima. Razumevanje procesa produkcije se može postići proučavanjem nekoliko faza. U tom smislu su postavljeni sledeći ciljevi ovog rada:

- Prikupljanje i izolovanje sojeva gljiva roda *Trichoderma* iz prirode, potencijalnih celulaznih producera.
- Razvijanje testa za brzu selekciju celulaznih hiperprodukujućih izolata gljiva iz roda *Trichoderma*.
- Molekularna identifikacija izolata *Trichoderma* spp. koji su ocenjeni kao dobri produceri celulaza.
- Optimizacija uslova za produkciju celulaznog kompleksa enzima upotrebom sirove, netretirane slame kao supstrata u uslovima tečne fermentacije.
- Razvijanje zimograma za simultanu detekciju celulaznog kompleksa enzima.
- Upotreba iskorišćenog komposta šampinjona kao supstrata za produkciju celulaza.
- Poboljšanje produkcije celulaza metodama klasične mutageneze.
- Analiza ekspresije gena *xyl1* i *lae1*, na nivou transkripcije, koji kodiraju za transkripcione aktivatore celulaznog kompleksa enzima, kao kontrola produkcije.

3.1 Izolovanje gljiva roda *Trichoderma* iz prirode

Uzorci sa različitih staništa širom Srbije su sakupljeni i korišćeni kao izvori izolata *Trichoderma* spp. Izolati *Trichoderma* spp. su poreklom: iz zemljišta (Rakovica, Beograd) (1), sa gajilišta pečurki bukovače (*Pleurotus ostreatus*) u Bačkoj Topili (2), sa listova kukuruza (*Zea mays*) koji su dobijeni od Instituta za kukuruz, Zemun Polje, Beograd (6), sa kore drveta u Botaničkoj Bašti, Beograd (3). U zavisnosti od tipa izvora MO primenjene su različite metode izolovanja kao što su metod serijskog razblaženja, metod išarane ploče i metod gajenja u tečnoj kulturi. Svi izolati su dobijeni kao čiste monosporne kulture. Za izolovanje i čuvanje kultura korišćene su čvrste podloge krompirov agar, sladni agar i Saburo agar. Svi izolati su gajeni do formiranja spora koje se čuvaju na -70°C u glicerolu.

Zajedno sa ovim izolatima ispitivani su izolati (~90) dobijeni sa Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine, Zemun, Beograd. Ukupno 100 izolata je korišćeno u izradi ove disertacije. Mikroskopskom analizom su svi izolati morfološki okarakterisani kao *Trichoderma* sp.

3.2 Razvijanje testa za brzu selekciju celulaznih hiperprodujućih izolata gljiva

Za potrebe selekcije sojeva *Trichoderma* spp. razvijen je novi test za brzu, jednostavnu i pouzdanu selekciju endocelulaznih hiperprodukujućih gljiva bez toksičnih indikatora. Prva faza u skriningu je rast izolata gljiva i u ovom testu traje najviše 36 h, za razliku od skrining testova koji se najčešće koriste gde gljive rastu od 48-96 h [8,149]. Novi test za brzu selekciju se bazira na vizuelnoj promeni viskoznosti supstrata (od čvrstog do tečnog stanja) koja nastaje kao posledica hidrolize CMC-a. Ovo se može smatrati velikom prednosti u odnosu na druge testove zato što se ne koriste niti toksične boje za bojenje supstrata niti obojeni supstrati [1,8]. Opisani test za brzi skrining celulaznih hiperprodujućih sojeva gljiva se može smatrati ekološki pogodnim što se danas smatra dragocenom osobinom, kada je već podignuta svest o potrebi čuvanja i zaštite čovekove okoline.

Podloga, koja je korišćena za brzu selekciju gljiva, sadrži hranljive soli sa suspendovanom CMC, finalne koncentracije 2%. Sastav soli je takav da omogućava gljivama brz rast, a jedini izvor ugljenika im je CMC. Na taj način je omogućen brz rast samo onim sojevima koji produkuju značajne količine endocelulaza.

3.3 Selekcija endocelulaznih hiperprodukujućeg izolata *Trichoderma* sp.

Upotrebom novo razvijenog testa ispitano je ukupno sto morfološki okarakterisanih izolata *Trichoderma* sp. sakupljenih i izolovanih širom Srbije. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 7.

Od ukupno sto testiranih izolata, 16 izolata *Trichoderma* sp. je selektovano kao dobri produceri endocelulaza. Prve promene u viskoznosti podloge su vizuelizovane nakon samo 22 h od strane 11 izolata, dok je totalno otečnjavanje podloge zabeleženo u 25 h od strane jednog izolata UB483FTH2 (dalje u tekstu označen kao TH2). Ostali sojevi su otečnili podlogu u 30 i 34 h fermentacije. Izolati *Trichoderma* sp. koji su otečnili podlogu u 36 h smatrani su kao sojevi koji sporo i malo produkuju

endocelulazne enzime. Na osnovu dobijenih rezultata brzog testa, za izolat TH2 se može reći da se izdvaja kao hiperprodukujući endocelulazni soj.

Tabela 7. Skrining endocelulaznih hiperprodukujućih izolata *Trichoderma* sp. upotrebom CMC kao supstrata

Izolati		Vreme fermentacije (h)					
		22	24	26	28	30	36
1	FT2	-	-/+	+	++	++	++
2	FT8	++	+	++	++	++	++
3	FT3	-/+	-/+	+	++	++	++
4	FTH1	-	-	+	+	+	+
5	FT9	++	+	++	++	++	++
6	FT10	++	+	++	++	++	++
7	FT11	-	++	+	++	++	++
8	T20	-	-	-/+	-/+	-/+	-/+
9	T27	-	-/+	+	+	++	++
10	T28	-	-/+	-/+	+	+	+
11	FT5	-/+	++	++	+++	++	++
12	T45	-	-	-/+	+	+	+
13	T52	-	-	-/+	+	+	+
14	T67	-	-/+	+	+	+	+
15	T71	-	-	-/+	+	+	+
16	T73	-	-/+	-/+	+	+	+
17	FT7	-/+	+	++	++	++	++
18	FT6	-	-/+	++	++	++	++
19	FT4	-/+	++	++	++	++	++
20	T92	-	-	-/+	-/+	+	+
21	FTH2	+	+	++	++	++	+
22	FTH3	-/+	+	++	++	++	++
23	FTH4	-/+	+	++	++	++	++
24	FTL2	-/+	+	++	++	++	++
25	FTK1	-/+	+	++	++	++	++
26	FTA1	-/+	+	++	++	++	++
27	FTA2	-/+	-/+	++	++	++	++
28	FT13	-/+	+	++	++	++	++
29	FTL3	-/+	+	++	++	++	++
30	FTH 13	-/+	+	++	++	++	++

-/+ : prve male promene u viskoznosti podloge; +: prve promene u viskoznosti podloge, otečnjavanje (polu-tečna faza); ++: kompletno otečnjavanje podloge

Izolovanje i skrining mikroorganizama za produkciju celulaznih enzima je od ogromnog značaja imajući u vidu sve veću potražnju za novim enzimima i njihovoj primeni u biotehnologiji [8]. Činjenica da je produkcija enzima gljivama uspešno indukovana supstratima koje hidrolizuju [296,297] navodi na pretpostavku da prirodno stanište gljiva diktira i produkciju enzima. U tabeli 8 je prikazano poreklo i mesto izolovanja izolata.

Na osnovu prikazanih rezultata može se primetiti da su selektovani endocelulazni izolati *Trichoderma* sp. izolovani sa tri različita tipa podloga (staništa): list kukuruza, gajilište jestivih gljiva i drveća. Dominirajuća komponenta ovih podloga je celuloza, naročito listova kukuruza i drveća, tako da nije iznenađujuće što su ovi izolati pokazali endocelulaznu hiperprodukciju.

Tabela 8. Poreklo izolovanja selektovanih izoalta *Trichoderma* sp.

Oznaka izolata	Podloga sa koje je izolovan	Mesto izolovanja	Godina izolovanja
FT2	Šampinjoni (<i>Agaricus bisporus</i>)	Komirić	2006
FT8	Šampinjoni (<i>Agaricus bisporus</i>)	Komirić	2006
FT3	Šampinjoni (<i>Agaricus bisporus</i>)	Komirić	2006
FTH1	Šampinjoni (<i>Agaricus bisporus</i>)	Požarevac	2006
FT9	Šampinjoni (<i>Agaricus bisporus</i>)	Požarevac	2006
FT10	Šampinjoni (<i>Agaricus bisporus</i>)	Požarevac	2006
FT11	Šampinjoni (<i>Agaricus bisporus</i>)	Požarevac	2006
FT20	Šampinjoni (<i>Agaricus bisporus</i>)	Ugrinovci	2006
FT27	Šampinjoni (<i>Agaricus bisporus</i>)	Ugrinovci	2006
FT28	Šampinjoni (<i>Agaricus bisporus</i>)	Ugrinovci	2006
FT5	Šampinjoni (<i>Agaricus bisporus</i>)	Ugrinovci	2006
T45	Šampinjoni (<i>Agaricus bisporus</i>)	Veliko Gradište	2007
T52	Šampinjoni (<i>Agaricus bisporus</i>)	Institut Zemun	2008
T67	Šampinjoni (<i>Agaricus bisporus</i>)	Institut Zemun	2009
T71	Šampinjoni (<i>Agaricus bisporus</i>)	Mol	2010
T73	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Krnjevo	2010
FT7	Šampinjoni (<i>Agaricus bisporus</i>)	Ogledno Polje Padinska Skela	2006
FT4	Šampinjoni (<i>Agaricus bisporus</i>)	Veliko Gradište	2010
T92	Šampinjoni (<i>Agaricus bisporus</i>)	N. Slankamen	2010
TH2(FTH2)	List kukuruza (<i>Zea mays</i>)	Zrenjanin	2010
FTH3	Drvo iz Botaničke bašte	Beograd	2011
FTH4	Drvo iz Botaničke bašte	Beograd	2011
FTL2	Drvo iz Botaničke bašte	Beograd	2011
FT 13	Šampinjoni (<i>Agaricus bisporus</i>)	Ugrinovci	2008
FTL3	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Bačka Topola	2011
FTK 1	List kukuruza (<i>Zea mays</i>)	Institut za kukuruz	2010
FTA 1	List kukuruza (<i>Zea mays</i>)	Institut za kukuruz	2010
FTA 2	Šampinjoni (<i>Agaricus bisporus</i>)	Veliki Gradište	2007

Sledeći korak u ispitivanju celulaznih producera gljiva roda *Trichoderma* je bila identifikacija potentnih sojeva. Svi ispitivani sojevi su po svojim morfološkim karakteristikama već bili svrstani u rod *Trichoderma* a potentni sojevi su identifikovani do vrste upotrebom tehnika molekularne biologije.

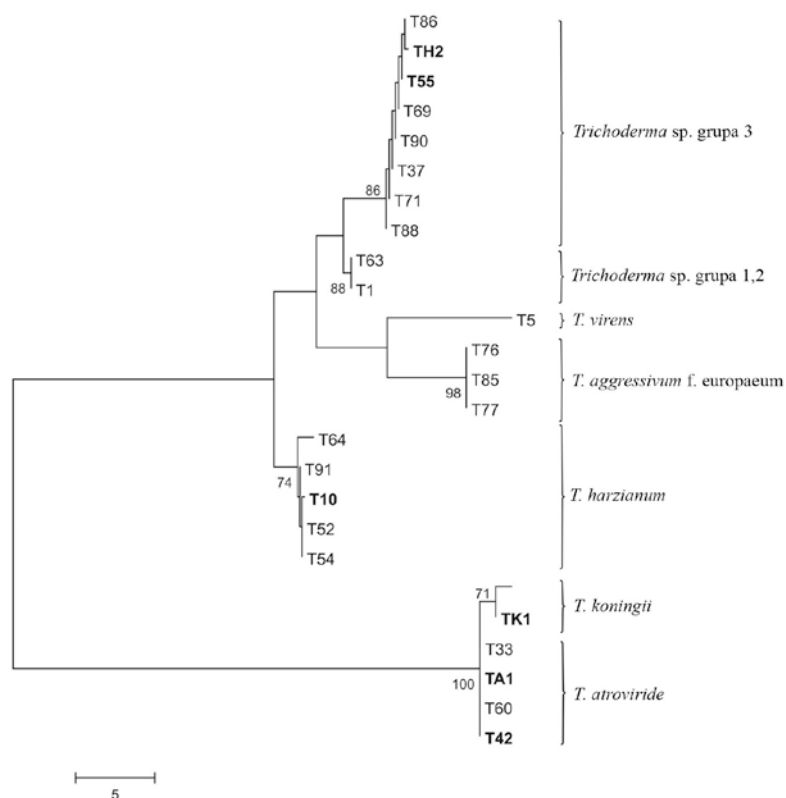
3.4 Identifikacija gljiva roda *Trichoderma*

Molekularna identifikacija na nivou vrste zahteva upotrebu filogenetskih markera koji predstavljaju fragmente kodirajućeg ili nekodirajućeg dela DNA za koje je poznato da nemaju varijacije (konzervativni regioni) u datoj vrsti i čije su sekvence

dostupne za većinu ili sve vrste roda (242). Veliki broj gena (koji poseduju filogenetske markere) se mogu koristiti za identifikaciju gljiva kao na primer: unutrašnji transkripcioni region ITS, *tef1*, mala subjedinicna RNA (SR), RNA polimeraza II najveća subjedinicna (RPB1) kao i mnogi drugi. Identifikacija na nivou vrste morfološki sličnih sojeva ne može se osloniti samo na jedan gen, zato se najčešće analizira veći broj gena [56]. U našem radu korišćena su dva gena za identifikaciju gljiva na nivou vrste: ITS1/4 i *tef1*.

3.4.1 Identifikacija gljiva roda *Trichoderma* na nivou internog transkripcionog spejsera (ITS1/4)

Izolati koji su se pokazali kao dobri produceri endocelulaza na CMC skrining testu identifikovani su na nivou vrste upotrebom ITS1/4 genskog regiona kao filogenetskog markera. Analizirano je ukupno 6 sojeva *Trichoderma* sp (tabela 9). Filogenetsko stablo je prikazano na slici 21.



Slika 21. Filogenetsko stablo konstruisano korišćenjem „parsimony“ metode na osnovu ITS1/4 sekvencija dobijenih od 25 izolata *Trichoderma* spp. Brojevi grana su „bootstrap“ vrednosti dobijene za 1000 replikata (prikazane su samo vrednosti veće od 70%). Analizirani izolati su prikazani zadebljanim slovima dok su ostali izolati opisani u Kosanović et al., 2013 [96]

Micelijum, dobijen na PDA je korišćen za izolovanje DNA upotrebom CTAB (cetiltrimetilamonium bromid) protokola [298], koja je korišćena za PCR amplifikaciju regiona ITS1/4 upotrebom ITS1/ITS4 prajmera [110]. Dobijeni PCR produkti su razdvojeni, izolovani, prečišćeni i sekvencirani. Sekvencije gena su ubačene u NCBI GenBank pod oznakama koji su prikazani na slici 21. Dobijene sekvencije su upoređene sa sekvencama drugih izolata *Trichoderma* izolata koje su prethodno identifikovane i koje se koriste kao reference [96].

Na osnovu analize ITS1/4 sekvence može se videti da su analizirani izolati identifikovani na nivou vrste. Četiri izolata od ukupno 6 (uključujući i već identifikovan soj T10) su identifikovani kao *Trichoderma atroviride* i *Trichoderma koningii*. Izolati TH2 i T55 se svrstavaju u prethodno opisanu grupu kao *Trichoderma* sp. 3 [96].

Tabela 9. Identifikovani *Trichoderma* spp. sojevi amplifikacijom ITS1/4 sekvence

Oznaka izolata (skraćénica)	Naziv soja	Domaćin	Mesto izolovanja	Godina izolovanja
UB483FTK1 (TK1)	<i>Trichoderma koningii</i>	List kukuruza (<i>Zea mays</i>)	Zrenjanin	2010
UB483FTH2 (TH2)	<i>Trichoderma</i> sp. grupa 3	List kukuruza (<i>Zea mays</i>)	Paraćin	2010
UB483FTA1 (TA1)	<i>Trichoderma atroviride</i>	List kukuruza (<i>Zea mays</i>)	Kruševac	2010
UB483FTA2 (TA2)	<i>Trichoderma atroviride</i>	Šampinjoni (<i>Agaricus bisoporus</i>)	Veliko Gradište	2007
UB483FTH1 (TH1)	<i>Trichoderma harzianum</i>	Šampinjoni (<i>Agaricus bisoporus</i>)	Požarevac	2006
UB483FT13 (FT13)	<i>Trichoderma</i> sp. grupa 3	Šitake (<i>Lentinus edodes</i>)	Ugrinovci	2008

Vrste gljiva iz rodova *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Diplodia* spp., *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp. su najčešći kontaminanti kukuruza koji dovode do oboljenja same biljke [299]. Mnogi od ovih kontaminanta proizvode mikotoksine koji su

štetni za sve članove lanca ishrane. Pored poznatog aflatoksina poreklom iz gljiva roda *Aspergillus* pronađeno je da neke vrste *Trichoderma* mogu da produkuju toksin T-2.

Poznato je da gljive iz roda *Trichoderma* kolonizuju podloge koje se koriste za gajenje jestivih gljiva kao što su *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* i *Pleurotus ostreatus* tako da nije iznenađujuće što farme ovih gljiva predstavljaju jedno od mnogobrojnih mesta za njihovo izolovanje [300]. Pored *T. pleurotum*, *T. pleuroticola* i *T. aggressivum* jedna od često izolovanih je i *T. harzianum* [301].

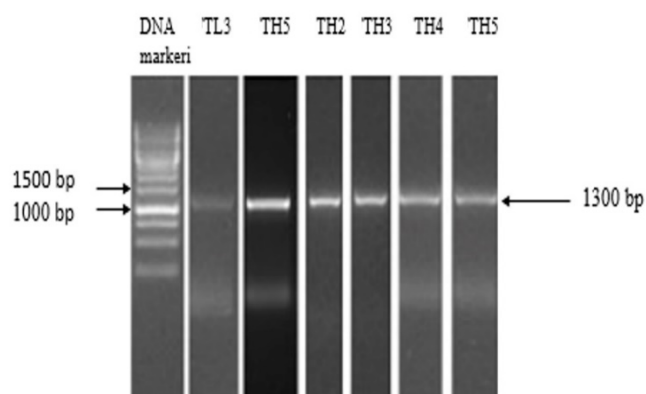
3.4.2 Identifikacija gljiva roda *Trichoderma* na nivou gena translacionog elongacionog faktora 1- α (*tef1*)

Upotrebom brzog testa za selekciju endocelulaznog hiperprodukujućeg soja, 6 izolata koji su u najkraćem vremenskm periodu doveli do promene u viskoznosti podloge identifikovani su na nivou vrste upotrebom *tef1* gena kao filogenetskog markera.

Za amplifikaciju *tef1* gena korišćena je DNA izolovana kao što je opisano u poglavlju 3.4.1. Nakon PCR amplifikacije *tef1* gena upotrebom EF1-728F/TEF1_LLErev prajmera [53] i agarozne gel elektroforeze (slika 22), izolovanje i prečišćavanje PCR produkata je urađeno upotrebom Metabion kita po protokolu proizvođača (prilog 3). Koncentracije DNA i prečišćenih PCR produkata su određene spektrofotometrijski (tabela 10). Nakon prečišćavanja PCR produkti su sekvencirani.

Tabela 10. Koncentracije DNA i prečišćenih PCR produkata izolata *Trichoderma* sp.

Oznaka soja	Koncentracija DNA (ng/ μ L)	Koncentracija PCR produkata (ng/ μ L)
UB483FTH2	3336.2	34.2
UB483FTH3	2443.2	35.8
UB483FTH4	3319.3	32,3
UB483FTL2	70.4	27.4
UB483FTH5	4378.2	27.4
UB483FTL3	2953.5	24

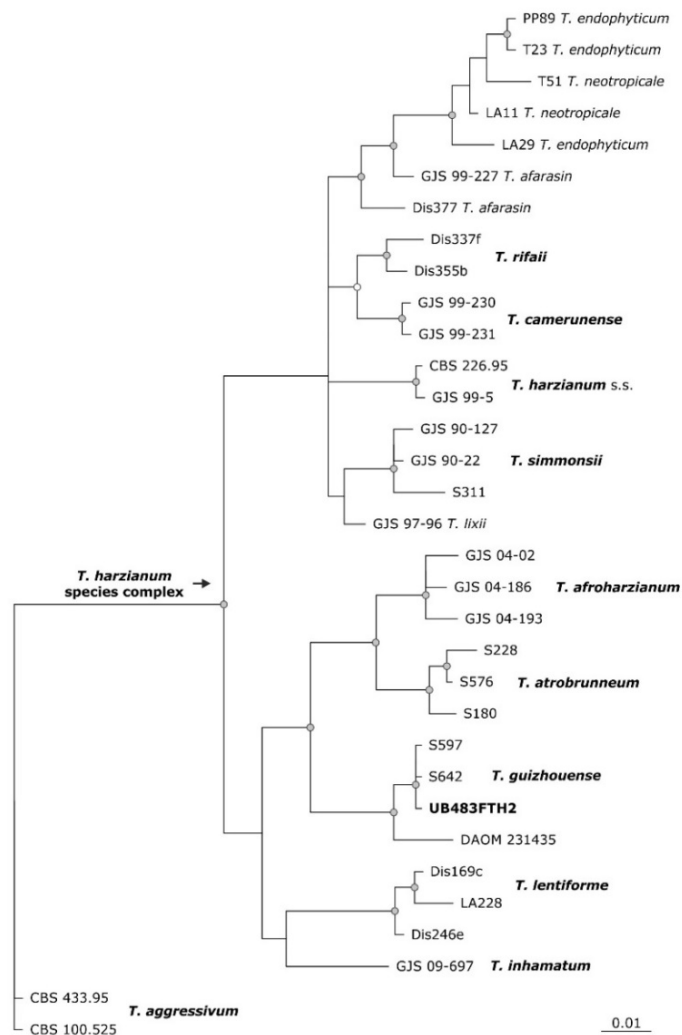


Slika 22. Gel nakon agarozne elektroforeze PCR produkata nakon amplifikacije *tef1* gena

Dobijene sekvencije su analizirane algoritmom koji se najčešće koristi [53]. Prvo su sekvencije analizirane upotrebom *TrichoMARK* [54,302]. Sekvencije su prikazane u prilogu 1. Rezultati analiziranih sekvenci su prikazani u 11.

Tabela 11. Rezultati identifikacije izolata *Trichoderma* spp. upotrebom *tef1* gena

Oznaka soja	Identifikacija NCBI bank
TH2	<i>Trichoderma guizhouensis</i>
TH7	<i>Trichoderma orientale</i>
TH8	<i>Trichoderma simnosii</i>
TL2	<i>Trichoderma simonsii</i>
TH5	<i>Trichoderma guizhouensis</i>
TL3	<i>Trichoderma citrinoviride</i>



Slika 23. Pozicija *Trichoderma* izolata TH2 na osnovu *tef1* upotrebom „Bayesian“ filogenetskog stabla.

Tačke grananja koje su podržane verovatnoćom većom od 94% su označene sivim tačkama. Strelica pokazuje granu koja dolazi od jedne vrste (*T. harzianum*). Ime podvrste u *T. harzianum* kompleksu vrsta i izolat UB483FTH2 su pretsavljene podebljanim slovima. Brojevi ostalih izolata su brojevi iz „GenBank“ baze

Na osnovu dobijenih rezultata izolat TL3 je identifikovan kao *T. citrinoviride* dok je TH7 identifikovan kao *T. orientale*. Ostala četiri izolata su identifikovana kao *T. simonsii* i *T. guizhouensis* koji pripadaju *T. harzianum* kompleksu vrsta. S obziroma da je duži niz godina *T. harzianum* vrsta opisivana kao „zbirne vrste“ veliki broj filogenetskih istraživanja je bio usmeren na identifikaciji na nivou vrste u okviru ovog kompleksa [56,79]. Pokazano je da se u okviru ove vrste nalazi 7 podvrsta što je predstavljalo jedan novi vid identifikacije *Trichoderma harzianum* kompleksa vrsta [56]. Identifikacija nekih izolata je ostala nerazjašnjena i oni su ostali pod imenom

'pseudoharzianum matrix' [79]. Tokom 2015 godine ove vrste su reidentifikovane tako da po najnovijoj identifikaciji *T.harzianum* kompleks obuhvata 14 vrsta [84]. Na osnovu sekvencija ovih identifikovanih vrsta, naši izolati su identifikovani kako je naznačeno u tabeli 13. S obzirom na to da je izolat TH2, pokazao najveću endocelulaznu aktivnost upotrebom testa za brzi skrining, za njega je urađena filogenetska analiza. Filogenetsko stablo je prikazano na slici 23.

Na osnovu filogenetske analize može se videti da izolat TH2 (UB483FTH2) pripada *T. harzianum* kompleksu vrsta i da je identifikovan kao *T. guizhouense*.

3.5 Produkcija celulaza *T. guizhouense* TH2

Prvi korak u produkciji enzima mikrobiološkim putem predstavlja optimizacija uslova gajenja na odgovarajućem supstratu. Kako bi se našli najbolji uslovi za produkciju celulaznih enzima izolat TH2 je gajen na netretiranoj slami, u uslovima tečne fermentacije (SmF), pri čemu su ispitivani uticaji sledećih parametara: količina supstrata, brzina mešanja, tipovi inokulacije i izvor azota.

U toku izrade ovog rada korišćena je slama kao sirovi materijal, bez predhodnog pretretmana. Na ovaj način je za cilj postavljena selekcija i primena posebne grupe sojeva gljiva iz roda *Trichoderma* koje proizvode najširi mogući dijapazon lignocelulolitičkih enzima. Za ispitivanje produkcije enzima celulaznog kompleksa slama je korišćena kao supstrat u SmF uslovima. Da bi se postigao najviši mogući nivo produkcije kod svakog soja potrebno je optimizovati nekoliko ključnih faktora produkcione fermentacije kao što su količina supstrata, pH produkcionog medijuma, temperatura, uslovi mešanja, uticaj azota i ugljenika, tip i količina inokuluma i kao i fermentaciono vreme. Zato je preporučljivo da se koristi SmF gde je upravo kontrola produkcije enzima i rasta gljiva omogućena [262,303].

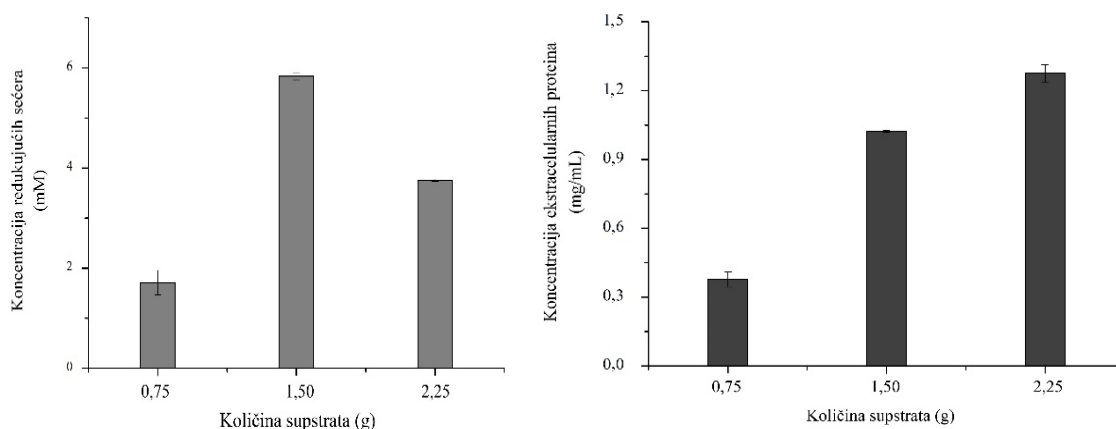
3.5.1 Ispitivanje uticaja količine supstrata na produkciju celulaza

Korišćene su 3 različite količine supstrata (0,75, 1,5 i 2,25 g slame) kojima je dodat minimalni hranljivi medijum na pH 6,5. Podloge su inokulisane rastvorom spora u odnosu 1:18 koncentracije 1×10^5 spora/mL. Fermentacija je trajala 7 dana u orbitalnom šejkeru na 28°C i 150 rpm.

Čvrsti deo, slama sa biomasom, je odvojen od FT ceđenjem, kako bi se dobio bistri sirovi ekstrakt, fermentaciona tenost (FT) koja je centrifugirana i korišćena za analizu.

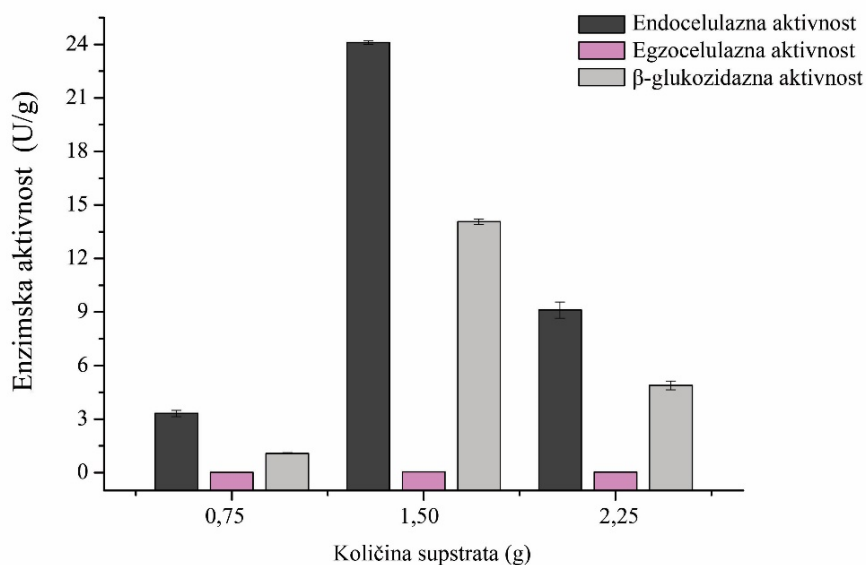
U ispitivanim uzorcima izmerene vrednosti konduktivita i pH su veoma slični. Vrednost konduktiviteta u uzorcima se kretao u opsegu 5,4-5,8 dok je pH vrednost iznosila između 5,3-5,6.

U FT je analizirana koncentracija redukujućih šećera i proteina (slika 24) kao i endocelulazna, egzocelulazna i β -glukozidazna aktivnost (slika 25). Upotrebom DNS reagensa [304] je određena koncentracija redukujućih šećera i kao standard je korišćena glukoza. Koncentracija ukupnih proteina određena je po Bradfordu [305]. Količina redukujućih šećera na kraju produkcione fermentacije može se koristiti kao prvi indikator nivoa produkovanih celulaza zato što ukazuje na količinu razgrađenog početnog supstrata. Količina produkovanih ukupnih proteina takođe može da ukazuje na to da li u određeni uslovi fermentacije pogodni za produkciju celulaza.



Slika 24. Koncentracija redukujućih šećera i proteina u zavisnosti od količine supstrata

Na osnovu dobijenih rezultata na slici 24 može se primetiti da je najveća koncentracija redukujućih šećera dobivena upotrebom 1,5 g slame. Upotrebom veće i manje količine supstrata od 1,5 g koncentracija redukujućih šećera je manja. Najveća koncentracija ekstracelularnih proteina je dobijena nakon gajenja izolata TH2 upotrebom 2,25 g slame kao supstrata.



Slika 25. Produkcija endocelulaza, egzocelulaza i β -glukozidaza u zavisnosti od količine supstrata

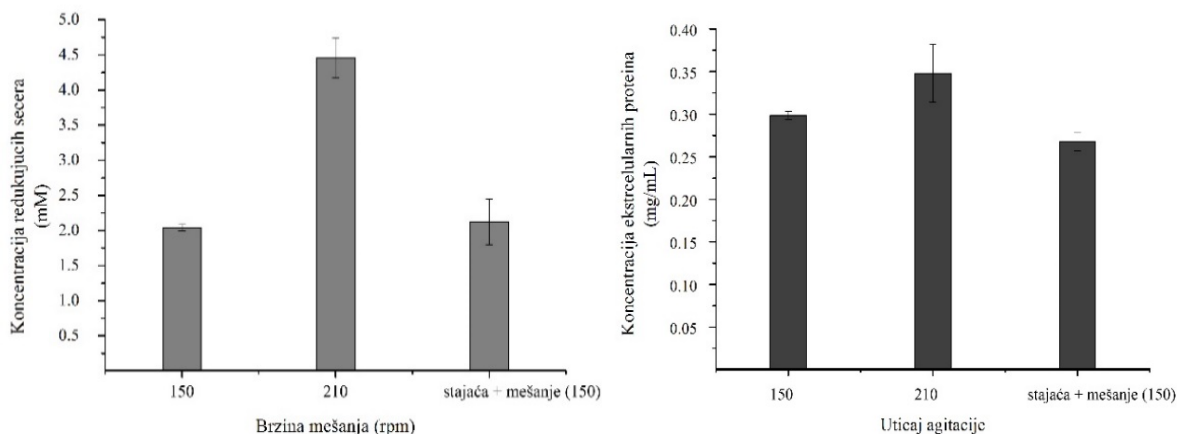
Rezultati pokazuju da se najveća količina celulaznog kompleksa enzima dobija prilikom gajenja izolata TH2 na 1,5 g supstrata. Količina supstrata od 1,5 g je optimalna za najveću produkciju celulaznog kompleksa enzima, te je u daljim istraživanjima korišćeno po 1,5 g slame.

3.5.2 Ispitivanje uticaja brzine mešanja na produkciju enzima

Mešanje predstavlja veoma bitan faktor za rast gljiva i produkciju enzima tokom fermentacije, jer obezbeđuje dostupnost kiseonika i hranljivih materija iz medijuma ćelijama mikroorganizama [306]. Za svaku pojedinačnu produkciju enzima je značajno da se pronađu optimalni uslovi mešanja usklađene sa prirodom gljive i sastavom medijuma koji se koristi.

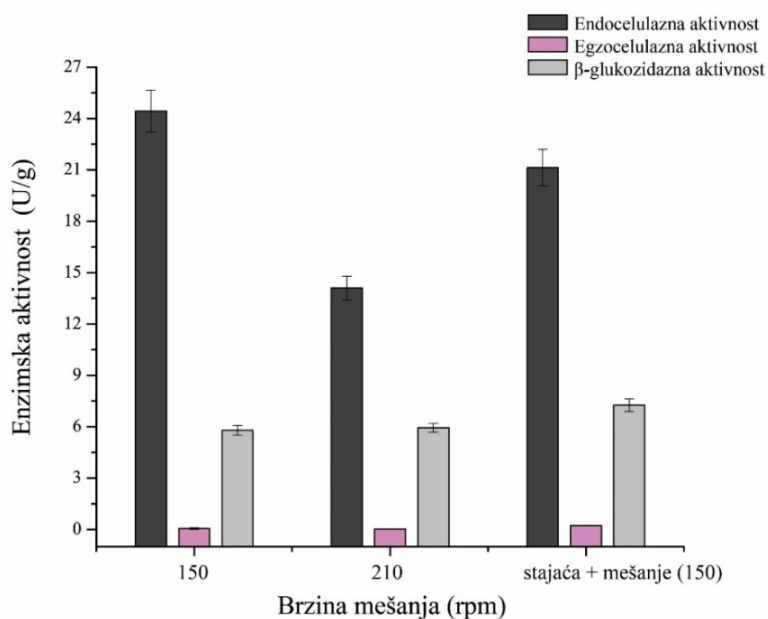
Ispitivana su dve brzine mešanja 150 rpm i 210 rpm. Takođe, ispitan je i uticaj kombinovanih uslova gajenja koji uključuje gajenje u uslovima stajaće kulture tokom 4 dana i mešanja na 150 rpm tokom sledeća 3 dana.

U FT su izmerene pH vrednosti i konduktivitet. Najmanji konduktivitet, 5,34 mS/cm, je dobijen pri uslovima mešanja od 210 rpm, dok je pri mešanju od 150 rpm i kombinovanim uslovima iznosio 6,73 i 6,37, respektivno. Vrednost pH je slična u svim uzorcima i iznosila je između 5,6-6,0. Rezultati analize koncentracije redukujućih šećera i proteina u FT su prikazani na slici 26.



Slika 26. Koncentracija redukujućih šećera i proteina u zavisnosti od brzine mešanja

Na osnovu rezultata prikazanih na slici 26 može se primetiti da u uslovima mešanja brzinom od 210 rpm je dobijena najveća količina redukujućih šećera, kao i koncentracija ekstracelularnih proteina. Gajenjem u kombinovanim uslovima (bez mešanja 4 dana pa na 150 rpm 3 dana) dobijena je najmanja količina proteina, dok je nivo redukujućih šećera isti kao pri brzini mešanja od 150 rpm. Nivoi produkovanih celulaza su prikazani na slici 27.



Slika 27. Produkcija endocelulaza, egzocelulaza i β-glukozidaza u zavisnosti od količine supstrata

Pri mešanju od 150 rpm dobivena je najbolja produkcija celulaznog kompleksa enzima, dok se produkcija pojedinačnih enzima razlikuje na različitim brzinama mešanja. Izolat TH2 produkuje najveću količinu endocelulaza na 150 rpm, dok je produkcija egzocelulaza veća na 210 rpm. Nivo produkcije β-glukozidaze ne zavisi od

uslova mešanja. Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima [307]. Ovi rezultati ukazuju na to da je moguće usmeriti fermentaciju na produkciju jednog enzima iz celulaznog kompleksa ili upotrebom optimalnih uslova brzine mešanja proizvoditi sve enzime iz kompleksa. Ovim je potvrđen značaj optimizacije fermentacije.

3.5.3 Ispitivanje uticaja inokulacije na produkciju enzima

Tipovi inokulacije imaju veoma veliki uticaj u formiranju micelijuma, rasta gljiva, metabolizma i produkcije celulaznih enzima [308]. Iz tog razloga je neophodno pronaći optimalan način gajenja kako bi se proizvela veća količina celulaznih enzima.

Ispitivana su tri tipa inokulacije: supenzija spora, miceliarni disk i miceliarni inokulum.

3.5.3.1 Suspenzija spora

Spore su skupljene nakon 7 dana rasta micelijuma na PDA podlozi na 28°C. Broj spora je određen kao što je opisano u poglavlju 3.5.1. Za inokulaciju je korišćen rastvor spora koncentracije 1×10^5 spora/mL i zasejan je u odnosu 1:18 u odnosu na ukupnu količinu medijuma.

3.5.3.1.1 Određivanje broja spora za inokulaciju

Konstrukcija standardne prave za broj spora se zasnivao na merenju optičke gustine (OD) suspenzije spora na talasnoj dužini od 605 nm u kome je prethodno određen broj spora, brojanjem pod mikroskopom upotrebom hemocitometra (Neubauer Chamber). U polaznoj koncentraciji spora, čiji je OD iznosio $\sim 1,00$, određen je broj spora koji je iznosio $1,06 \times 10^5$ spora/mL. Od ovog rastvora spora napravljena je serija razblaženja različitih koncentracija spora. Svim razblaženjima spora je određen broj spora/mL brojanjem spora upotrebom hemocitometra.

3.5.3.2 Miceliarni inokulum

Miceliarni inokulum je dobijen germinacijom spora gajenjem u tečnom medijumu. Korišćene su spore dobivene nakon rasta izolata 7 dana i 14 dana na PDA podlozi. Inokulum 1 (I1) je dobijen germinacijom spora u toku 4 h na 150 rpm i 28°C.

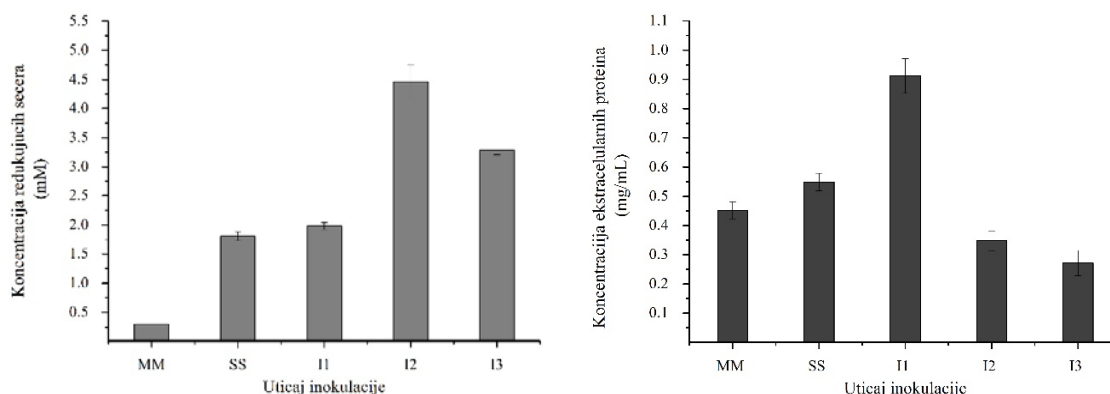
Inokulum 2 (I2) je dobijen kultivacijom tokom 48 h na 210 rpm i 28°C, dok je inokulum 3 (I3) dobijen na isti način, ali su korišćene spore dobijene ekstrakcijom sa micelijuma koji je gajen 14 dana na PDA podlozi. Dobivene konidije su korišćene za inokulaciju fermentacionog medijuma u koncentraciji 10%.

3.5.3.3 Miceliarni disk

Kockice maltoznog agara sa micelijumom i sporama (gajeni 7 dana na 28°C) veličine 0,5 x 0,5 cm su isečene i po jedan komad su zasejane u fermentacioni medijum.

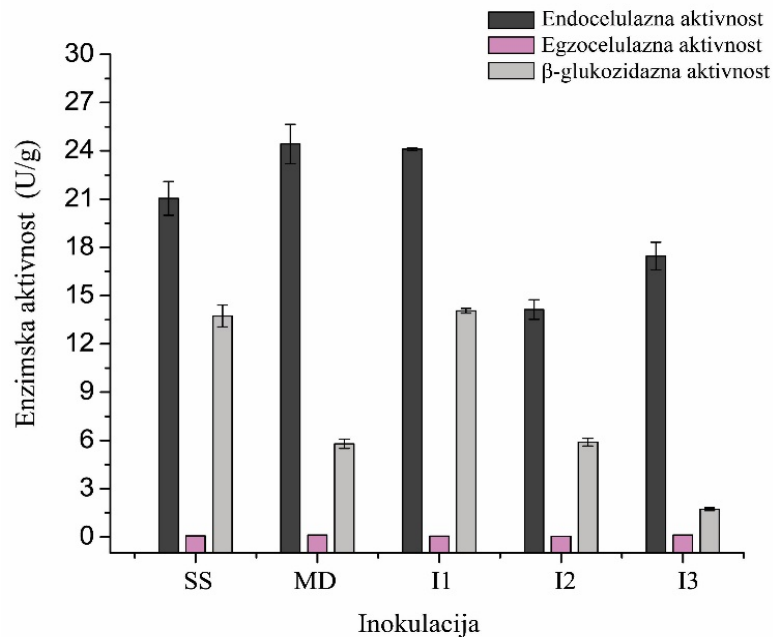
Vrednosti konduktiviteta u FT za ispitivane tipove inokuluma su se kretale između 5,54 mS/cm za suspenziju spora i 6,02 mS/cm za miceliarni disk, dok su za inokulume vrednosti bile u ovom opsegu. Najmanja vrednost pH (5,27) je dobivena u inokulumu 3 dok je najveća (6,73) izmerena u uslovima inokulacije miceliarnim diskom. Interesantna razlika je uočena u vrednostima pH za inokulum 1, koja je iznosila 6,63 dok je za inokulume 2 i 3 iznosila za više od jedne pH jedinice niže vrednosti (5,34 i 5,2, respektivno). Ovo je još jedna potvrda kako različiti uslovi fermentacije, tačnije inokulacije, mogu uticati na metabolizam i fiziologiju gljiva.

U FT dobijenim nakon gajenja TH2 pri različitim tipovima inokulacije analizirana je koncentracija redukujućih šećera i proteina, a rezultati su prikazani na slici 28.



Slika 28. Koncentracije redukujućih šećera i koncentracije ekstracelularnih proteina u zavisnosti od tipa inokulacije. SS- suspenzija spora; MD- miceliarni disks; Inokulum 1, 2 i I3

Produkcija enzima celulaznog kompleksa je poređena u FT dobijenim različitim tipovima inokulacije fermentacije, a rezultati su prikazani na slici 29.



Slika 29. Produkcija endocelulaza, egzocelulaza i β -glukozidaza u zavisnosti od tipa i vrste inokuluma. SS- suspenzija spora; MD- miceliarni disks; Inokulum 1, 2 i I3

Produkcija celulaznog kompleksa enzima je veoma slična u svim ispitivanim uslovima inokulacije (suspenzija spora, miceliarni disk i inokulum). Produkcija endocelulaza i egzocelulaza je sličana u sva tri tipa inokulacija. Međutim, produkcija β -glukozidaze je najveća upotrebom I1. S obzirom na to da je produkcija kompletnog celulaznog kompleksa enzima neophodna za degradaciju lignocelulozne biomase i da je cilj ovih ispitivanja bio da se odrede optimalni uslovi za produkciju celulaznog kompleksa, na osnovu dobijenih rezultata može se reći da inokulacija upotrebom inokuluma favorizovana u odnosu na ostale tipove inokulacije (suspenzija spora i micelialni disk). Istovremeno, upotreba inokuluma obezbeđuje najhomogeniju inokulaciju i unos samo živih aktivnih mikroorganizama. Upotreba inokuluma omogućava ispitivanje ostalih parametara fermentacije na produkciju enzima i iz tog razloga predstavlja metodu izbora u produkciji celulaznog kompleksa enzima [162].

3.5.4 Ispitivanje uticaja azota na produkciju celulaza

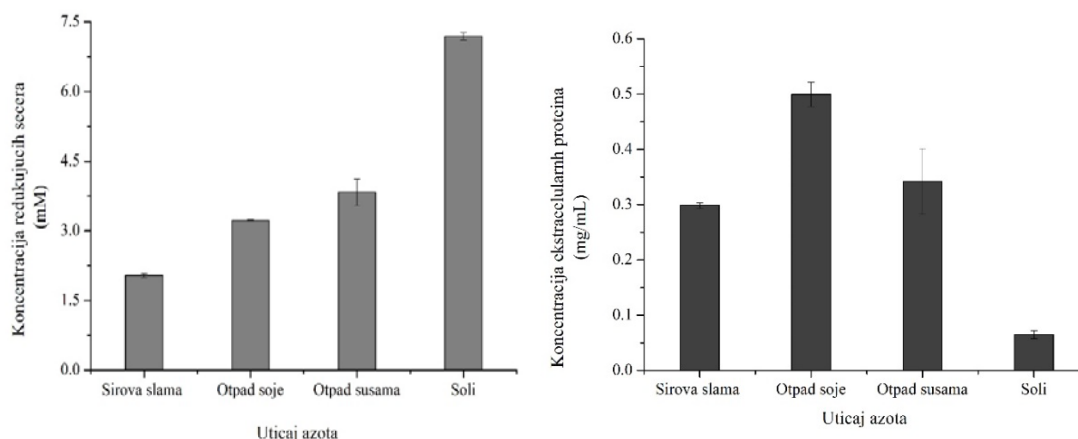
Industrijski važni mikroorganizmi mogu da koriste organski i neorganski izvor azota. Za produkciju celulaznih enzima kao organski izvori azota najčešće se koriste: mesni ekstrakt, kvašev ekstrakt i pepton [309]. Međutim, upotreba ovih izvora azota

povećava i cenu proizvodnje ovih enzima i bilo bi zgodno da se zamene prirodnim sirovinama ili još bolje otpadnim materijalima.

Za ispitivanje uticaja azota na produkciju celulaznog kompleksa enzima, kao prirodni izvori azota, korišćena su dva tipa poljoprivrednih otpadnih materija: sojin otpad i otpad susama, koji su bogati proteinima, a zaostaju kao otpad u procesima dobijanja industrijskih proizvoda. Sojin otpad su samlevene sojine stabljike i mahune, dok je otpad susama dobiven nakon prerade susamovog mleka.

Podloga sa slamom (1,5 g) je fortifikovana sa 1,5 g sojinog otpada i vlažnim otpadom susama 1,2 g. Amonijum-sulfat (1,4 g/L) i urea (0,3 g/L) su korišćeni kao sintetički izvori azota.

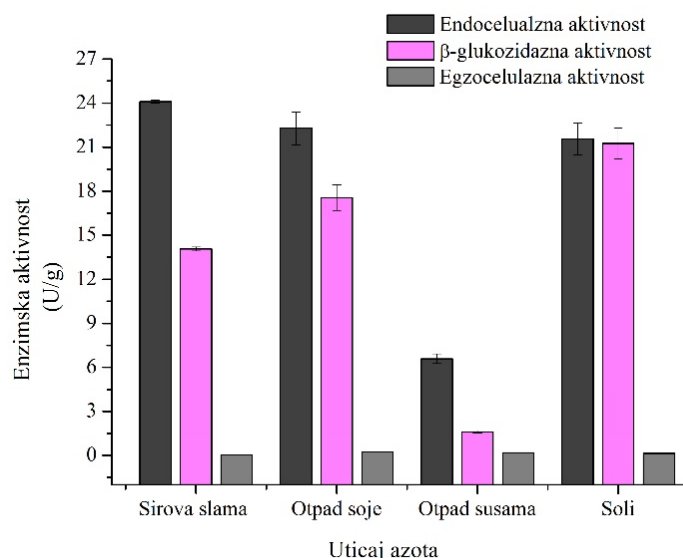
Izmerene vrednosti konduviteta i pH pokazuju da je nakon fermentacije u uslovima sintetičkog izvora azota (soli) u FT konduktivet (22, 9 mS/cm) i pH (8,46) veći u odnosu na otpad susama (2,78 mS/ cm i pH 7,43) i otpad soje (5,64 mS/cm i pH 6,52).



Slika 30. koncentracije redukujućih šećera i ekstracelularnih proteina u zavisnosti od izvora azota

Rezultati prikazani na slici 30 pokazuju da se najveća količina redukujućih šećera dobija u uslovima gajenja sa solima kao izvorom azota, dok se najveća produkcija proteina dobija u uslovima gajenja sa otpadom soje kao izvorom azota.

Takođe, u FT je određena i endocelulazna, egzocelulazna i β -glukozidazna aktivnost (slika 31).



Slika 31. Produkcija endocelulaza, egzocelulaza i β -glukozidaza u zavisnosti od izvora azota

Obogaćivanjem slame sa otpadnim poljoprivrednim materijalima i veštačkim solima dovodi do veoma slične produkcije ukupnog celulaznog kompleksa enzima. Upotreba sojinog optada kao izvora prirodnog azota dovodi do povećanja β -glukozidazne produkcije u odnosu na upotrebu nefortifikovane slame, dok je produkcija endocelulaze slična.

Prikazani rezultati produkcije celulaza na sojinom otpadu su u skladu sa literaturom [310]. Korišćenje sintetičkog izvora azota, u poređenju sa nefortifikovanom slamom, kao posledicu ima skoro identične nivoe produkcije endocelulaze, ali je produkcija β -glukozidaza veća u odnosu na slamu i fortifikaciju slame sojinim otpadom. Literaturni podaci pokazuju da upotreba medijuma obogaćenih različitim izvorima azota (amonijum-sulfat, urea, natrijum-nitrat i drugim solima) dovode do povećanja produkcije celulaznog kompleksa enzima, među kojima najviše β -glukozidaznu produkciju [311]. Prikazani rezultati ukazuju na to da je moguće zameniti sintetički izvor azota sojinim otpadnim materijalom što može uticati na smanjenje troškova proizvodnje celulaznih enzima i očuvanju životne sredine [312,313].

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su optimalni uslovi za gajenje izolata TH2 za produkciju celulaznog enzimskog kompleksa:

Upotreba 1,5 g netretirane sirove slame u minimalnom medijumu uz mešanje na 150 rpm, inokulacijom sa micelijumom dobijenim kultivacijom spora gljive TH2 tokom 48 h na 210 rpm.

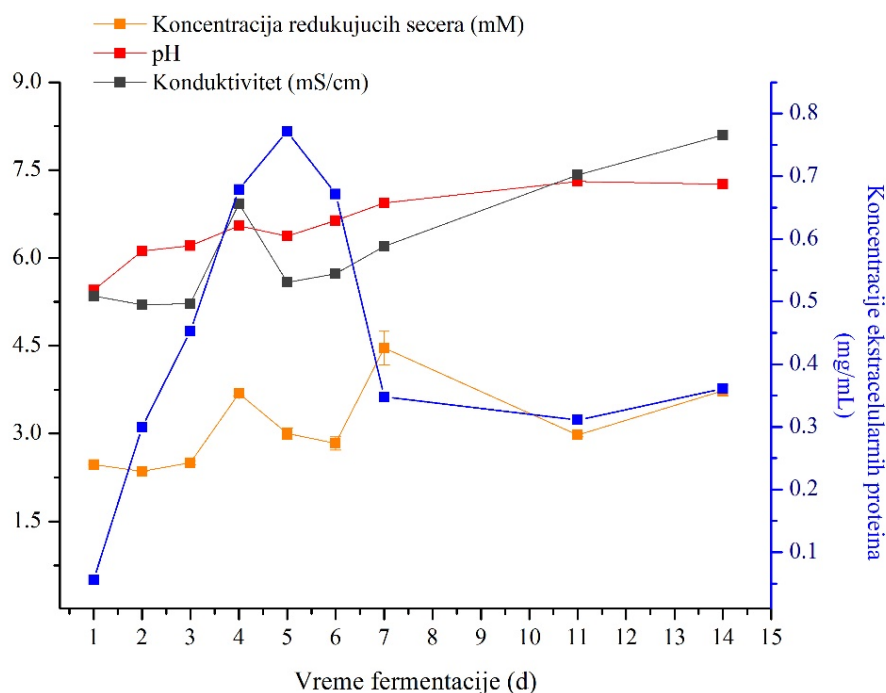
3.5.5 Produkcija celulaza tokom fermentacije

Produkcija celulaza u veoma kratkom periodu smanjuje cenu produkcije enzima što je veoma bitno za industrijske postupke [314].

Za praćenje kinetike celulaznih enzima korišćeni su optimizovani uslovi opisani gore u tekstu. Fermentacija je prekidana u 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11 and 14 danu fermentacije.

Rezultati pH vrednosti i konduktiviteta (slika 31) pokazuju da tokom fermentacije dolazi do promene, tačnije njihove vrednosti se povećavaju. U 4 danu fermentacije zabeležen je prvi maksimum pH vrednosti i konduktiviteta. Nakon toga, u 5 danu fermentacije obe vrednosti naglo opadaju da bi nakon toga do kraja fermentacije bio zabeležen rast obe vrednosti sa maksimumima u 14 danu fermentacije. Uzrok njihovog povećanja je najverovatnije produkcija metabolita koji dovode do povećanja pH vrednosti, dok njihova povećana produkcija dovodi do povećanja konduktiviteta.

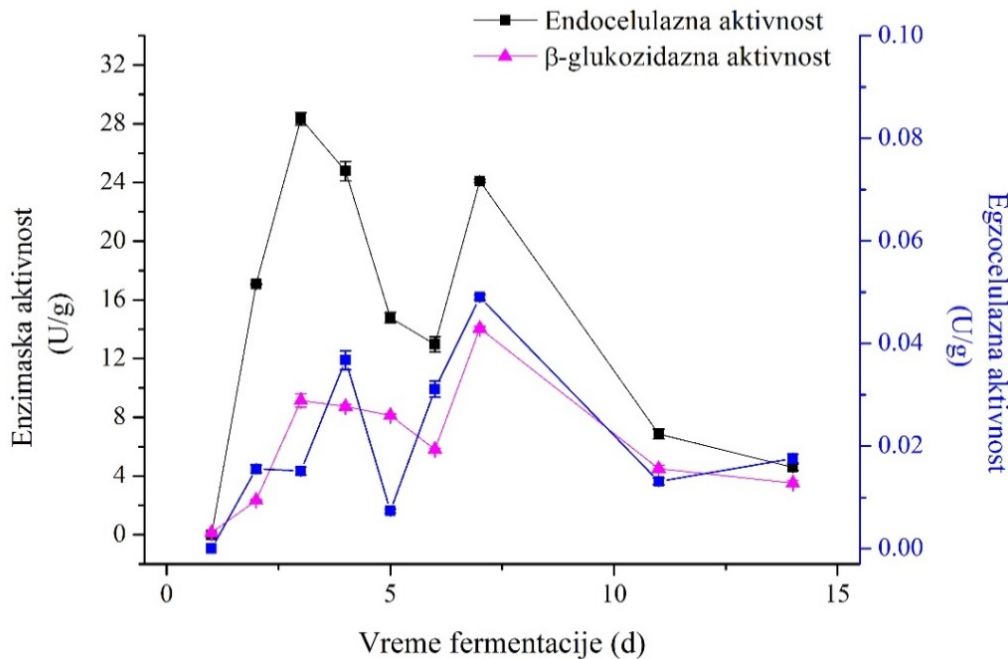
U FT je dobijenim nakon gajenja TH2 tokom vremena fermentacije analizirana koncentracija redukujućih šećera i proteina (slika 32).



Slika 32. Analiza pH vrednosti i konduktiviteta, i koncentracije redukujućih šećera i koncentracije ekstracelularnih proteina tokom vremena fermentacije

Produkcija redukujućih šećera tokom vremena fermentacije pokazuje dva maksimuma produkcije, u četvrtom i u sedmom danu fermentacije dok je produkcija proteina maksimalna u 5 danu fermentacije.

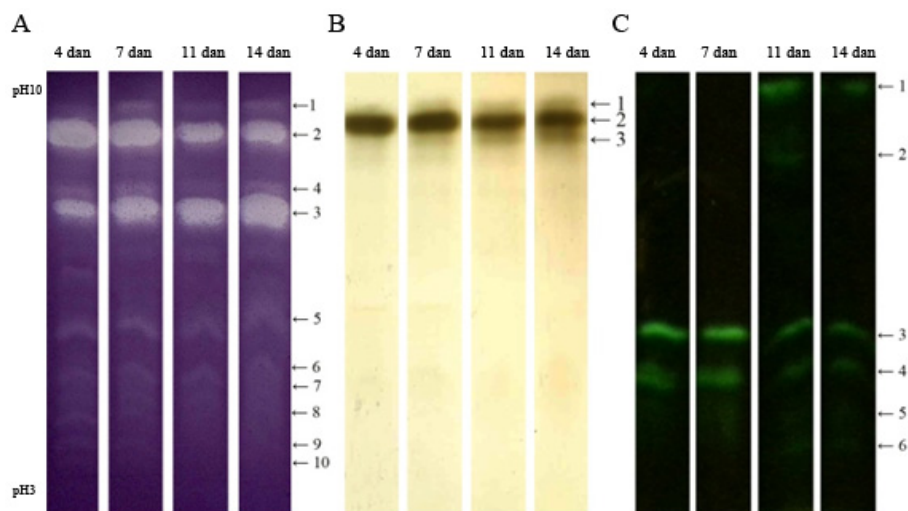
Produkcija endocelulazna, egzocelulazna i β -glukozidazna tokom vremena fermentacije je prikazana na slici 33.



Slika 33. Produkcija endocelulaza, egzocelulaza i β -glukozidaza tokom vremena

Na osnovu grafika zavisnosti enzimske produkcije od vremena (slika 33) može se zaključiti da je maksimum endocelulazne produkcije (28,32 U/g) u trećem danu, egzocelulazne produkcije (0,049 U/g) nakon 5 dana i β -glukozidazne produkcije nakon 7 dana fermentacije. Literaturni podaci pokazuju istu dinamiku produkcije enzima celulaznog kompleksa i u skladu je sa procesom hidrolize celuloze [86]. Prvi korak u degradaciji celuloze započinje endocelulaza oslobađajući oligosaharide koji su supstrat za egzocelulazu i β -glukozidazu, što se potvrđuje maksimumom njihove produkcije u 3 danu fermentacije. Aktivnošću egzocelulaze, sa maksimumom u 5 danu fermentacije, dolazi do hidrolize oslobođenih oligosaharida, pri čemu se dobijaju molekuli celobioze koji su supstrat i induceri za β -glukozidaznu produkciju, koja svoj maksimum produkcije postiže u 7 dana fermentacije.

Produkcija celularnog kompleksa enzima (endocelulaze, egzocelulaze i β -glukozidaze) praćena je i zimogramskom metodom. Profil celularnih izoformi je detekovan na način opisan u odeljku 3.6. Rezultati zimogramske detekcije su prikazani na slici 34.



Slika 34. Zimogramska detekcija endocelulazna (A); β -glukozidaza (B) i egzocelulaza (C) tokom vremena fermentacije (4, 7, 11 i 14 dan fermentacije)

Izoenzimski profili celularnih enzima se razlikuju tokom vremena fermentacije. Intenzitet glavnih endocelularnih izoformi (2 i 3) tokom vremena fermentacije se menja. U 4 danu i 7 danu fermentacije intenzitet izoforme 2 je veći, a u 11 i 14 danu je slabiji, dok je intenzitet izoforme 3 obrnut, jači je u 11 i 14 danu fermentacije. Uzimajući u obzir da je maksimum aktivnosti endocelularna u 3 danu fermentacije, može se pretpostaviti da izoforma 2 ima dominantniju ulogu u hidrolizi celuloze u odnosu na ostale endocelularne izoforme. Glavne egzocelularne izoforme (3, 4, 5 i 6) su prisutne tokom cele fermentacije. Međutim, njihov intenzitet se smanjuje u 11 i 14 danu, dok se detektuju dodatne dve izoforme (1 i 2). Tokom vremena fermentacije detektovane su tri β -glukozidazne izoforme od kojih je izoforma 2 dominantna tokom cele fermentacije, dok se intenzitet izoformi 1 i 3 povećava u 11 i 14 danu fermentacije.

Pojava novih izoformi kod sva tri enzima iz celularnog kompleksa nakon sedmog dana produkcione fermentacije se može pripisati sposobnosti gljive da na ovaj način prevaziđe nepovoljne uslove sredine – visoku koncentraciju metabolita i proizvoda hidrolize celuloze koji inhibiraju dalju produkciju celulara. Takođe, na ovaj način gljive prevazilaze i uticaj proteaza koje su dominantne u FT [315]. Opisanim

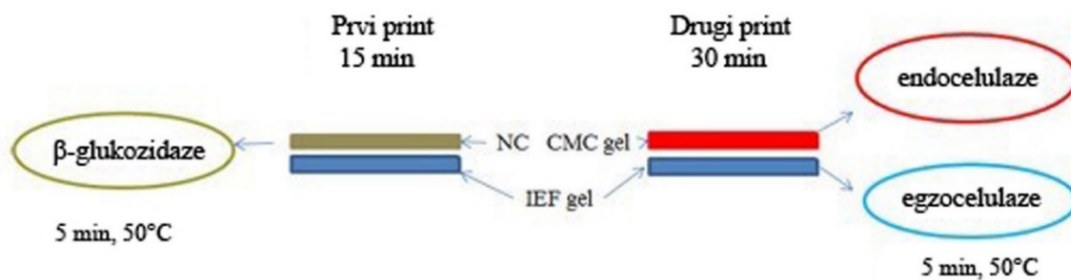
mehanizmima gljive obezbeđuju sebi hranljive materije za rast i razvoj što dovodi i do maksimalnog iskorišćavanja supstrata na kome raste i naravno dobijanje proizvoda hidrolize u što većoj količini. Upravo kompleksni mehanizmi koji omogućavaju gljivama sposobnost brzog prilagođavanja novim uslovima sredine, favorizuju upotrebu gljiva za hidrolizu lignocelulolitičkih materijala *in situ* [316,317].

3.6 Razvijanje zimograma za simultanu detekciju pojedinačnih enzima celulaznog kompleksa

Usled potrebe za brzom i pouzdanom metodom za identifikaciju i analizu dva ili više industrijski važna enzima u jednom uzorku u okviru ciljeva izrade ove disertacije postavljeno je i razvijanje posebne vrste simultanih zimograma [211,318]. Među gljivama producerima celulaza najcenjeniji su oni sojevi koji produkuju sva tri enzima iz kompleksa: endocelulazu, egzocelulazu i celibiazu. Poznato je da soj *T. reesei* produkuje dve celobiohidrolaze, osam endoglukanaza i sedam β -glukozidaza što je potvrđeno na genetičkom nivou [71]. Za potrebe pravilnog tumačenja rezultata dobijenih u toku rada neophodno je koristiti neki brzi test za istovremenu detekciju sva tri enzima. Testovi za brzu selekciju hiperprodukujućih celulaznih sojeva *Trichoderma* sp., kao i enzimski eseji za detekciju ovih enzima ne obezbeđuju dovoljno informacija o tipu ili osobinama ovih enzima. U okviru izrade ovog rada razvijena je specifična zimogramska tehnika za istovremenu detekciju sve tri celulaze [18].

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.

Zimogramskoj detekciji predhodi elektroforetsko razdvajanje proteina u nativnim uslovima, odnosno IEF. Proteini iz ispitivanih FT se razdvajaju IEF-em u pH gradijentu od 3-9. Zatim se celulaze iz IEF gela printuju u dva koraka u skladu sa shemom prikazanom na slici 35 [18].



Slika 35. Shematski prikaz zimografske detekcije celulaza. NC-nitrocelulozna membrana; CMC-carboksimetil celuloza; IEF gel-akrilamidni gel nakon IEF

3.6.1 Zimografska detekcija celobiazne

Proteini sa IEF gela su transferovani na nitroceluloznu membranu (NC) kapilarnim silama 15 minuta, kao što je prikazano na slici 35. Na NC membrani su detektovane β -glukozidazne izoforme upotrebom eksulina kao supstrata [218]. Na mestima aktivnosti β -glukozidaze detektovane su tamno-braon trake, slika 36A.

3.6.2 Zimografska detekcija endocelulaza

Nakon završenog printa na NC membranu, proteini sa IEF gela su dodatno printovani na akrilamidni gel sa kopolimerizovanim supstratom za endocelulazu (CMC) 30 minuta. Za vizualizaciju endocelulaza gel je obojen rastvorom Kongo crveno. Mesta na kojima su endocelulaze hidrolizovale CMC se vide kao prosvetljene zone, slika 36B.

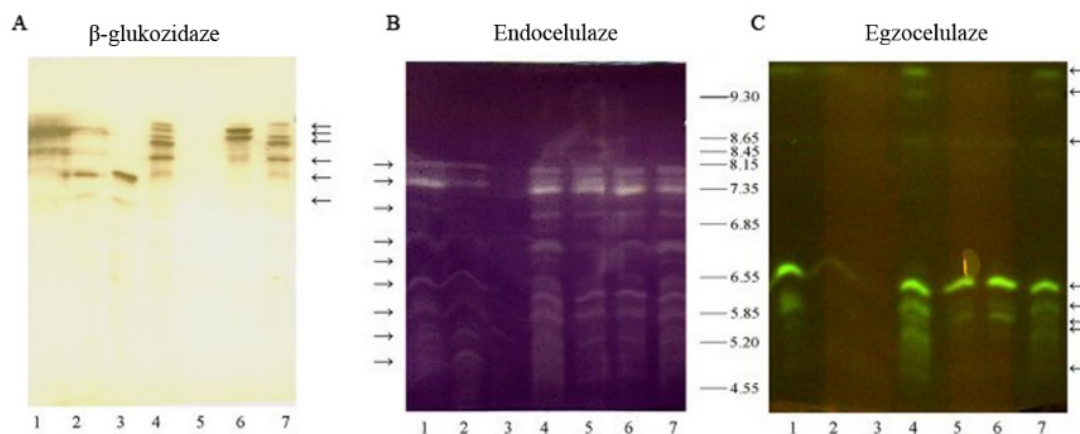
3.6.3 Zimografska detekcija egzocelulaza

Nakon oba printa IEF gel je korišćen za detekciju egzocelulaza. Kako je MUC istovremeno supstrat i za β -glukozidazu u detekciji egzocelulaza uz supstrat MUC dodavan je i D-glukono- δ -lakton koji kompletno inhibira β -glukozidaze [219,319], slika 36C. Kao supstrat je korišćen MUC od koga nakon hidrolize celobiozida nastaje proizvod koji je obojen zeleno pod dejstvom UV svetla [214].

Jedna od najvećih vrlina simultanog zimografskog eseja je to što se sva tri tipa celulaza mogu detektovati direktno iz fermentacionih tečnosti bez njihove prethodne pripreme.

Uzorci (1-7):

1. *Trichoderma* sp. 1 SmF mešavina slame i sojinih stabljika (1,28 μg proteina)
2. *Trichoderma* sp. 2 SmF sirova netretirana slama (14,12 μg proteina);
3. *Trichoderma* sp. 3 SmF sirova netretirana slama (16,2 μg proteina)
4. *Trichoderma* sp. 1 SmF sirova netretirana slama (19,24 μg proteina)
5. *Trichoderma* sp. 1 SmF sirova tretirana slama (14,16 μg proteina)
6. *Trichoderma* sp. sirova netretirana slama u uslovima polu-stajaće fermentacije (semi-solid state fermentacija-SSSF) (16,64 μg proteina)
7. *Trichoderma* sp. 1 sirova netretirana slama (19,24 μg proteina).



Slika 36. Simultana zimogramska detekcija celulaznih izoformi nakon IEF. A) Detekcija β -glukozidaze na NC membrani; B) Detekcija endocelulaze sa CMC; C) Detekcija egzocelulaze upotrebom MUCa kao supstrata i D-glucono- δ -laktona kao inhibitora; pI -pI marker opsega 3, 5-10, 0. Uzorci 1-7 su fermentacione tečnosti

Razlike u celulaznim profilima između ispitivanih uzoraka *Trichoderma* sp. su prikazane na slici 36. Pozicije svih glavnih izoformi celulo-litičkih enzima su označene strelicom. Jasno se uočavaju razlike u položajima izoformi endocelulaze, egzocelulaze i celobiazaze. Nisu sve vrste celulaza detektovane u svim analiziranim uzorcima, što potvrđuje tezu da različiti izolati *Trichoderma* sp. proizvode različite tipove celulaza, što se vidi analiziranjem uzoraka 2, 3 i 4 na slici 36. Na ovaj način je pokazano da opisana zimogramska tehnika može da se koristi za poređenje celulaznih profila različitih sojeva gljiva. Pored toga, može se primetiti da jedan isti soj *Trichoderma* sp. može da proizvodi različite celulazne profile u zavisnosti od tipa i uslova produkcione

fermentacije, kao i od tipa supstrata koji je korišćen u fermentaciji (uzorci 1, 5 i 6 na slici 21).

Ova metoda daje jasnu razliku između celulaznih tipova – endocelulaza, egzocelulaza i celobiasa, čime se eliminišu greške koje su pronađene u radovima upotrebom samo CMC kao supstrata u zajedničkim zimogramskim tehnikama [320–323]. Veliku primenu i značaj pronalazi u praćenju i kontroli u fundamentalnim istraživanjima, selekciji određenih fungálnih celulaznih producera, praćenje efekta na celulaznu produkciju (genetičke manipulacije), ili testiranje novih lignoceluloznih supstrata što omogućava njegovu primenu i veliki značaj u industriji [318].

3.7 Upotreba iskorišćenog komposta nakon gajenja šampinjona kao supstrata za produkciju enzima

Sledeći cilj naših istraživanja je bilo pronalaženje novih, do sada nedovoljno iskorišćenih, materijala kao supstrata za produkciju enzima upotrebom potentnog izolata TH2 i drugih sojeva iz roda *Trichoderma*.

Kompost koji zaostaje nakon gajenja šampinjona predstavlja sve veći problem za životnu sredinu, zbog uklanjanja i skladištenja. Supstrat koji se koristi za proizvodnju pečuraka je pasterizovan otpad koga čine najvećim delom slama (60-70%) i drugi poljoprivredni otpadni materijali. To znači da je bogat celulozom, hemicelulozom i nutritivnim elementima, te je izabran kao novi supstrat za gajenje gljiva i produkciju celulaznih enzima u izradi ovog rada.

Ponovnu upotrebu komposta iskorišćenog za gajenje šampinjona smo koristili kao supstrat za gajenje dve vrste gljiva ukupno 6 izolata *Trichoderma* sp. koji su opisani i u delu 3.4.1 (oznake izolata sa skraćenicama koje su korišćene dalje u tekstu su prikazane u tabeli 11) *Aspergillus niger* ATCC 10864 (skraćeno obeležen dalje u tekstu kao AN43) (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) koji je izabran kao poznati producer industrijskih enzima. Produkcija enzima je postavljena na čvrstoj fazi (SSF-od eng solid state fermentation).

Praćena je produkcija dva enzima celulaznog kompleksa: endocelulaza i β -glukozidaza. Endocelulaza je izabrana zato što je ključni enzim celulaznog kompleksa, a β -glukozidaza zato što je to enzim koji ne produkuje sve vrste *Trichoderma* koje su

celulazni produceri. Promene na slami iz komposta, nastale dejstvom enzima tokom produkcije, su analizirane mikroskopski.

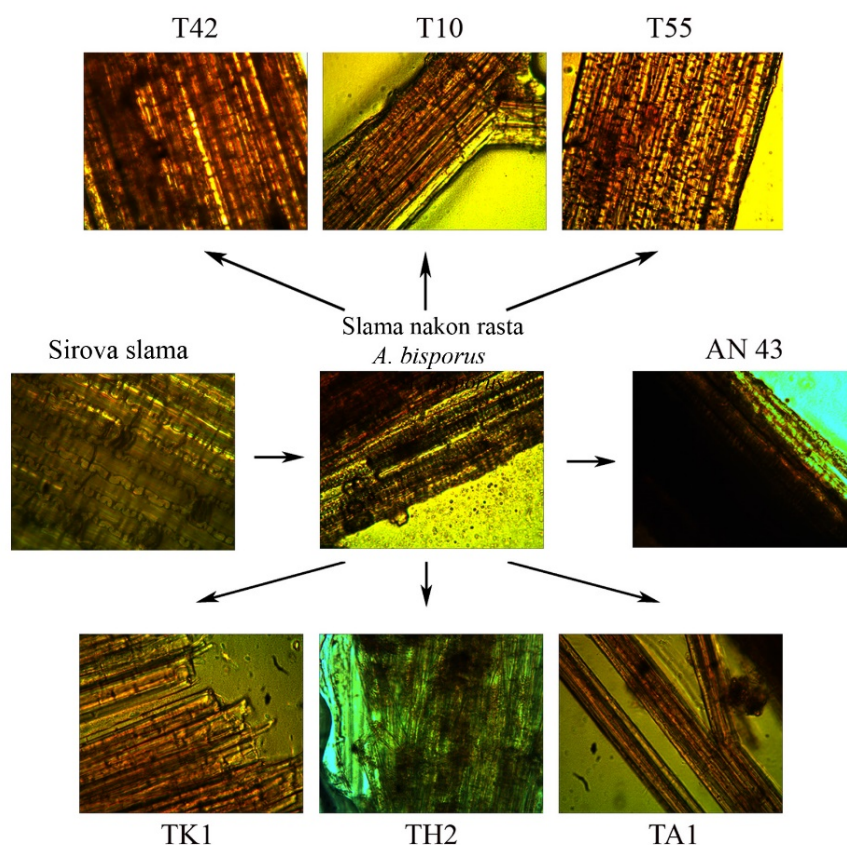
3.7.1 Analiza supstrata nakon produkcije enzima gljivama *Trichoderma*

Nakon završene produkcije i ekstrakcije enzima izmerena je masa zaostalog supstrata. Oko 33,2-36,4 g supstrata je zaostalo nakon fermentacije po svakom erlenmajeru. Gajenje *Trichoderma* sp. izolata, kao i *A.niger*-a dovelo je do redukovanja količine početnog otpadnog materijala od gajenja šampinjona za oko 30%, što je značajna količina sa stanovišta zaštite životne sredine.

Promene na slami iz supstrata su praćene pod mikroskopom i poređene sa strukturom slame pre gajenja izolata *Trichoderma* sp. kao i sa strukturom slame pre gajenja šampinjona. Kao preliminarni izveštaj o efikasnosti produkcije celulaza određivani su koncentracije redukujućih šećera i proteina.

3.7.1.1 Mikroskopska analiza slame

Promene na površini slame su analizirane svetlosnim mikroskopom i prikazane na slici 37. Mikrografija sirove slame pokazuje normalan obrazac paralelnih tubula sa čvorovima i inter-čvorovima. Nakon rasta *A. bisporus* na mikrografijama slame može se uočiti da je došlo do raskidanja unutrašnjih inter-čvorova i narušavanja povezanosti između tubula. Narušavanjem ove jake adhezione povezanosti između tubula stvara se porozna površina slame čime je povećana dostupnost celuloze kao supstrata za gljive *Trichoderma* spp. i *A. niger*. Zato se gajenje šampinjona u ovom slučaju može posmatrati kao biološki pretretman slame.



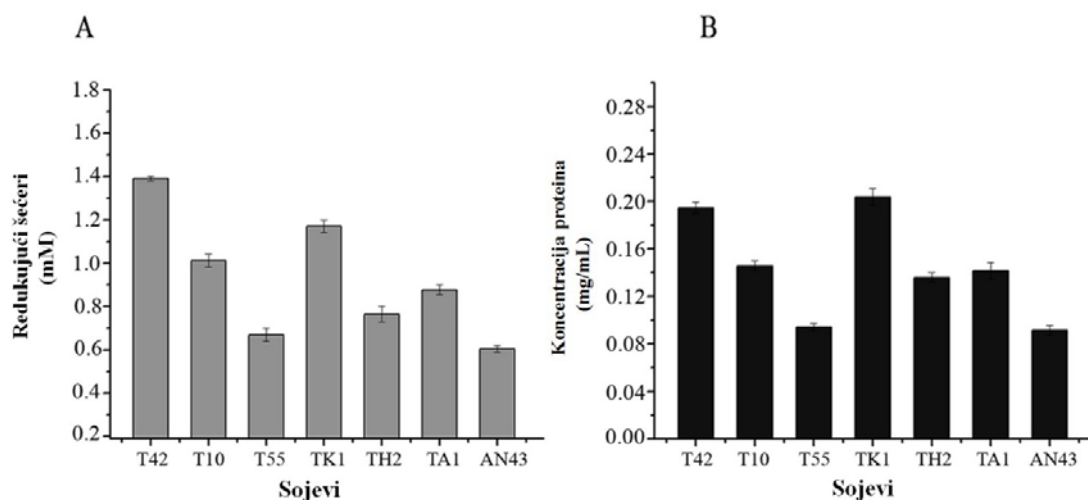
Slika 37. Mikroskopska analiza slame poreklom iz komposta nakon gajenja šampinjona *A. bisporus* i gljiva *Trichoderma* sp. i *A. niger*. Oznake T42, T10, T55, TK1, TH2 i TA1 označavaju izolate *Trichoderma* sp. Oznaka AN43 označava soj *A. niger* ATCC10864

Struktura slame nakon gajenja *Trichoderma* sp. i *A. niger* postaje neurednija (slika 37). Najuočljivije promene na strukturi slami su nakon rasta *T. harzianum* T10 i TH2 izolata. TH2 dovodi do narušavanja paralelne strukture tubula slame. Najmanje promene na strukturi slami mogu se uočiti nakon gajenja *Trichoderma* sp. grupe 3 izolat T55.

Poznato je da se struktura slame menja usled uklanjanja lignina nakon gajenja *A. bisporus* [324]. Povećanje poroznosti slame predstavlja jedan od tipova pretretmana slame. Takva slama se može upotrebiti kao dobar supstrat za gajenje gljiva *Trichoderma* i *Aspergillus*, za produkciju celulaznih enzima. Prikazani rezultati pokazuju da je do promena u strukturi slame došlo i nakon gajenja *Trichoderma* sp. i *A. niger*, jer promene u slami nastaju kao posledica hidrolize celuloze enzimima celulolitičkog kompleksa [325].

3.7.1.2 Parametri efikasnosti enzimske produkcije

U ekstraktima dobijenim nakon ekstrakcije enzima određena je koncentracija redukujućih šećera i proteina. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 38.



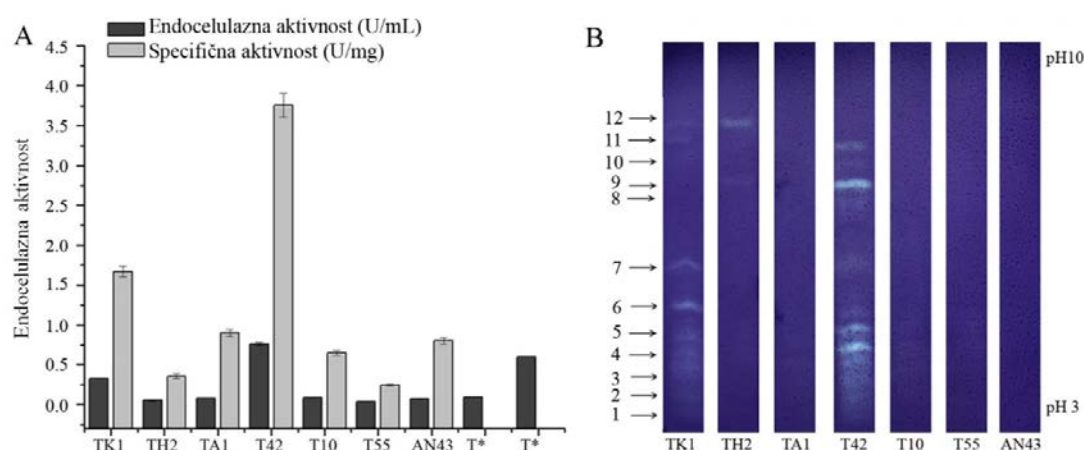
Slika 38. A) Koncentracija redukujućih šećera u FT nakon SSF; B) Koncentracija ukupnih proteina. Oznake T42, T10, T55, TK1, TH2 i TA1 označavaju izolate *Trichoderma* sp. Oznaka AN43 je *A. niger* ATCC10864

Redukujući šećeri dobijeni nakon gajenja *Trichoderma* sp. i *A. niger* nastaju kao proizvod aktivnosti celulolitičkih i ksilanaznih enzima koji razgrađuju celulozu i hemicelulozu prisutnu u supstratu tokom SSF-a. Dobijeni rezultati (slika 38A) pokazuju da postoji razlika u koncentraciji redukujućih šećera između ispitivanih izolata. Najveća koncentracija redukujućih šećera detektovana je nakon gajenja izolata *T. atroviride* T42.

Svi izolati *Trichoderma* sp. proizvode veću količinu proteina u odnosu na *A. niger*. Izolati *T. atroviride* T42 i *T. konigii* TK1 proizvode najveću količinu proteina što ih čini potencijalnim producerima enzima.

3.7.2 Produkcija endocelulaza na otpadnom kompostu

Produkcija endocelulaza (U/mL) je prikazana na slici 39A. Specifična aktivnost (U/mg) je izražena kao 1U po 1 mg proteina prisutna u FT. Proteini u FT su razdvojeni IEF pri uslovima kao što su opisani u odeljku 3.6 dok su endocelulazne izoforme detektovane kao što je opisano u delu 3.6.2. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 39B.



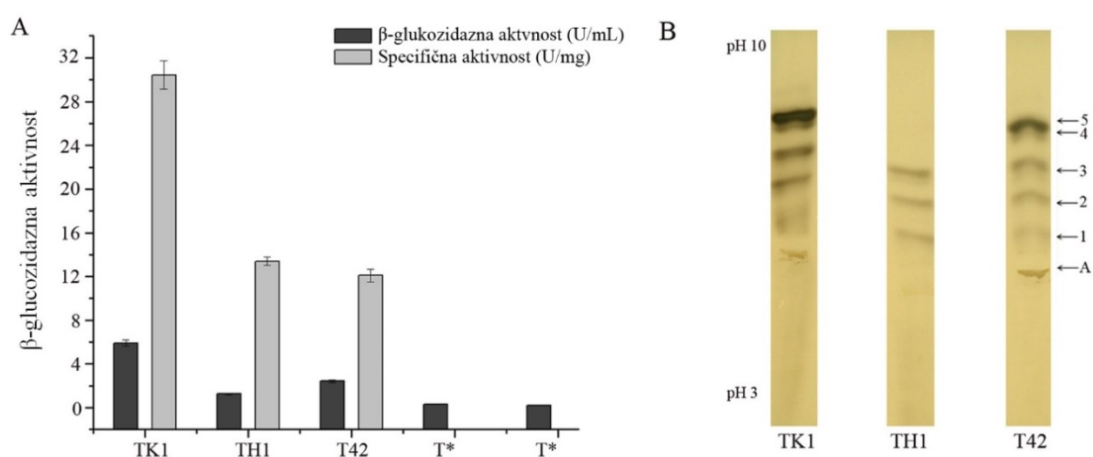
Slika 39. Produkcija endocelulaza tokom SSF gajenjem izolata *Trichoderma* sp. (T42, T10, T55, TK1, TH2 i TA1) i *A. niger* (AN43). A) Endocelulazna aktivnost (U/mL) i specifična endocelulazna aktivnost (U/mg); B) Zimogramska detekcija endocelulaznih izoformi

Dobijeni rezultati (slika 39A) pokazuju da svi izolati *Trichoderma* sp. proizvode veću količinu endocelulaza u odnosu na *A. niger*. Izolat *T. atroviride* T42 koji je izolovan sa gajilišta komercijalnih šampinjona *A. bisporusa* proizvode najveću količinu endocelulaza u poređenju sa literaturnim rezultatima dobijenih gajenjem *Trichoderma* sp. na uobičajeni način [309].

Broj i intenzitet zimogramski detektovanih endocelulaznih izoformi korelira sa enzimskom aktivnošću (slika 39B). Izolat *T. atroviride* T42 proizvode najveći broj endocelulaznih izoformi, ukupno 11 širokog opsega pI vrednosti (od 3 do 8), od kojih su izoforme 4, 5 i 9 dominantne po intenzitetu. Različiti izolati proizvode različite izoforme koje se međusobno razlikuju po intenzitetu tako da su različite izoforme dominantne. Izoforme 6 i 7 su dominantne kod izolata *T. konigii* TK1, dok je izoforma 12 dominantna kod soja TH2. Ova raznolikost u proizvodnji endocelulaznih izoformi je u skladu sa literaturnim podacima koji pokazuju da neke gljive mogu da proizvode različite endocelulazne izoforme u zavisnosti od prisutnih metabolita ili proteazne aktivnosti u fermentacionim tečnostima [326]. Pored toga, može se primetiti da drugi izolati TK1 i TH2 proizvode druge glavne endocelulazne izoforme što može biti posledica i različitih postranslacionih modifikacija enzima.

3.7.3 Produkcija β -glukozidaze na otpadnom kompostu

β -glukozidazna aktivnost je određena upotrebom *p*-nitrofenil- β -D-glukopiranozida (*p*NPG $\epsilon = 18.5 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}^{-1}$) kao supstrata. Produkcija β -glukozidaza (U/mL) je prikazana na slici 40. Specifična aktivnost (U/mg) je izražena kao 1 U po 1 mg proteina pristuna u FE. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 40A dok su β -glukozidazne izoforme detekovane na NC membrani nakon printa IEF gela kao što je opisano u odeljku 3.6.1. prikazane na slici 40B.



Slika 40. Produkcija β -glukozidaza tokom SSF gajenjem izolata *Trichoderma* sp. (T42, T10, T55, TK1, TH2 i TA1) i *A. niger* (AN43); A) β -glukozidazna aktivnost (U/mL) i specifična β -glukozidazna aktivnost (U/mg); B) Zimogramska detekcija β -glukozidaznih izoformi. T* označava soj *Trichoderma* sp.

[309]

Tri od sedam ispitivanih izolata *Trichoderma* sp. produkuju β -glukozidazu. Najveći nivo β -glukozidaze produkuje izolat *T. koningi* TK1 što je potvrđeno detekcijom intezivnih β -glukozidaznih traka kao i najvećim brojem (5) prisutnih izoformi na zimogramu (slika 39 B). β -glukozidazne izoforme su detektovane i kod izolata *T. atroviride* T42 i *Trichoderma* grupe 3 TH1, slika 40B. Produkcija β -glukozidaza je ograničena inhibicijom produktima [327], što je verovatno i razlog nedostatka β -glukozidaza u mnogim procesima uključujući i industrijski hipercelulolitički produkujući soj je *T. reesei* RUT C30 kod koga β -glukozidaze čine 1% total* nih proteina. Ispitani izolati *Trichoderma* sp. predstavljaju potencijalno značajne industrijske sojeve. Ispitivana tri izolata *Trichoderma* sp. u našem radu

produkuju veću količinu β -glukozidaza kao i veći broj izoformi u poređenju sa literaturnim podacima gde je *T. viride* gajena na pretretiranom otpadu šećerne trske [328].

3.8 Poboljšanje produkcije celulaza filamentoznih gljiva

U cilju povećanja produkcije enzima celulaznog kompleksa soj TH2 je mutiran klasičnim tehnikama mutageneze. Mutacije upotrebom fizičkih i hemijskih metoda dovode do promene na nivou genoma kao što su dimerizacije, substitucije, delecije i insercije nukleotidnih baza [329].

Korišćeno je ozračivanje spora UV zracima tokom 1, 5, 20, 60 sekundi i mutageneza upotrebom natrijum-nitrita u dve koncentracije 5,0 mg/mL i 7,5 mg/mL. Iz literature je poznato da je jedan od najjednostavnijih i veoma efektivni mutagen natrijum-nitrit koji dovodi do substitucije nukleotidnih baza. Takođe je poznato da izlaganje UV zracima dovodi do formiranja kovalentih veza dve pirimidinske baze čime se stvaraju pirimidinski dimeri što za posledicu ima promene u replikaciji i transkripciji. Zbog njihove efikasnosti i jednostavnosti primene u ovom radu su primenjena oba načina mutiranja.

3.8.1 Selekcija mutanata na produkciju celulaza

Kako bi se utvrdilo da li su dobijeni mutanti bolji u produkciji celulaza u odnosu na originalni soj i proverili rezultati prve selekcije sledeći korak je bio testiranje svih izolovanih mutanata upotrebom brzog testa za selekciju na CMC, a rezultati prikazani u tabeli 12.

Tabela 12. Test za brzu selekciju endocelulaznih hipe-produkujućih mutana dobijenih od izolata TH2 upotrebom CMC kao supstrata

	Izolati	Vreme fermentacije (h)					
		22	24	26	28	30	36
1	TH2M1	-	-/+	+	++	++	++
2	TH2M2	-+	+	++	++	++	++
3	TH2M3	+	++	++	++	++	++
4	TH2M4	-	-	+	+	+	+
5	TH2M5	-+	+	++	++	++	++
6	TH2M6	-+	+	++	++	++	++
7	TH2M7	-	-+	+	++	++	++
8	TH2M8	+	++	++	++	++	++
9	TH2M9	-	-/+	+	+	++	++
10	TH2M10	-	-/+	-/+	+	+	+
11	TH2M11	-/+	++	++	+++	++	++
12	TH2M12	+	++	++	++	++	++
13	TH2M13	+	++	++	++	++	++
14	TH2M14	-	-/+	+	+	+	+
15	TH2M15	-	-	-/+	+	+	+
16	TH2M16	-	-/+	-/+	+	+	+
17	TH2M17	-/+	+	++	++	++	++
18	TH2M18	-	-/+	++	++	++	++
19	TH2M19	-/+	++	++	++	++	++
20	TH2M20	-	-	-/+	-/+	+	+
21	TH2M21	*	+	++	++	++	+
22	TH2M22	-	+	++	++	++	++
23	TH2M23	+	++	++	++	++	++
24	TH2M24	-/+	+	++	++	++	++
25	TH2	+	++	++	++	++	++

-/+ : prve male promene u viskoznosti podloge; +: prve promene u viskoznosti podloge, otečnjavanje (polu-tečna faza); ++: kompletno otečnjavanje podloge

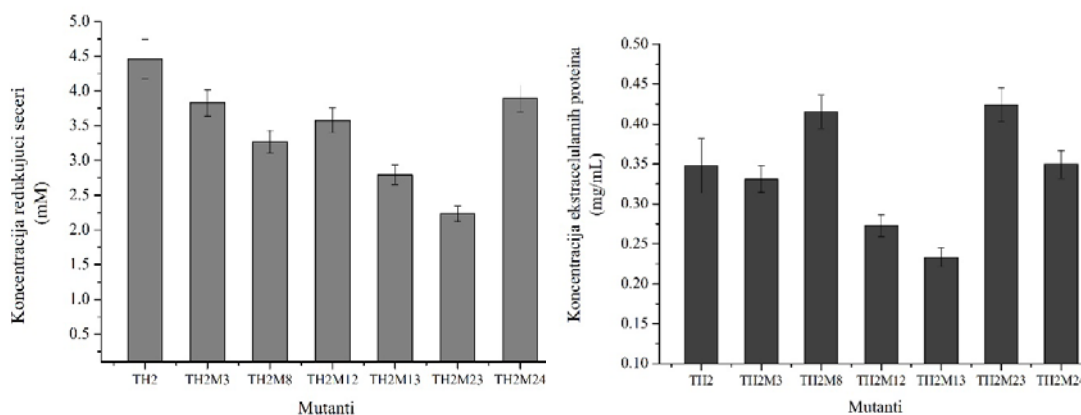
3.8.2 Produkcija celulaznog kompleksa mutantima TH2 na slami kao supstratu

U cilju ispitivanja produkcije celulaznog kompleksa enzima ovih mutanata i upoređivanje sa originalnim izolatom odlučeno da se ovi sojevi gaje u optimizovanim uslovima fermentacije upotrebom slame kao supstrata.

Uslovi fermentacije i dobijanje FT su identični kao što je opisano poglavlju 3.5.5. U FT izmerene su vrednosti konduktiviteta i pH. Za sve ispitivane mutante vrednosti pH su bile oko 6,0. Takođe, konduktivitet u ispitivanim uzorcima je takođe bio

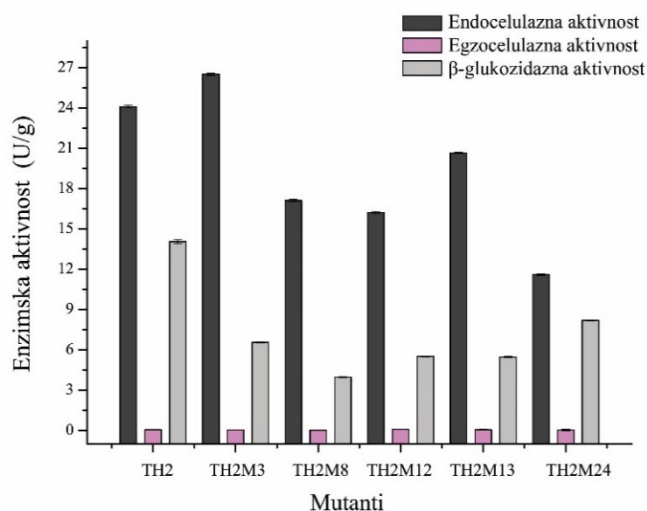
sličan i iznosio je između 6,3-6,5. Manja vrednost konduktiviteta, 6,13, je jedino izmerena za mutant TH2M13.

U FT je određena koncentracija redukujućih šećera i proteina. Dobijeni rezultati su prikazani u na slici 41.



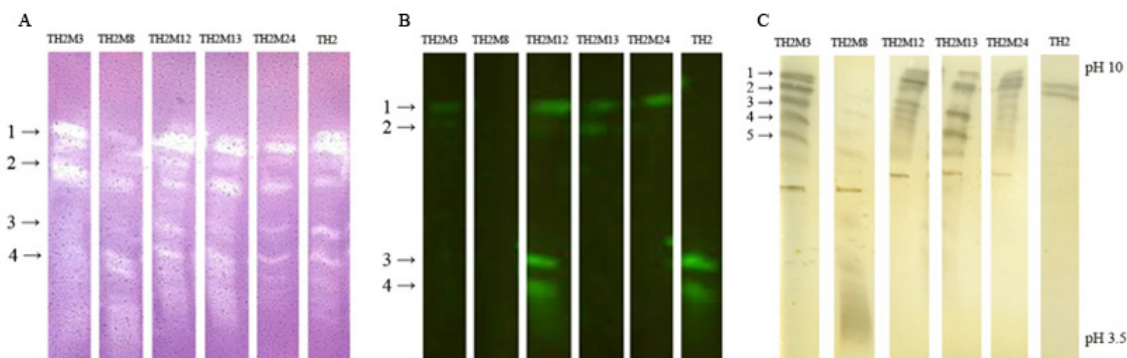
Slika 41. Koncentracija redukujućih šećera i koncentracije ekstracelularnih proteina dobijenih gajenjem mutanata dobijenih od soja TH2

Mutanti proizvode manju količinu redukujućih šećera u odnosu na originalni soj, ali mutanti TH2M8 i TH2M23 proizvode veću količinu ekstracelularnih proteina. Produkcija endocelulaza, egzocelulaza i β -glukozidaza su prikazani na slici 42.



Slika 42. Produkcija endocelulaza, egzocelulaza i β -glukozidaza aktivnosti (U/g) dobijene gajenjem mutanata u uslovima SmF upotrebom slame kao supstrata

Na osnovu rezultata prikazanih na slici 42 može se zaključiti da većina mutanata proizvode manju količinu enzima. Jedini izuzetak je mutant TH2M3 koji proizvode veću količinu endocelulaza u odnosu na originalni soj, TH2. Analiza ovih zimogramskim metodama je prikazana na slici 43.



Slika 43. Zimogramska detekcija endocelulaza (A), egzocelulaza (B) i β -glukozidaza (C) gajenjem mutanata na netretiranoj slami kao supstratu

Na osnovu zimogramske detekcije endocelulaza može se primetiti da mutanti proizvode iste izoforme kao i originalni soj. Uzimajući u obzir da veći deo endocelulazne aktivnosti potiče od aktivnosti dve glavne endocelulaze izoforme (1 i 2) na slici 43 intenzitet ovih izoformi je veći u odnosu na originalni soj samo kod mutanta TH2M3. Ostali mutanti proizvode iste izoforme kao i originalni soj, ali je intenzitet izoformi manji u odnosu na originalni soj. Mutant TH2M12 jedini proizvode egzocelulazne izoforme kao i originalni soj. Ostali sojevi proizvode samo bazne egzocelulazne izoforme. Najveća razlika se primećuje u produkciji β -glukozidaznih izoformi. Mutanti TH2M3, TH2M 12, TH2M 13 i TH2M 24 proizvode tri izoforme (1,4 i 5) više u odnosu na originalni soj, dok mutant TH2M8 proizvode 4 izoforme (2, 3, 4 i 5) veoma slabog intenziteta. U poređenju sa spektrofotometrijskim određivanjem β -glukozidazne aktivnosti može se zaključiti da aktivnost β -glukozidaza nije u skladu sa brojem izoformi i β -glukozidazna aktivnost potiče od glavnih izoformi 2 i 3.

Prikazani rezultati ukazuju na to da ovi uslovi mutacija nisu doveli do povećane produkcije celulolitičkog kompleksa enzima, što ukazuje na to da se izolat TH2 može dalje poboljšavati u cilju produkcije veće količine celulaza.

3.9 Regulacija genske ekspresije celulaza

Regulacija produkcije ekstracelularnih enzima filamentoznih gljiva zavisi od indukujućeg supstrata u medijumu i aktivacije gena koji kodiraju odgovarajuće enzime. Uz pomoć signalnih molekula, dolazi do aktivacije transkripcionih regulatora koji su neophodni za aktivaciju gena koji kodiraju hidrolitičke enzime. Od ukupno 3 najpoznatija aktivatora ekspresije celulaznih enzima XYR1, kodiran genom *xyr1*, se smatra najznačajnijim aktivatorom celulaznih i hemicelulaznih enzima zbog čega je i najviše okarakterisan. Pored aktivatora transkripcije, u poslednjih nekoliko godina, velika pažnja je posvećena razumevanju i karakterizaciji LAE1, kodirane genom *lae1*, za koji je dokazano da je njegovo prisustvo neophodno za ekspresiju glavnih celulaznih i hemicelulaznih gena. Zato su analizirani geni koji kodiraju ova dva proteina (XYR1 i LAE1).

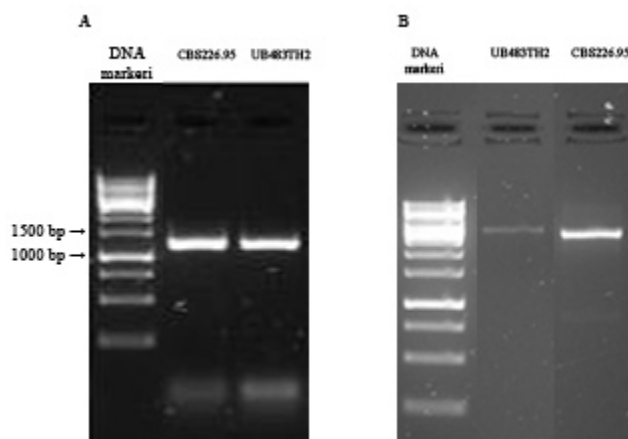
U analizi ekspresije gena *xyr1* i *lae1*, pored izolata TH2 korišćen je i izolat *T.harzianum sensu stricto* CBS 226.95 (TH6) zato što je genom ovog izolata sekvenciran. Samim tim moguća je analiza sekvenci ispitivanih gena za izolat TH2 zato što pripadaju istoj vrsti gljiva.

Analiza je obuhvatila sledeće korake:

1. PCR verifikaciju gena na nivou genomske DNA
2. Produkciju celulaza na mikrokristalnoj celulozi
3. Izolovanje RNA i sinteza cDNA
4. Analiza transkribovane iRNA, upotrebom sintetisane cDNA i qPCR tehnike, u cilju praćenja ekspresionog profila *xyr1* i *lae1* gena.

3.9.1 PCR verifikacija *xyr1* i *lae1* gena u izolatima TH2 i TH6

Verifikacija *xyr1* i *lae1* gena potvrđena je PCR metodom. Prajmeri za PCR amplifikaciju su dizajnirani na osnovu sekvence gena *xyr1* i *lae1* koje su poznate za izolat TH6 čiji je genom sekvenciran. Nakon PCR amplifikacije urađena je agarozna gel elektroforeza u cilju verifikacije uspešnosti PCR-a. Izgled gela nakon agarozne elektroforeze je prikazan na slici 44. PCR produkti su prečišćeni i amplifikovani geni su sekvencirani. Sekvence gena su u prilogu 2.



Slika 44. Gel nakon agarozne elektroforeze PCR produkata nakon amplifikacije *lae1* (A) i *xyr1* gena (B)

Na osnovu detekcije agaroznom elektroforezom (slika 44 A) može se videti da traka odgovara veličini gena od približno 1400 bp. Međutim, nakon poređenja sa bazom podataka *lae1* gena poreklom od *T. reesei* u JGI *T. harzianum* 226.95 (TH6) dužina gena iznosi 1629 bp. S obzirom na to da su korišćeni prajmeri za amplifikaciju transkripta *lae1* i da je dužina oba prajmera 76 bp može se reći da ova traka odgovara *lae1* genu.

Detekcijom *xyr1* gena (slika 44 B) može se videti da traka odgovara dužini ~ 3500 bp, što odgovara dužini gena dobijen nakon analize u JGI (Joint Genome Institute) *T. harzianum* 226.95 (3500 bp) portalu.

3.9.2 Korelacija ekspresije *xyr1* i *lae1* gena sa produkcijom enzima celulaznog kompleksa

XYR1 aktivira promotor transkripcije pod kojim se nalaze geni za transkripciju celulaznih enzima. Broj kopija i nivo ekspresije *xyr1* gena je opisan kod soja *Trichoderma reesei* Qm6a [292,293]. Međutim, njegova ekspresija kod soja *Trichoderma harzianum* još uvek nije ispitana. Zbog velikog značaja *xyr1* na produkciju celulaznog kompleksa enzima transkripciona analiza bi pomogla u razumevanju mehanizma produkcije enzima. Pored XYR1, veliku pažnju u poslednjih nekoliko godina, zauzima potražnja novih regulatornih faktora, među kojima je i LAE1. Međutim, postoje brojne spekulacije u vezi sa tačnim mehanizmom njegovog uticaja na produkciju celulaza, ali tačna funkcija još uvek nije poznata. Veliki broj ispitivanja je

rađen upotrebom soja Qm6a (*T. reesei*) [293], dok ispitivanja na sojevima *T. harzianum* još uvek nisu urađena.

Pored analize *xyl1* i *lae1* gena praćena je i ekspresija *cbh1* gena za enzim Cel7A (egzocelulazu 1, CBH1).

Za analizu ekspresije ovih gena i korelaciju sa produkcijom enzima celulaznog kompleksa izolati su gajeni u uslovima tečne fermentacije na mikrokristalnoj celulozi kao induceru. Sintetički medijum definisanog sastava je korišćen kao prvi korak u ispitivanju kontrole produkcije celulaza zato što omogućava donošenje nedvosmislenih zaključaka. Istovremeno se dobijaju i FT i micelijum koji se koriste za analize – FT za detektovanje nivoa produkovanih enzima, a micelijum za izolovanje cDNA neophodne za transkripcionu analizu.

Tečna fermentacija je postavljena na 28°C sa mešanjem na 250 rpm. Na svakih 24 h u toku 96 h uzimani su alikvoti fermentacione tečnosti sa micelijumom. Kako bi se prekinuli svi sintetički metabolički putevi u micelijumu, odmah nakon centrifugiranja micelijum je potopljen u tečni azot i sačuvan na -80°C. Ovako dobijen micelijum je korišćen za transkripcionu analizu. FT su korišćene za analizu endocelulazne aktivnosti koja je određena kao i u prethodnim eksperimentima.

RNA su izolovane iz micelijuma, dobijenog nakon 24, 48 i 72 časa fermentacije, upotrebom komercijalnog kita uz prethodnu homogenizaciju micelijuma upotrebom tečnog azota. Izolovane RNA su korišćene za sintezu cDNA koja je sintetisana upotrebom komercijalnog kita. Koncentracije dobijene RNA i cDNA su prikazane u tabeli 13.

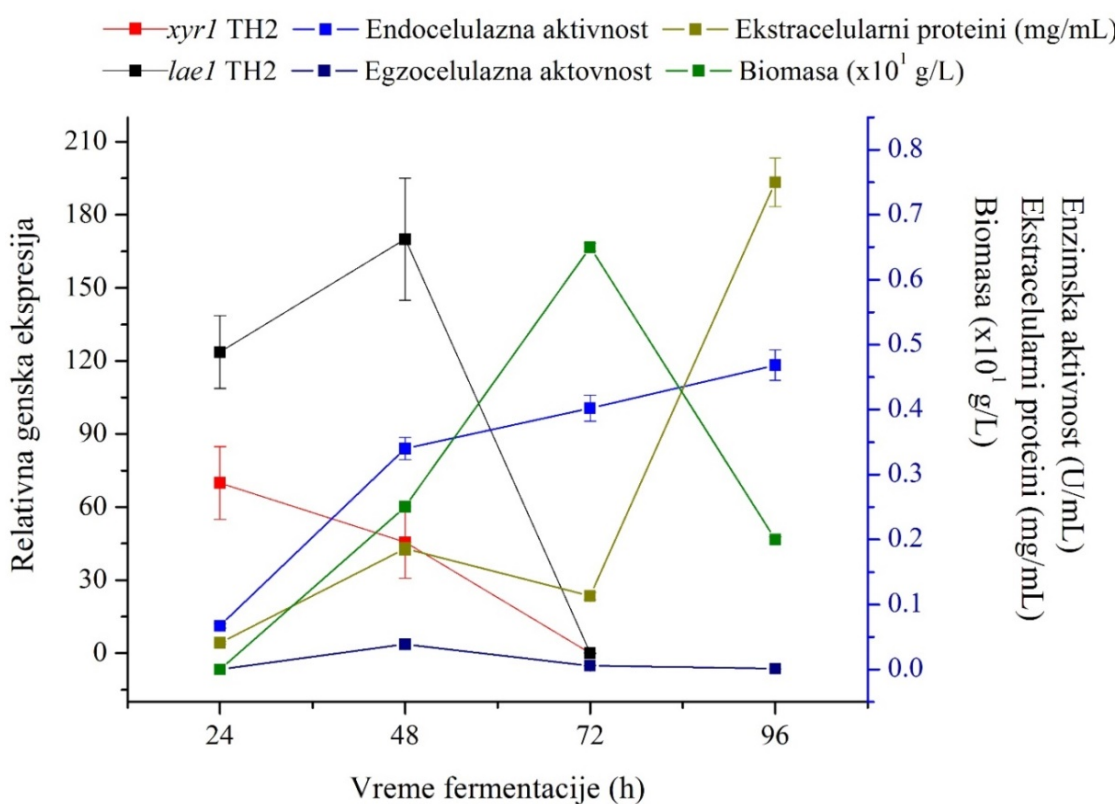
Tabela 13. Koncentracije RNA i cDNA tokom vremena fermentacije na mikrokristalnoj celulozi

Uzorci	RNA (ng/μg)			cDNA (ng/μg)		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
TH2	3029,1	2898,5	2451,2	2654,3	2576,3	2230,6
TH6	3197,4	2796,2	2256,3	3786,5	2470,4	2145,5

Sintetisana cDNA je korišćenja kao templat za određivanje nivoa transkribovane informacione RNA (iRNA) za *xyl1*, *lae1* i *cbh1* gene, tokom vremena fermentacije. Nivo transkribovane iRNA iz ispitivanih gena je praćen qRT-PCR-om upotrebom IQ SYBR Green-a master miksa. Relativna genska ekspresija je određena „Pfaffal“

metodom u programu REST 2009 [330]. Izračunavanje nivoa transkribovane iRNA izolata TH2 je postignuto normalizacijom u odnosu na nivo iRNA izolata TH6 u 24 h koji je korišćen kao kontrolni soj zato što mu je sekvenciran ceo genom. Kao referentni gen (housekeeping gen) korišćen je *tef1*, čija je ekspresija stalna.

U istim vremenskim razmacima su analizirani i nivoi produkovanih celulaznih enzima. Rezultati nivoa RNA transkripcionih faktora i nivoa produkovanih enzima su radi korelacije prikazani na zajedničkom grafiku na slici 45. U početnim fazama rasta započinje intenzivna transkripcija indukujućih faktora.



Slika 45. Ekspresioni profil *xyr1*, *lae1* gena (nivo transkribovane iRNA od strane *xyr1* i *lae1* gena normalizovanih u odnosu na 24 h kontrolnog izolata TH6) u korelaciji sa produkcijom celulaznih enzima, proteina i biomase izolata TH2 tokom vremena fermentacije na mikrokristalnoj celulozi

Maksimalni nivo transkribovane iRNA gena *xyr1* TH2 je u 24-tom času što je u skladu sa metaboličkim mehanizmom ćelije, gde je u početnim fazama rasta intenzivna ekspresija gena. Tokom fermentacije dolazi do smanjenja nivoa ekspresije *xyr1*. Produkcioni profil endocelulaza tokom fermentacije raste i postiže maksimumom u 96-tom času. Ekspresija *xyr1* gena je u korelaciji sa enzimskom produkcijom, odnosno

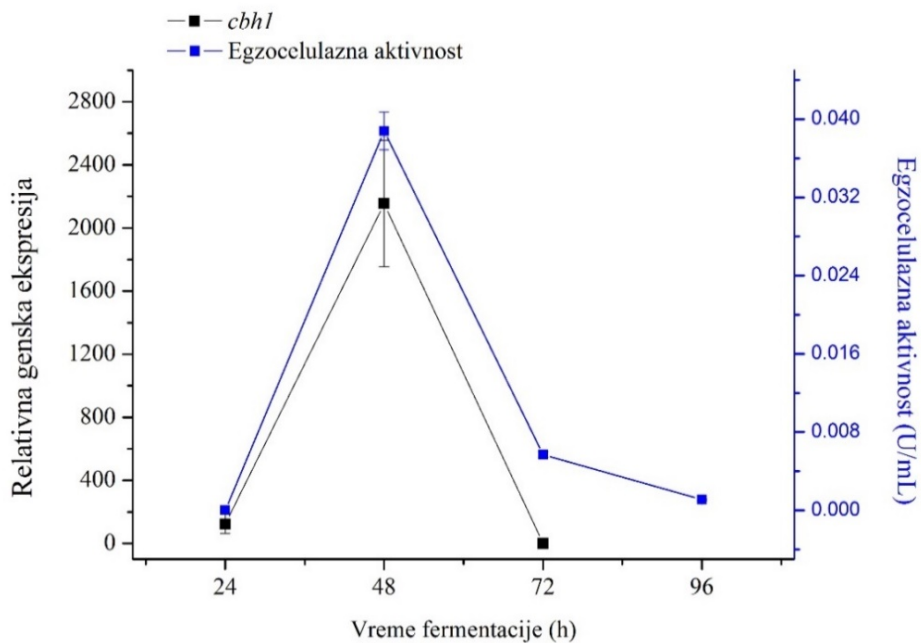
ekspresivani protein XYR1 ima pozitivan uticaj na produkciju celulaza, što je u skladu sa literaturnim podacima [22]. Produkcija egzocelulaza u fermentaciji je niža sa maksimumom u 48-om satu, slika 44. Produkcija ukupnih ekstracelularnih proteina ima dva maksimuma, u 48-om satu i 96-om satu fermentacije što je u skladu sa maksimumima produkcije enzima. Rast biomase dostiže svoj maksimum u 72-om času fermentacije nakon čega opada, slika 45. U poređenju sa ekspresijom gena, koji svojim maksimum dostižu na početku fermentacije, i sa produkcijom enzima i proteina sa druge, koji svoje maksimume postižu u poslednjim danima fermentacije može se primetiti da je formiranje biomase u skladu sa ovim procesim. Tačnije, na početku rasta, kada su intenzivni metabolički procesi u ćeliji dolazi i do rasta biomase dok tokom vremena dolazi do ekspresije proteina i smanjenja biomase.

Ekspresioni profil *lae1* gena ukazuje na slične zaključke. Rezultati pokazuju na korelaciju između produkcije celulaza i *lae1* gena koji kodira LAE1 protein. Maksimalni nivo mRNA *lae1* gena je u 48-om času, i tokom vremena opada, slika 45. S obzirom na to da se u poslednjim satima fermentacije postiže maksimum endocelulaza i ekstracelularnih proteina proizilazi da ekspresirani LAE1 protein ima pozitivan uticaj na celulaznu produkciju.

Interesantnost ovih rezultata se ogleda i u međusobnoj povezanosti ekspresije *xyl1* i *lae1* gena. Literaturni podaci pokazuju da u mutantima *T. reesei* kod kojih je gen *xyl1* uklonjen, smanjenja je ekspresija *lae1* gena, i obrnuto da u overekspresiranim *xyl1* mutantima povećana je i ekspresija *lae1* gena [293]. Na osnovu rezultata dobijenih u našem radu može se videti da se prvo ekspresira gen *xyl1* (24 h fermentacije), a nakon toga, u 48 h fermentacije dolazi do povećanja ekspresije *lae1* gena. Ovi rezultati mogu ukazivati na mogućnost uticaja ekspresije XYR1 proteina na ekspresiju *lae1* gena. Međutim, za potpuno razumevanje i dokazivanje njihovog sinergističkog dejstva potrebno je pristupiti metodama delecije i overekspresije istoimenih gena.

3.9.3 Korelacija ekspresije *cbh1* sa produkcijom egzocelulaze

Na slici 46 je prikazana korelacija nivoa produkovane egzocelulaze i ekspresije gena *cbh1* tokom gajenja TH2 izolata na mikrokristalnoj celulozi 96 h.



Slika 46. Ekspresioni profil *cbh1* gena (nivo transkribovane iRNA od strane *cbh1* gena normalizovanog u odnosu na 24 h kontrolnog izolata TH6) u korelaciji sa produkcijom celulaznih enzima, proteina i biomase izolata TH2 tokom vremena fermentacije na mikrokristalnoj celulozi

Maksimalni nivo transkribovane iRNA gena *cbh1* je u 48 h fermentacije, i tokom vremena opada, i poklapa se sa maksimumom produkcijom egzocelulaze. Kada se uporedi sa nivoom ekspresije *xyl1* i *lae1* gena, slika 45, uočava se da i ekspresija *lae1* gena postiže maksimum u 48 h. Ovo ukazuje na to da XYR1 protein ima primarnu ulogu u produkciji celulaza.

3.10 Zaključci

- Izolovano je oko 10 sojeva *Trichoderma* spp. koji su zajedno sa kolekcijom sa Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine korišćeni u istraživanjima.
- Uspešno je razvijen test za brzi skrining celulaznih izolata gljiva upotrebom CMC-a kao supstrata, koji se zasniva na praćenju promena u viskoznosti supstrata tokom samo 36 h rasta gljiva.
- Upotrebom ovog testa za skrining testirano je ukupno sto izolata *Trichoderma* sp. od kojih se 16 izdvojilo kao potencijalno dobri produceri endocelulaza, a TH2 je selektovan kao najbolji.
- Obećavajući produceri su identifikovani do nivoa vrste na molekularnom nivou upotrebom dva tipa filogenetskih markera, ITS1/4 i *tef1*. Soj TH2 je identifikovan kao *T. guizhouense* koji pripada *T. harzianum* kompleksu.
- Optimizovani su uslovi za produkciju enzima celulaznog kompleksa upotrebom soja TH2 na netretiranoj slami kao inducibilnom supstratu u uslovima tečne fermentacije:

„1,5 g netretirane slame u minimalnom medijumu uz mešanje na 150 rpm, inokulacijom sa micelijumom dobijenim za 48 h pri brzini mešanja od 210 rpm“.

- Makimalna produkcija endocelulaze (28,32 U/g) je detektovana u trećem danu fermentacije, egzocelulaze (0,049 U/g) nakon 5 dana, dok je maksimum β -glukozidazne produkcije postignut nakon 7 dana (14,1 U/g).
- Razvijen je zimogram za brzu, simultanu detekciju svih enzima celulaznog kompleksa (endocelulaze, egzocelulaze i β -glukozidaze) nakon jednog elektroforetskog razdvajanja.
- Izoenzimski profili se menjaju tokom produkcione fermentacije. U prvih 7 dana se uočavaju glavne izoforme i izoforme manjeg intenziteta kod sve tri vrste celulaznih enzima. Nakon sedmog dana intenzitet glavnih izoformi se smanjuje, a pojavljuju se nove izoforme.
- Iskorišćeni supstrat za gajenje pečuraka (otpadni materijal) je korišćen kao inducibilni supstrat za produkciju celulaznih enzima upotrebom 6 sojeva

Trichoderma spp. Uz visok nivo produkcije celulaza istovremeno je postignuto i smanjenje voluminoznosti optadnog materijala za 30%.

- Nivo produkcije celulaza je u korelaciji sa nivoom ekspresije transkripcionih faktora *xyr1* i *lae1* gena. Maksimalni nivo iRNA gena za transkripcione faktore je u 24 času (*xyr1*) i 48 času (*lae1*), dok se maksimum produkcije celulaza postiže u 96 času.
- Nivo produkcije egzocelulaze je praćen i na nivou iRNA i na nivou enzimske aktivnosti čiji su se maksimumi poklapaju u 24 času.

4. Eksperimentalni deo

Spisak korišćene opreme:

Tehnička vaga Mettler PE 3600 i analitička vaga Mettler

Kada za horizontalnu elektroforezu Pharmacia LKB Multiphor II

Kada za horizontalnu elektroforezu Biorad

Ispravljači Pharmacia Biotech EPS 3500, Pharmacia ECPS 2000/300, Bio Rad

Protočni vodeni termostat Pharmacia Biotech, Multitemp III

Inkubator-mučkalica IKA KS 4000i control

Inkubator-mučkalica Infors HT

Inkubator Memmert INB 300 i SANYO MIR-154

Spektrofotometri Philips PU 8630, Shimadzu UV1800 i Spectramax 384 Plus

Turbidometar, Biolog

Nano Drop 1000

pH metar, InoLab

Konduktometar WTW LF521, inoLab

Mikrotalasna pećnica, Samsung i OK

Centrifuga, miniSpin plus, Eppendorf, Sigma 1-13

Centrifuga Sigma 3-30 K

Eppendorf Personal MasterCycler i T3 Thermocycler, Biometra

qTOWER 2.0 / 2.2 Real-Time Thermal Cycler, Anlytic Jena

Bio Rad Geldoc XR

4.1 Izolovanje gljiva roda *Trichoderma* iz prirode

Uzorci zemljišta (1,0 g) su suspendovani u 5 mL sterilne destilovane vode i inkubirani 5 min na sobnoj temperaturi. Vodena faza je korišćena za pravljenje serijskog razblaženja rastvora (10^1 - 10^5) koji su inokulisani na podloge krompirvog dekstroznog agara sa antibiotikom ampicilinom (finalne koncentracije 100 $\mu\text{g/mL}$).

Uzorci preklom sa farme bukovače su, prvo ezom u sterilnim uslovima, kultivisani na podloge PDA sa antibiotikom nakon čega su izolati ponovno presejavani do dobijanja čiste kulture. Metodom serijskog razblaženja dobijene su monosporne kolonije.

Monosporne kolonije su mikroskopskom analizom morfološki okarakterisne.

4.1.1 Priprema hranljivih podloga za dobijanje spora

Za izolovanje, gajenje, održavanje i dobijanje spora ispitivanih gljiva korišćeno je nekoliko čvrstih podloga, kao što su PDA i sladni agar.

PDA:

Krompirov ekstrakt	1 L
Glukoza	20 g
Agar-agar	15 g

Priprema krompirovog ekstrakta: 200 g belog krompira (ljuštenog i sitno iseckanog) je kuvano tokom 1 časa u 1 L destilovane vode. Nakon hlađenja krompir je usitnjen štapnim mikserom. Ceđenjem kroz dvoslojnu gazu dobijen je ekstrakt krompira.

U podloge PDA, za izolovanje čistih izolata, dodat je štok rastvor antibiotika ampicilina 100 mg/mL (1 g ampicilina u 10 mL sterilne destilovane vode) toliko da je njegova finalna koncentracija iznosila 100 µg/mL.

Sladni agar:

Sladni ekstrakt	30 g
Pepton 1	5 g
Agar-agar	15 g
voda	do 1 L

4.1.2 Zasejavanje gljiva

U sterilnoj sobi sve radne površine su dezinfikovane 70% -nim etanolom. Prostor je sterilizovan UV lampom tokom 15 minuta pre zasejavanja. Eza je sterilisana spaljivanjem do usijanja na plameniku. Sa kosog agara su spore ezom presejane na pripremljene podloge metodom išarane ploče. Svaka Petri šolja je obeležena oznakom soja, datuma i vrstom hranljive podloge. Sve Petri šolje sa zasejanim izolatima su inkubirane u termostatu na 28°C.

4.2 Razvijanje testa za brzu selekciju celulaznih hiperprodujućih sojeva gljiva i njihova selekcija

U erlenmajere od 300 mL, sa širokim grlom, odmereno je po 20 mL medijuma sledećeg sastava:

NH ₄ NO ₃	2,0 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,4 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5 g
ekstrakt kvasca	2,0 g
CMC	20,0 g

pH 6,5

CMC (TCL, Japan) je homogenizovan štapnim mikserom. Podloge su autoklavirane nakon čega su bile čvrste konzistencije.

Na podloge je, ravnomerno po celoj površini, zasejano po 1,2 mL rastovor spora čiji je OD (A₆₀₅) iznosio ~1,00 što predstavlja 1,9 x 10⁵ spora/mL. Fermentacija je postavljena na 28°C bez mešanja. Korišćeni su vateni čepovi.

U toku 36 h fermentacije vizuelizovane su promene u viskoznosti podloge na osnovu čega se ispitivani sojevi gljiva karakterišu kao dobri ili loši produceri endocelulaza.

4.2.1. Određivanje koncentracije spora (broj spora/mL)

Spore izolata TH2 nakon rasta na PDA podlogama tokom 7 dana su korišćene za određivanje koncentracije spora.

4.2.1.1 Priprema rastvora spora

Svaka Petri šolja je prelivena sa 5 mL sterilnog 0,1% rastvora Tween-80. Ezom su pokupljene spore sa površine. Rastvor spora sa micelijumom je proceden kroz vatu. Od dobijene suspenzije su napravljena serijska razblaženja.

0,1% rastvor Tween-a 80

Tween-a 80	0,1 g
vode do	100 mL

4.2.1.2 Određivanje broja spora upotrebom hemocitometra (Counting chamber komora)

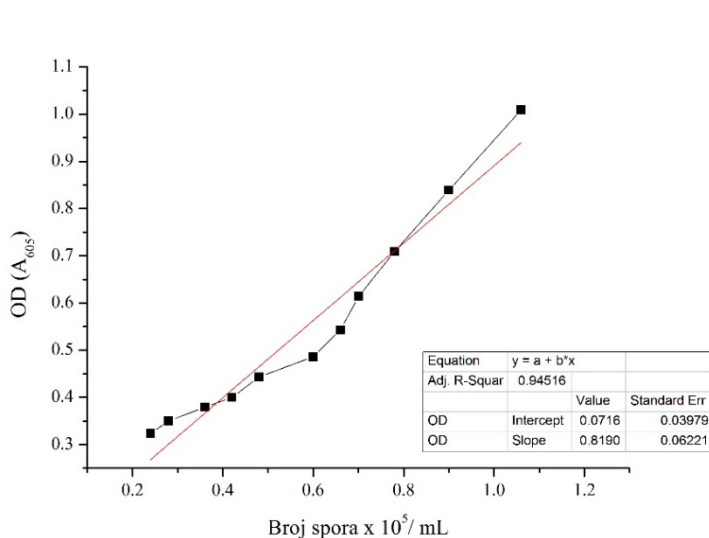
Rastvor spora (oko 100 μ L) je nanet na komoru mikroskopske pločice tako da se napravi jedan sloj tečnosti kada se prekrije pokrovnim staklom. Višak tečnosti je uklonjen papirnom vatom. Na uveličanju od 40X pronađena je mreža komora za brojanje. Mreža je podeljena na 9 velikih kvadrata. Pored njih postoje i kombinovani mali i srednji kvadrati. Broj spora je izbrojen u 7 velikih kvadrata i jednom kombinovanom kvadratu. Najslabije 4 vrednosti iz 7 velikih kvadrata je sabrano. Toj vrednosti dodati broj spora iz kombinovanog kvadrata. Ukupna vrednost je pomnožena sa 2 pa sa 1000 čime se dobija broj spora/mL. Dobijeni broj je pomnožen sa razblaženjem da bi se dobio ukupan broj spora.

4.2.1.3 Merenje optičke gustine (OD) rastvora spora

Rastvoru spora čiji je broj određen mikroskopskom analizom kako je opisano u poglavlju 4.2.1.2 je izmerena absorbanca na talasnoj dužini od 605 nm. Dobijena vrednost je pomnožena sa razblaženjem i dobijena je optička gustina spora (OD).

4.2.1.4 Konstruisanje standardne prave za određivanje broja spora

Svim razblaženjima spora je određen broj spora/mL i OD. Na osnovu dobijenih rezultata konstruisana je standardna prava zavisnosti OD rastvora spora od broja spora /mL, što je prikazano na slici 47.



$$y = a + bx$$

$$a = 0,0716$$

$$b = 0,8190$$

Y – A na 605 nm dobijeva merenjem rastovra spora

X – broj spora x 10⁵/mL

Slika 47. Standardna prava za određivanje broja spora za izolat TH2

Merenjem OD pojedinačnih rastvora spora i upotrebom ove jednačine određivana je koncentracija spora u daljim eksperimentima.

4.3 Identifikacija gljiva

Za molekularnu identifikaciju izolata – dobrih producera gljiva iz roda *Trichoderma* korišćene su dve vrste genskih markera – ITS1/4 i *tef1* geni.

4.3.1 Molekularna identifikacija gljiva na nivou ITS1/4 genskog regiona

Prva faza u molekularnoj identifikaciji gljiva je ekstrakcija DNA iz micelijuma. Svi izolati su kultivisani na PDA podloge na temperaturi od 28°C tokom 2 dana.

4.3.1.1 Ekstrakcija DNA

DNA je izolovana iz micelijuma upotrebom CTAB protokola [298]. Upotrebom tečnog azota urađena je homogenizacija gljiva u avanu. Micelijumu je dodato 800 µL CTAB ekstrakcionog pufera i dobijena suspenzija (600 µL) je prenetu u plastičnu tubicu od 1,5 mL. Suspenzije su inkubirane na temperaturi od 65°C tokom 60 min. Na svakih 15 min suspenzije su vorteksovane. Nakon inkubiranja suspenzijama je dodato 600 µL hloroforma i suspenzije su vorteksovane tokom 10 sekundi. Suspenzije su centrifugirane 10 min na 13000 rpm. Nakon centrifugiranja gornja faza je pažljivim pipetiranjem prenetu u novu plastičnu tubicu od 1,5 mL kojoj je dodato 600 µL prethodno ohlađenog

izopropanola (-20°C). Suspenzije su inkubirane tokom 10 min na -20°C nakon čega su centrifugirane tokom 10 min na 13000 rpm. Izopropanol je pažljivo odličen dok je talogu dodato 600 µL 70% hladnog etanola nakon čega je suspenzija ponovo centrifugirana tokom 10 min na 13000 rpm. Etanol je dekantovan dok su tubice ostavljene na sobnoj temperaturi otvoreni (dok ne nestane miris etanola) kako bi ostatak ispario. Nakon toga dobijeni talog je resuspendovan u 75 µL TE (Tris-EDTA pufer). Koncentracija DNA (ng/µL) je izmerena upotrebom Nanodrop-a.

4.3.1.2 Lančana reakcija polimeraze (PCR)

Za molekularnu identifikaciju odabranih izolata TK1, TH2, TA1, T10, T42 i T55 korišćeni su univerzalni prajmeri ITS1/ITS4. Za PCR aplikaciju je korišćen protokol opisan u White et al., 1990. Priprema reakcione smeše (20 µL): 12 µL pcr master mix FERMENTAS, po 0,2 µM od oba prajmera 0,2 µM, 1 µL DNA i vode do 20 µL. Uslovi PCR si prikazani u tabeli 14. Sekvence prajmera su prikazane u Prilogu 2.

Tabela 14. Uslovi PCR reakcije

		Temperatura (°C)	Vreme
Denaturacija DNA		94	1 min
30 ciklusa	Denaturacija	94	15 sek
	Vezivanje prajmera	55	15 sek
	Sinteza fragmenta DNA (elongacija)	72	30 sek
Elongacija		72	7 min

4.3.1.3 Agarozna elektroforeza

Za vizuelizaciju produkata PCR reakcije nakon završenog PCR-a dobijeni produkti su analizirani agaroznom gel elektroforezom.

Korišćen je 1% agarozni gel. U 25 mL 1 x TBE (Tris-boratni EDTA pufer) pufera dodato je 0,25 g agaroze. Smeša je zagrevana do ključanja u mikrotalasnoj pećnici. Postupak zagrevanja je ponovljen do potpunog rastvaranja agaroze. Agarozna je izlivena u prethodno pripremljen kalup u koji je stavljen češalj. Gel je ostavljen na sobnoj temperaturi da se ohladi i stegne (tokom 20 min). Češalj je izvađen iz gela i

agarzoni gel je uronjen u kadnicu za elektroforezu (BlueMarine 100, Serva) u kome je prethodno staljavljen 1 x TBE pufer tako da je ceo gel prekriven puferom. Uzorci (PCR smeše), 4 µL, su prethodno pomešane sa bojom (1 µL 6x Loading Dye, MBI Fermentas, Litvanija). Korišćeni su DNA markeri 1 kb (5 µL, Thermo Fisher) čiji su fragmenti veličine 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 750, 500 i 250 bp. Uslovi elektroforeze su bili: 100 V; 200 mA i 30 min. Nakon završene elektroforeze gel je bojen u rastvoru 0,1% etidijum-bromida u toku 10 min. Trake na gelu su vizuelizovane posmatranjem gela pod UV transluminatora. Kao pozitivne reakcije detektovani su fragmenti veličine oko 500 bp u poređenju sa DNA markerima.

Nakon verifikacije agaroznom elektroforezom PCR produkti su prečišćeni i poslani na sekvenciranje. PCR prečišćavanje je urađeno upotrebom mi-PCR Purification Kit (Metabion international AG, Nemačka) praćenjem preporučenog protokola koji je prikazan u Prilogu 3. Sekvence gena (Prilog 1) su ubačene u NCBI GenBank. Dobijene sekvence su upoređene sa sekvencama drugih *Trichoderma* sp. izolata koje su prethodno identifikovane i koje se koriste kao reference [96].

4.3.2 Molekularna identifikacija gljiva na nivou gena *tef1*

Molekularna identifikacija gljiva na nivou gena *tef1* se sastoji od istih faza koje su opisane u poglavlju 4.3.1.

4.3.2.1 Ekstrakcija DNA

Ekstrakcija DNA molekula izolata TH2, TH7, TH8, TL2, TH5 i TL3 za identifikaciju *tef1* je urađena kao što je opisano u poglavlju 4.3.1.1.

4.3.2.2 Lančana reakcija polimeraze (PCR)

Za molekularnu identifikaciju odabranih izolata korišćeni su EF1-782f i TEF1_LLErev prajmeri. Za PCR aplikaciju je korišćen protokol opisan tabeli 15 i 16. Sekvence prajmera su prikazane u Prilogu 2.

Tabela 15. Priprema reakcione smeše uslovi za PCR amplifikaciju gena *tef1*

Sastav	Finalna koncentracija (M)	μL (1 reakcija)
Pufer (Promega) 10 Fach	1	10,0
Nukleotidi 10 mM (Promega)	$1,6 \times 10^{-4}$	4,0
MgCl_2	$3,0 \times 10^{-3}$	6,0
EF1-782f (100 μM)	$2,5 \times 10^{-7}$	2,0
TEF1_LLErev (100 μM)	$2,5 \times 10^{-7}$	2,0
Taq polimeraza (Promega)	0,5	0,1
PCR voda		20,90
DNA		5

Tabela 16. Uslovi PCR-a amplifikaciju gena *tef1*

		Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Vreme (min)
Denaturacija DNA		94	1
30 ciklusa	Denaturacija	94	1
	Vezivanje prajmera	55	1
	Sinteza fragmenta DNA (elongacija)	72	50 sek
Elongacija		72	7

4.3.2.3 Agarozna elektroforeza

Za vizuelizaciju produkata PCR reakcije nakon završenog PCR-a dobijeni produkti su analizirani agaroznom gel elektroforezom. Postupak pripreme gela je sličan kao što je opisano u poglavlju 4.3.1.3. Korišćen je 1.5% agarozni gel (Agaroz -Roth, Germany) pripremljen u 1 X TEA pufera. Pripremljenoj agarozni je dodato 3 μL boje SYBR Safe (Invitrogen). Za analizu je korišćeno 10 μL PCR smeše pomešane sa 2-3 μL DNA boje za uzorke (1 μL 6x Loading Dye, MBI Fermentas, Litvanija). Korišćeni su DNA markeri 1 kb (5 μL , Thermo Fisher). Uslovi elektroforeze su bili: 80 V; 200 mA i 30 min. Nakon završene elektroforeze gel je analiziran upotrebom ChemiDoc MP sistema.

4.3.3 Konstrukcija filogenetskog stabla

Sekvence su analizirane u NCBI banci i *TrichoMARK*. Za konstrukciju filogenetskih stabala korišćeni su programi:

1) ITS 1/4 - za upoređivanje sa referentnim sojevima *Trichoderma* sp. korišćen je program Clustal X (Thompson et al., 1997) u MEGA 6 verziji. Za identifikovane izolate konstruisano je filogenetsko stablo upotrebom MEGA verzija 6, i analizirano upotrebom metode Maximum Parsimony. Početna filogenetska stabla su dobijena pretraživanjem nivoa 5, posredstvom nasumičnih dodatnih sekvenci (10 ponavljanja). Prikazano je jedno od 8 stabala. Filogenetsko drvo je analizirano „parsimony“ analizom na osnovu ITS1/ITS4 sekvenci upotrebom „close-neighbour-interchange algorithm“. Broj grana su vrednosti „bootstrap“ za 1000 replikata (prikazane su samo vrednosti veće od 70%). Filogenetsko drvo je crtano na skali sa granama čije su dužine izračunate upotrebom srednje vrednosti i prikazane u jedinicama brojeva promena celih sekvenci.

2) *tef1* - DNA sekvence su alajnovane i vizualizovane upotrebom programa Muscle V 3.8.425 [138] koji je integrisan u editor verzije AliView V.1.17.1 [331]. Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo (MCMC) uzorkovanje je obavljeno upotrebom MrBayes (version 3.2.5) [148] sa četiri lanca za 1 milion generacija. Verovatnoća Bayesian bočihih grana je (Bayesian posterior probabilities (PPs)) je dobivena od 50% glavnih vodećih konsesusnih stabala uzorkovanih na svakih 100 generacija nakon uklanjanja prvih 2500 dvreća upotrebom „burnin“ komande. Filogenetsko stablo je „ukorenjeno“ upotrebom programa SEAVIEW (241) i vizuelizovano upotrebom TreeView [143].

4.4 Produkcija celulaznih enzima upotrebom slame kao supstrata

Za pronalaženje optimalnih uslova produkcije celulaza varirani su jedan po jedan faktor, uz održavanje ostalih uslova fermentacije konstantnim. Prvi korak je bio priprema odabranog inducibilnog supstrata.

4.4.1 Priprema slame

Sirova netretirana slama, organskog tipa, je sakupljena sa lokalnog poljoprivrednog polja u Novim Banovcima, Beograd, Srbija. Upotrebom električnog mlina slama je samlevena do veličine 2-3 mm.

4.4.2 Ispitivanje uticaja količine supstrata na produkciju celulaza

Uslovi fermentacije:

- U erlenmajere od 250 mL, sa širokim grlom i mikrobiloškim vatenim čepovima, odmereno je 50 mL fermentacionog produkcionog medijuma čiji je sastav prikazan u odeljku 4.2. samo bez CMC-a.
- Za ispitivanje uticaja količine supstrata na produkciju celulaznog kompleksa enzima korišćene su tri različite količine slame kao supstrata: 0,75, 1,5 i 2,25 g.
- Izmerena slama je dodata medijumu i podloge su autoklavirane. U svaki erlenmajer je zasejano po 3 mL rastvora spora (pripremljen kao što je opisano 4.2.1) koncentracije $2,32 \times 10^7$ spora/mL.
- Fermentacija je postavljena u termostat šejkeru pri uslovima mešanja od 150 rpm na 28°C tokom 7 dana.

4.4.3 Ispitivanje uticaja brzine mešanja na produkciju celulaza

Uslovi fermentacije:

- Fermentacioni produkciono medijum (bez CMC) i inokulacija su urađeni kao u 4.4.2 upotrebom 1,5 g netretirane slame kao supstrata.
- Brzine mešanja: 150 i 210 rpm
- Kombinovani uslovi fermentacije: 4 dana stajaća kultura (termostat bez mešanja) i 3 dana uslovi mešanja na 150 rpm.

4.4.4 Ispitivanje uticaja inokulacije na produkciju celulaza

Ispitivana su tri različita uticaja inokulacije: suspenzija spora, miceliarni inokulum i miceliarni disk.

4.4.4.1 Suspenzija spora

Suspenzija spora je pripravljena kao što je opisano u 4.2.1. nakon rasta gljiva na PDA podlozi tokom 7 dana. Za inokulaciju je korišćen rastvor spora koncentracije 1×10^5 spora/mL. Svaki erlenmajer je inokulisan sa 3 mL rastvora spora.

4.4.4.2 Miceliarni inokulum

Ispitivana su tri različita tipa inokuluma:

Inokulum 1 (I1): za pripremu inokuluma 3 mL rastvora spora pripravljena kao u 4.4.4.1 je inokulivano u 30 mL kvašćevog medijuma čiji je sastav prikazan u tekstu dole. Rast micelijuma je postignut tokom 4 h na 28°C i 150 rpm.

Inokulum 2 (I2): nakon rasta spora TH2 na PDA nakon 7 dana na 28°C napravljen je rastvor spora čiji je OD iznosio $2,23 \times 10^7$ spora/mL. Za pripremu inokuluma 3 mL rastvora spora je inokulivano u 30 mL kvašćevog medijuma. Nakon rasta na 28°C i 210 rpm tokom 48 h inokulum je korišćen za inokulaciju za fermentaciju.

Inokulum 3 (I3): inokulum je pripremljen na identičan način kao i inokulum 2, ali je razlika što su za inokulaciju korišćene spore koje su dobijene nakon 14 dana rasta na PDA podlozi na 28°C.

Tečni hranljivi medijum (kvašćev medijum) za pripremu inokuluma

glukoza	10 g/L
ekstrakt kvasca	3 g/L
pepton 1	5 g/L
sladni ekstrakt	3 g/L
vode	do 1L

U fermentacioni medijum, koji je pripremljen kao u 4.2, su inokulivane dobivene konidije tako da je njihova koncentracija iznosila 10%.

4.4.4.3 Miceliarni disk

Izolat TH2 je kultivisan na sladnom agaru tokom 7 dana na 28°C. Upotrebom ubodne eze isečen je deo agara sa micelijom i sporama veličine 0,5 x 0,5 cm. U sterilnim uslovima ovakav miceliarni disk je prenet u podlogu koja je pripremljena na način na koji je opisan u poglavlju 4.4.2.

Fermentacije su postavljene u uslovima mešanja od 210 rpm i 28°C tokom 7 dana.

4.4.5 Ispitivanje uticaja azota na produkciju enzima obogaćivanjem slame prirodnim izvorima azota

Ispitivana su tri tipa izvora azota na produkciju enzima: otpad soje, otpad susama, sintetički izvor azota (soli).

4.4.5.1 Priprema otpada soje

Sirove stabljike soje, organski tip, su sakupljene sa poljoprivrednog polja u Somboru, Srbija. Soja je odvojena od mahuna, a stabljike su ručno usitnjene nakon čega su mahune i stabljike usitnjene do veličine 2-3 cm upotrebom Moulinex mlina.

U erlenmajere od 250 mL odmereno je 50 mL podloge (kao u odeljku 4.4.2) i 1,5 g slame. U ovako pripremljenu podlogu dodato je 1,5 g mahuna i 1,5 g stabljika.

4.4.5.2 Priprema otpada od susama

Kao proteinski dodatak medijumu sa slamom, kao supstratom, korišćen je otpad od susama koji je dobijen u procesu pripreme susamovog mleka koje se koristi u kozmetičke svrhe. Susam (100 g) je preliven sa 500 mL vode i inkubiran na 4°C preko noci (16 h). Nakon toga susam je odvojen od vode ceđenjem kroz plastičnu cediljku. Susam je homogenizovan upotrebom Moulinex blendera. Čvrsti deo (otpada od susama) je odvojen od tečnog dela (mleka) ceđenjem kroz gazu. Ovako pripremljen otpad susama je korišćen kao prirodni izvor proteina za produkciju celulaznog kompleksa enzima.

U erlenmajere od 250 mL odmereno je 50 mL podloge i 1,5 g slame. U ovako pripremljenu podlogu dodato je 2,4 g otpada susama.

4.4.5.3 Sintetički izvor azota (soli)

Kao sintetički izvor azota korišćen je amonijum-sulfat i urea. U medijum za pripremu podloge dodato je 1,4 g/L amonijum-sulfat i 0,3 g/L uree. U ovakav medijum odmereno je 1,5 g slame.

Uslovi fermentacije:

- Za inokulaciju korišćen je Inokulum 2.
- Fermentacija je postavljena na 28°C tokom 7 dana u uslovima mešanja (210 rpm) koji su obezbeđeni u šejkeru.

4.4.6 Produkcija celulaza tokom vremena fermentacije

Izolati TH2 je gajen na PDA podlozi na 28°C tokom 7 dana. Dobijene spore su korišćene za pripremu inokuluma kao što je opisano u poglavlju 4.4.4.2.

Uslovi fermentacije:

- U erlenmajere od 250 mL, sa širokim grlom i mikrobiloškim vatenim čepovima, odmereno je 50 mL fermentacionog produkcionog medijuma (bez CMC) čiji sastav prikazan u odeljku 4.4.2.
- 1,5 g slame je dodato medijumu i podloge su autoklavirane na 20 min na 120°C. Nakon hlađenja na podloge, u svaki erlenmajer je zasejano po 10% inokuluma 2.
- Uslovi mešanja 210 rpm tokom 7 dana na 28°C.

4.4.7 Prekid fermentacije, priprema FT i analiza FT

Nakon gajenja, fermentacija je prekinuta odvajanjem čvrstog dela (slame sa biomasom) od fermentacione tečnosti ceđenjem kroz plastičnu cediljku. FT, koji je korišćen za analizu, je dobijen centrifugiranjem fermentacione tečnosti tokom 1 min na 14500.

U dobijenim FT je određena koncentracija redukujući šećeri, koncentracija ekstracelularnih proteina, aktivnost endocelulaza, egzocelulaza i β -glukozidaze. Takođe, izmerena je zapremina, konduktivitet, i pH vrednost.

4.4.8 Analiza fermentacionih tečnosti

Sve fermentacione tečnosti dobijene u toku izrade ove disertacije su analizirane na prisustvo redukujućih šećera koji su rezultat hidrolize supstrata prisutnih u podlogama, a dejstvom produkovanih ekstracelularnih enzima. Takođe su određivane aktivnosti prisutnih enzima celulaznog kompleksa i koncentracije ukupnih produkovanih ekstracelularnih proteina.

4.4.8.1 Određivanje koncentracije redukujućih šećera

Za određivanje koncentracije redukujućih šećera korišćena je standardna prava dobivena upotrebom glukoze kao standarda. Koncentracije glukoze korišćene za konstrukciju standardne prave su prikazane u tabeli 17.

1. 3,5-dinitro-salicinatni (DNSA, dinitrosalicilna kiselina) reagens:

A. dinitrosalicilatni rastvor u NaOH

NaOH	8 g
DNSA	5 g
vode do	100 mL

B. Tartaratni rastvor

KNa-tartarat	150 g
vode do	250 mL

pomešaju se rastvori A i B i doda se voda do 500 mL.

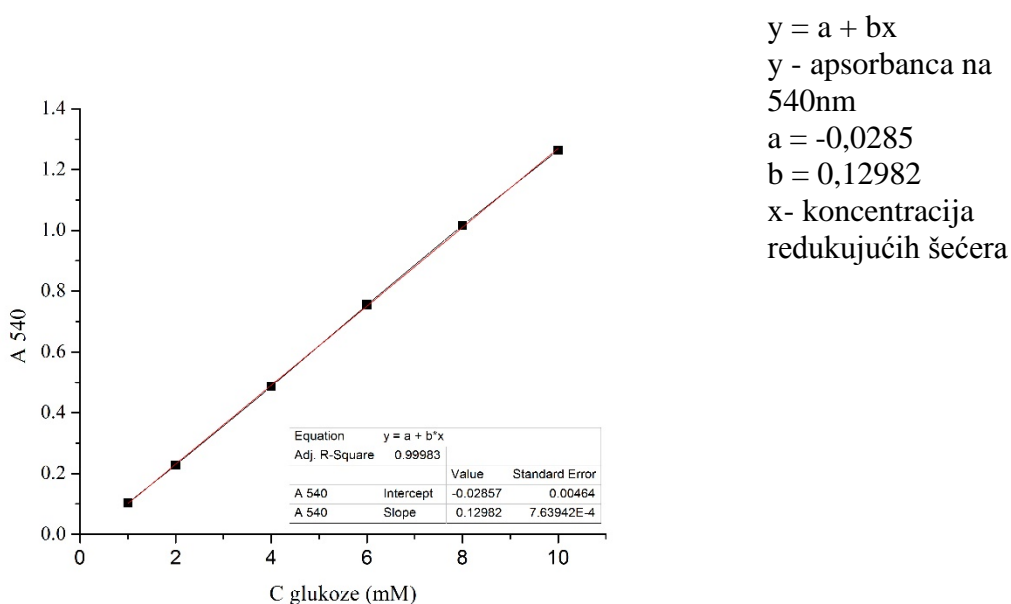
2. 10 mM rastvor glukoze

glukoza	0,018016g
voda	10,06 mL

Tabela 17. Zapremine standarda i vode koji se koriste za dobijanje odgovarajuće koncentracije za standardne krivu. Najkoncentrovaniji rastvor, 10 mM, predstavlja granicu linearnosti

Koncentracija glukoze (mM)	V standarda (μL)	V vode (μL)
10	500	0
8	400	100
6	300	200
4	200	300
2	100	400
1	50	450
0,5	25	475

U epruvete je odmereno po 500 μL rastvora standarda i 500 μL DNS reagensa. Za svaku koncentraciju standarda rađeno je u duplikatu. Slepa proba je 500 μL vode i 500 μL DNS reagensa. Probe su vorteksirane i inkubirane 5 minuta u ključalom vodenom kupatilu. Nakon toga su ohlađene, razblažene sa 4 mL vode i merena je apsorbanca na 540 nm prema slepoj probi.



Slika 48. Standardna prava zavisnosti A od koncentracije redukujućih šećera

Na osnovu ove jednačine izračunate su koncentracije redukujućih šećera tj. vrednosti x.

4.4.8.2 Određivanje koncentracije proteina po Bradfordu

Metoda za određivanje koncentracije proteina po Bradfordu se zasniva na specifičnom bojenju proteina bojom *Coomassie brilliant blue* (CBB).

Priprema boje, CBB G-250 (G-250)

CBB G -250	100 mg
95 % etanol	50 mL
H ₃ PO ₄	100 mL
destilovana voda	do 200 mL

Boja je rastvorena u etanolu nakon čega je dodata kiselina i voda i reagens su promešani do dobijanja homogenosti. Ovakav reagens je korišćen za određivanje koncentracije intracelularnih i ekstracelularnih proteina.

Bradford-ov reagens

Rastvor 1	100 mL
destilovana voda do	500 mL

Kao standard za određivanje koncentracije proteina korišćen je goveđi serum albumin (BSA). Koncentrovani rastvor BSA, 1 mg/mL, je razblažen u opsegu 0,1 do 1,0 mg/mL kao što je prikazano u tabeli 18.

Tabela 18. Zapremine standarda i vode koji se koriste za dobijanje odgovarajuće koncentracije za standardne krivu. Najkoncentrovaniji rastvor, 1 mg/mL, predstavlja granicu linearnosti

BSA (1 mg/mL)	destilovana voda (μL)	finalna koncentracija (mg/mL)
10	90	0,1
20	80	0,2
40	60	0,4
60	40	0,6
80	20	0,8
100	-	1,0
-	100	-

U 100 μL rastvora (uzorak + pufer) dodato je 5 mL razblaženog rastvora boje. Smeša je vorteksovana na vibracionoj mešalici. Nakon 30 minuta merena je apsorbanacija na 595 nm.

4.4.8.3 Određivanje endocelulazne aktivnosti

Uzeto je 50 μL pripremljenih uzoraka i pomešano sa 450 μL 2% (w/V) CMC, pripremljenom u 50 mM acetatnom puferu pH 5,0. Reakcione smeše su inkubirane tokom 60 min na 50°C. Svaki uzorak je imao svoju slepu probu (redosled dodavanja je drugačiji: DNS reagensa + 2% CMC u 50 mM acetatnom puferu pH 5,0 + uzorak). Nakon 60 min reakcija je prekinuta dodatkom 500 μL DNS reagensa i određivana je koncentracija redukujućih šećera [304]. Uzorci su inkubirani 5 min u ključalom vodenom kupatilu, ohlađeni, razblaženi sa 4 mL vode, vorteksovani i merena je apsorbanacija na 540 nm prema slepoj probi. Kao standard korišćena je glukoza.

Na osnovu jednačine standardne krive izračunata je koncentracija redukujućih šećera.

$$y = -0,01809 + 0,16748 x$$

Dobijena vrednost se ubaci u jednačnu za izračunavanje enzimske aktivnosti.

Jednačina za izračunavanje emzimske aktivnosti (U/mL)

$$C_e = \frac{(C_{r\check{s}} \times V_{r\check{s}})}{(t \times V_e)} \times R$$

C_e – enzimska aktivnost u IU

t – vreme trajanja eseja (min)

$C_{r\check{s}}$ – koncentracija redukujućih šećera (mM)

V_e – zapremina enzima (mL)

$V_{r\check{s}}$ – zapremina reakcione smeše (mL)

R – razbalaženje

Na osnovu gore prikazane jednačine dobije se koncentracija enzima izražena u internacionalnim jedinicama po mililitru rastvora (IU/mL). Da bi se izračunala enzimska aktivnost po g (U/g), potrebno je ovu vrednost pomnožiti sa zapreminom fermentacione tečnosti i podeliti sa masom podloge postavljene na početku fermentacije. Specifična aktivnost (U/mg) je izražena kao 1U po 1 mg proteina pristuna u FT.

Priprema 2% CMC

50 mM Acetatni pufer pH 5,0

sićetna kiselina	2,84 mL
vode do	1000 mL

2% CMC

CMC	0,60 g
50 mM Acetatni pufer pH 5,0	30 mL

U času od 100 mL izmereno je 0,30 g CMC. Dodato je nekoliko kapi vode, da se napravi pasta. Ostatak vode je zagrejan do ključanja i u jednom koraku je dodata u napravljenu pastu, do mase 30 g.

4.4.8.4 Određivanje β -glukozidazne aktivnosti

Uzorak i supstrat su odmereni i reakciona smeša je inkubirana 30 min na 37°C. Reakcija je prekinuta dodatkom stop reagensa. Merena je A na 405 nm. Slepa proba je sadržala sve komponente reakcione smeše, ali je redosled pipetiranja takav da je pre dodatka supstrata dodat stop reagens.

Sastav smeše	Zapremina za kivetu (μ L)	Zapremina za mikrotitar pličicu (μ L)
Uzorak	17	4
Supstrat	300	50
Stop reagens	52	8

Jedna jedinica β -glukozidaze (U/mL) se definiše kao količina enzima neophodna za oslobađanje 1 μ mola *p*-nitrofenola po 1 min pri datim uslovima eseja. Specifična aktivnost (U/mg) je izražena kao 1U po 1 mg proteina pristuna u FE. Ekstinkcioni koeficijent 4-nitrofenola je 18,5 cm²/ μ mol.

Formula za izračunavanje enzimске aktivnosti – EA (U/mL)

$$EA = \frac{\Delta A * V_{RS}}{\epsilon * V_E * l} \qquad \Delta A = \frac{A}{t}, V_E = \frac{V_u}{R}$$

A – apsorbancija izmerena na 405 nm

t – vreme reakcije (min)

V_u – zapremina uzorka enzima = 0,025 mL

R- razblaženje enzima

V_{RS} – zapremina reakcione smeše (mL) = 0,525 mL

ε – ekstinkcioni koeficijent = 18,5 cm²/μmol

V_E – zapremina enzima u reakcionoj smeši (mL) = 0,025/Razblaženje enzima

l – debljina kivete, 1 cm

Pufer 1 (50 mM acetatni pufer pH 5,0)

sirćetna kiselina	2,84 mL
vode do	1000 mL

Supstrat

0.5 mM 4-nitrofenil β-D-glukopiranozid (rastvoren u puferu)

Stop reagens (1 M Na₂CO₃)

Na ₂ CO ₃	10,6 g
destilovana voda	100 mL

4.4.8.5 Određivanje egzocelulazne aktivnosti

Uzorak, inhibitor i supstrat su odmereni i reakciona smeša je inkubirana 30 min na 37°C. Reakcija je prekinuta dodatkom stop reagensa. Merena je A na 405 nm. Slepna proba je sadržala sve komponente reakcione smeše, ali je redosled pipetiranja takav da je pre dodatka supstrata dodat stop reagens.

Sastav smeše	Zapremina za kivetu (μL)	Zapremina za mikrotitar plićicu (μL)
Uzorak	17	4
Inhibitor	50	8
Supstrat	300	50
Stop reagens	52	8

Jedna jedinica egzocelulaze (U/mL) se definiše kao količina enzima neophodna za oslobađanje 1 μ mola *p*-nitrofenola po 1 min pri datim uslovima eseja. Specifična aktivnost (U/mg) je izražena kao 1U po 1 mg proteina pristuna u FE. Ekstinkcioni koeficijent 4-nitrofenola je 18,5 cm²/ μ mol. Za izračunavanje egzocelulazne aktivnosti korišćena je ista formula koja je opisana za određivanje β -glukozidazne aktivnosti (odjeljak 4.4.8.4).

Pufer 1 (50 mM acetatni pufer pH 5,0)

sirćetna kiselina	2,84 mL
vode do	1000 mL

Supstrat

0.5 mM 4-nitrofenil β -D-celobiozid (rastvoren u puferu)

Inhibitor (0.5 mM β -glukonolakton)

β -glukonolakton	0,0089g
destilovana voda	100 mL

Stop reagens (1 M Na₂CO₃)

Na ₂ CO ₃	10,6 g
destilovana voda	100 mL

4.5 Simultana zimogramska detekcija celulaza (zimogram)

Simultana zimogramska detekcija celulaza je obuhvatala dve faze. Prva faza je elektroforetsko razdvajanje proteina u uzorcima fermentacionih tečnosti. Metoda izbora je bila nativno razdvajanje proteina gde će se očuvati njihova 3D struktura i enzimaska aktivnost i to je izabrano izoelektrično fokusiranje.

4.5.1 Izoelektrično fokusiranje uzoraka fermentacionih tečnosti

IEF je urađeno na Multiphor II sistemu za elektroforezu (LKB Pharmacia, Uppsala, Sweden). Proteini su razdvajani na 7,5% poliakrilamidnom gelu sa amfolitima u opsegu pH 3,0 – 9,0 (Amershan Biosciences, Uppsala, Sweden). Kao standard korišćeni su pI markeri u opsegu 3,6-9,3 (Sigma-Aldrich).

Poliakrilamidni rastvor za polimerizaciju je nadslojen zasićenim rastvorom *n*-butnola. Nakon 1 časa polimerizacije, sendvič je pažljivo otvoren i ploča sa polimerizovanim gelom je prenetna na hladnjak. Hladnjak je prethodno nakvašen destilovanom vodom i ploča sa gelom je stavljena na hladnjak tako da se voda ravnomerno rasporedi ispod ploče. Višak vode je uklonjen papirnom vatom.

Sastav zapripremu 7,5% gela za izoelektrofokusing (mL):

akrilamid (30%)	3,75
amfoliti (pI 3,0 – 9,0)	0,75
glicerol (50%)	6,5
destilovana voda	6,75
dezaeracija 5 - 10 min	
Temed	12 μ L
APS	75 μ L

Papirne elektrode su potopljene u elektrodni rastvor, a višak rastvora je uklonjen ravnomernim rolanjem papirnih elektroda između dva sloja papirne vate. Ovako pripremljene papirne elektrode su nanete na gel.

Elektrodni rastvori

Anodni elektrolit 75 mM H₂SO₄

koncentrovana H ₂ SO ₄	1,0 mL
voda do	0,25 L

Katodni elektrolit 150 mM NaOH

NaOH	0,3 g
voda do	50 mL

Na sredinu gela je nanet silikonski aplikator za nanošenje uzoraka. Za razdvajanje IEF-em na gel je nanteo 30 μ L uzoraka. Sirovi fermentacioni ekstrakti su razdvojeni IEF tokom 2 h i 1 min na 1054 V 4,7 mA sa konstantnom snagom od 5 W i temperaturi od 10°C. Nakon elektroforetskog razdvajanja proteina, gel je ispran u vodi tokom 5 min i takav gel je korišćen za zimogramsku detekciju endocelulaza, egzocelulaza i β -glukozidaza.

4.5.2 Zimogramska detekcija β -glukozidaza

β -glukozidazne izoforme su detektovane upotrebom NC membrane. NC membrana, veličine gela, je aktivirana inkubiranjem u destilovanoj vodi tokom 10 min. Na staklenu ploču je prenet IEF gel i na njega je postavljena NC membrana. Višak vode je pokupljen i preko NC membrane su postavljena dva sloja filter papira veličine nitrocelulozne membrane. Na filter papir su postavljena dva soja papirne vate i staklena ploča veličine sendviča na koju je postavljen teg (300 g). Na ovaj način su proteini transferovani na NC membranu kapilarnim silama. Nakon 15 min NC membrana je odvojena od gela i na njoj su detektovane β -glukozidazne izoforme upotrebom 0,1% eskulina i 0,03% FeCl_3 pripremljenim u 50 mM acetatnom puferu pH 5,7 kao substratu. NC membrana je inkubirana u ovom rastvoru 5 min na 50°C. Na mestima β -glukozidazne aktivnosti detektovane su tamno-braon trake na beloj pozadini NC membrane. Membrana je skenirala upotrebom HP skenera G3110.

0,5 M Acetatni pufer

glacijalna sirćetna kiselina	2,84 mL
voda do	100 mL

50 mM acetatni pufer je pripremljen razblaživanjem 0,5 M acetatnog pufera 10 X u vodi.

Supstrat za detekciju β -glukozidaza

eskulin	0,1 g
FeCl_3	0,03 g
vode do	100 mL

4.5.3 Zimogramska detekcija endocelulaza

Za detekciju endocelulaza korišćen je akrilamidni gel (7,5%) sa kopolimerizovanom 0,1% CMC (TCL, viskoznosti 1% u vodi na 25°C iznosi 900-1400 mPa-s), CMC gel.

Sastav za pripremu supstratnog gela:

Sastav	(mL)
AA (30%)	3,75
50 mM acetatni pufer pH 5,0	0,75
1 % CMC (u vodi)	1,5
destilovana voda	6,75
dezaeracija 5 - 10 min	
Temed	12 μ L
APS	75 μ L

Na IEF gel je postavljen CMC gel veličine IEF gela. Višak vode je pokupljen i na CMC gel su postavljena dva sloja filter papira i dva sloja papirne vate veličine gelova. Na ovakav sendvič je stavljena staklena ploča i na nju teg (300 g). Nakon printa tokom 30 min, CMC gel odvojen od IEF gela i inkubiran 5 min na 50°C u 50 mM acetatnom puferu pH 5,0. Kako bi se detektovale endocelulaze gel je inkubiran, u uslovima konstantnog mešanja, tokom 10 min u 0,1% rastvoru Congo red (pripremljenom u destilovanoj vodi). Za obezbojavanje gela korišćen je 1 M rastvor NaCl. Gel je inkubiran u ovom rastvoru uz višestruku izmenu do pojave prosvetljenih traka na mestima endocelulazne aktivnosti na crvenoj pozadini gela. Za povećanje rezolucije gela korišćen je rastvor 7% sirćetne kiseline za promenu boje gela od crvene do plave i gel je skeniran.

1,0% CMC

CMC	0,30 g
vode do	30 mL

U času od 100 mL izmereno je 0,30 g CMC. Dodato je nekoliko kapi vode, da se napravi pasta. Ostatak vode je zagrejan do ključanja i u jednom koraku je dodata u napravljenu pastu, do mase 30 g.

0,1% Congo red

Congo red	0,1 g
vode do	100 mL

1 M NaCl

NaCl	29,25 g
vode do	500 mL

4.5.4 Zimogramska detekcija egzocelulaza

IEF gel inkubiran 5 min u 0,5 mM rastvoru D-glukono- δ -laktone, pripremljenom u vodi, za inhibiranje β -glukozidaze. Rastvor je uklonjen i gel je inkubiran 5 min na 50°C u mešavini istog rastvora sa 0,5 mM MUC pripremljenom u 50 mM acetatnom puferu pH 5,0. Kako bi se detektovale egzocelulazne izoforme gel je izložen UV svetlosti. Na mestima egzocelulazne aktivnosti detektovane su plave trake. Kako bi se napravila upotrebljiva slika gel je slikan upotrebom žutog filtera tako da se na finalnoj slici na mestima egzocelulazne aktivnosti vide zelene slike.

0,5 mM D-glucono- δ -laktone

D-glucono- δ -laktone	0,089 g
vode do	100 mL

4-metilumberilferil- β -D-celobiozid (MUC)

MUC	0,017 g
vode do	100 mL

4.6 Upotreba iskorišćenog komposta šampinjona kao supstrata za produkciju enzima

Sirovi iskorišćeni kompost nakon gajenja šampinjona (SMC) je dobiven sa lokalnog gajilišta šampinjona i korišćen je kao podloga za SSF.

Uslovi SSF fermentacije:

- Podloga 50 g
- dodata je voda da se postigne vlažnost od 60%.
- Inokulacija sojeva (TK1, TH2, TA1, T10, T42 i T55): rastvor spora $1,0 \times 10^5$ (1:15 (w/V)).
- SSF je postaljena u 28°C i prekinuta je nakon 7 dana.

4.6.1 Prekid fermentacije

Svakoj podlozi je dodato 50 mL 50 mM acetatnog pufera pH 5,0 u odnosu 1:2 w/V. Upotrebom špatule podloga je usitnjena i prebačena u sud za homogenizaciju. Homogenizacija je urađena upotrebom ručnog tureksa po 15 s u tri ciklusa. Podloge su inkubirane na sobnoj temperaturi tokom 1 h. Sirovi ekstrakti (FT) su odvojeni od čvrstog dela ceđenjem kroz plastičnu cediljku. FT su izbistreni nakon centrifugiranja na 5000 g i 15 min. Sirovi bistri ekstrakti su korišćeni za enzimsku analizu. Praćena je produkcija četiri enzima: endocelulaza i β -glukozidaza. Takođe, u zaostalom kompostu su analizirane mikroskopske promene na površini slame.

4.6.2 Mikroskopska analiza slame

Slama prisutna u kompostu koji je korišćen kao supstrat za gajenje *A. bisporus*-a i kompost nakon gajenja *Trichoderma* sp. je analizirana upotrebom svetlosnog mikroskopa (LeitzDiaplan mikroskop) sa uveličanjem 25 puta. Kao kontrolna korišćena je sirova netretirana slama.

4.6.2.1 Priprema mikroskopskih preparata slame

Delovi slame (poreklom iz komposta) su isprani sterilnom vodom u Petrijevoj šolji kako bi se uklonili ostali delovi podloge. Na mikroskopske pločice su stavljeni uzorci slame tako da se napravi jedan sloj i prekriven je pokrovnim staklom. Ovakvi uzorci su mikroskopirani. Za analizu promena na površini slame korišćen je svetlosni mikroskop (LeitzDiaplan) upotrebom uveličanja 25 puta. ATCA -1.31 C mikroskopska kamera je korišćena za snimanje. Dobijene FT su analizirane kao što je opisano u poglavlju 4.4.8.

4.7 Poboljšanje produkcije celulaznih enzima

Dve vrste mutacija su korišćene za povećanje produkcije celulaznih enzima soja TH2: hemijska i fizička, posle čega je usledila selekcija dobijenih mutanata na produkciju celulaza i ispitivanje nivoa produkovanih enzima selektovanih mutanata na slami.

4.7.1 Hemijska mutacija upotrebom NaNO₂

Priprema rastvora spora: rastvor spora je napravljen u 0,025% Triton X -100 i njihov OD je iznosio 0,150 (A na 605 nm). Za svaku probu, rastvor spora je mešan na šejkeru 3 h na sobnoj temeperaturi (što predstavlja hidrataciju spora). Rastvor spora je centrifugiran, supernatant je dekantovan i sporama je dodato 1,8 mL 100 mM acetatnog pufera pH 4,5 i 200 µL NaNO₂ koncentracije 5,0 mg/mL i 7,5 mg/mL. Rastvor spora je inkubiran u uslovima mešanja u šejkeru na sobnoj temperature tokom 10 min. Nakon toga je rastvor spora centrifugiran i spore su isprane 2 puta u 50 mM fosfatnom puferu pH 7,0. Uzeto je 0,5 mL ovog rastvora spora i dodato je 1,5 mL 50 mM acetatnog pufer pH 4,5.

4.7.2 Fizička mutacija ultravioletnim svetlom (UV)

Priprema rastvora spora: korišćen je rastvor spora pripremljen kao u 4.7.1 Nakon centrifugiranja zaostalim sporama je dodato 2,0 mL 100 mM acetatnog pufera pH 4,5. U sterilnim uslovima ovaj rastvor spora je prebačen u praznu Petri šolju i mutiran je pod UV lampom. Vreme mutiranja je 1, 5, 20, 60 sekundi. Uzeto je 0,5 mL ovog rastvora spora i dodato je 1,5 mL 50 mM acetatnog pufer pH 4,5.

Priprema serijskog razblaženja spora

Rastvor spora koji je dobijen nakon mutiranja je razblažen 3,5 puta. Od ovog rastvora spora napravljena je serija razblaženja 10¹ do 10⁴ u rastvoru 0,1% TWEEN – a 80. Napravljena su razblaženja od 10¹ do 10⁵. Pripremljena razblaženja spora (0,5 mL) su zasejana na podloge upotrebom staklenom mikrobiološkog štapića.

Tabela 19. Sastav tečnog medijuma za pripremu podloga agara sa 0,5% CMC

YE	0,1 g/L
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g/L
KH ₂ PO ₄	0,2 g/L
NaH ₂ PO ₄	0,4

Podloge su inkubirane u suvom termostatu na 28°C u mraku kako bi došlo do rasta kolonija. Praćen je rast kolonija kako ne bi došlo do prerastanja između kolonija i rast je prekinut u odgovarajućem trenutku.

4.7.3 Selekcija mutanata

Ploče agara sa 0,5% CMC su bojene rastvorom 0,1% Congo red - a i obezbojavane rastvorom 1 M NaCl kako bi se na mestima rasta celulolitički aktivnih mutanata pojavila prosvetljenja. Svi sojevi oko kojih je detektovana prosvetljena zona su selektovani kao mutanti (M) i korišćeni za analizu.

Selekcija mutanata je urađena upotrebom brzog testa na CMC. Test je urađen kao što je opisano u poglavlju 4.2.

4.7.4 Produkcija celulaznog kompleksa enzima gajenjem mutanata na slami kao supstratu

Postupak fermentacije, prekida fermentacije (u 7 danu), priprema sirovog ekstrakta i analiza FT je urađena kao što je opisano u poglavlju 4.4.6 i 4.4.7.

4.8 Kontrola produkcije enzima celulaznog kompleksa enzima izolata *T. guizhouensis*

Kontrola produkcije je obuhvatila dve faze: određivanje nivoa iRNA transkripcionih faktora odgovornih za produkciju celulaza kod gljiva kao prvu fazu i određivanje nivoa pojedinačnih celulaznih enzima kao drugu fazu. *T. guizhouensis* je za ove analize gajen na podlozi sa mikrokristalnom celulozom kao inducerom.

4.8.1 PCR verifikacija *xyr1* i *lae1* gena u izolatima TH2 i TH6

Amplifikacija gena *xyr1* i *lae1* je urađena upotrebom prajmera čije su sekvence prikazane u Prilogu 2. Prajmeri su dizajnirani upotrebom programa za dizajniranje prajmera NCBI Primer design [332]. Uslovi PCR reakcije za amplifikaciju *xyr1* gena prikazani su u tabeli 20 i 21 dok su uslovi za amplifikaciju *lae1* gena prikazani u tabeli 22 i 23. Agarozna elektroforeza je urađena kao što je opisano u odeljku 4.3.2.3.

Tabela 20. Sastav komponenti za amplifikaciju *xyr1* gena

Sastav	Finalna koncentracija (M)	μL (1 reakcija)
Pufer (Promega) 10 Fach	1	10,0
Nukleotidi 10 mM (Promega)	$1,6 \times 10^{-4}$	4,0
MgCl ₂	$3,0 \times 10^{-3}$	6,0
Xyr1_916_Fw (100 μM)	$2,5 \times 10^{-7}$	2,0
Xyr1_916_REV (100 μM)	$2,5 \times 10^{-7}$	2,0
Taq polimeraza (Promega)	0,5	0,1
PCR voda		20,90
DNA		5

Tabela 21. Uslovi za amplifikaciju *xyr1* gena

		Temperatura (°C)	Vreme (min)
Denaturacija DNA		95	2
30 ciklusa	Denaturacija	95	1
	Vezivanje prajmera	59,1	1
	Sinteza fragmenta DNA (elongacija)	72	3
Elongacija		72	10

Tabela 22. Sastav komponenti i uslovi PCR za amplifikaciju *lae1* gena

Sastav	Finalna koncentracija (μM)	μL (1 reakcija) 25 μM
5xPhusion HF Pufer	1X	5,0
Nukleotidi 10 mM (Promega)	200	0,5
916Lae1_inf_fw (100 μM)	0,5	1,25
916Lae1_inf_rev (100 μM)	0,5	1,25
Phusion DNA Polymerase	0,5 Units/25 μL	0,25
PCR voda		15,75
DNA		1,0

Tabela 23. Uslovi za amplifikaciju *laeI* gena

		Temperatura (°C)	Vreme (sek)
Denaturacija DNA		98	10
30 ciklusa	Denaturacija	98	10
	Vezivanje prajmera	65	30
	Sinteza fragmenta DNA (elongacija)	72	110
Elongacija		72	10

PCR produkti su izolovani i prečišćeni upotrebom PCR purification kit Metabion international AG, Nemačka (Prilog 3).

4.8.2 Produkcija celulaznih enzima na mikrokristalnoj celulozi

U erlenmajere od 1 L odmereno je 250 mL sintetičkog medijuma sa 1% mikrokristalnom celulozom (Serva) kao sintetičkim supstratom za produkciju celulaza. Nakon autoklaviranja i hlađenja na podloge je zasejan rastvor spora čija je finalna koncentracija iznosila $2,5 \times 10^8$ spora/mL.

Sastav	Količina (g/L)
<i>KH₂PO₄</i>	5,0
<i>(NH₄)₂SO₄</i>	1,4
<i>Urea</i>	0,3
<i>MgSO₄ x 7 H₂O</i>	0,3
<i>CaCl₂</i>	0,3
<i>Elementi u tragovima</i>	20 mL/L
<i>Peptone (poreklom od kazeina)</i>	1,0
<i>Mikrokristalna celuloza</i>	1%
<i>TWEEN 20</i>	2 g/L
Elementi u tragovima	
<i>FeSO₄ x 7 H₂O</i>	250 mg/L
<i>MnSO₄ x H₂O</i>	85 mg/mL
<i>ZnSO₄ x 7 H₂O</i>	70 mg/mL
<i>CoCl₂ x 2H₂O</i>	100 mg/mL

Fermentacija je postavljena u uslovima tečne fermentacije na 28°C i 250 rpm i prekidana u 24, 48, 72 i 96 h uzimanjem 50 mL FT sa micelijumom. FT je odvojena od micelijuma centrifugiranjem tokom 10 min na 14000 rpm i korišćena je za analizu koncentracije ekstracelularnih proteina i enocelulazne aktivnosti. Kako bi se prekinuli svi sintetički metabolički putevi u micelijumu, odmah nakon centrifugiranja micelijum je potopljen u tečni azot i sačuvan na -80°C. Micelijum je korišćen za izolovanje RNA i za određivanje koncentracije intracelularnih proteina.

4.8.3 Priprema rastvora spora

Izolati TH2 i TH6 su kultivisani na velike Petri šolje sa PDA podlogom. Nakon rasta tokom 7 dana Petrijeve šolje su prelivene sa po 10 mL sterilnog fiziološkog rastvora sa 0,05% TWEEN-om 20. Spore su sakupljene ezom, filtrovane kroz plastične tubice u kojima je vata. Dobijeno je oko 6-8 mL rastvora spora.

U staklene Biolog epruvete je odmereno 10 mL fiziološkog rastvora sa 0,05% TWEEN-om 20. Na turbidometru je podešena slepa proba na 75% i dodavano je onoliko spora koliko je potrebno da se dobije promena turbiditeta od 25%. U takvom rastvoru spora ima 4×10^7 spora. Upotrebom jednačine preračunato je koliko je ovog rastvora spora potrebno dodati u 250 mL medijuma kako bi finalna koncentracija spora iznosila $2,5 \times 10^8$.

Za promenu turbiditeta od 25 % izolata TH2 bilo je potrebno dodati 0,375 mL rastvora spora 4×10^7 dok je za izolat TH6 bilo potrebno dodati 0,13 rastvora spora. Upotrebom jednačine prikazane ispod izračunato je potrebna količina spora za fermentaciju.

$$\mathbf{X \text{ mL rastvora} = (2,5 \times 10^8 / 4 \times 10^7) \times V \text{ (mL) neophodna za promenu turbiditeta od 25\%}$$

4.8.4 Određivanje biomase

Nakon prekida fermentacije, u mikrocentrifugirajuće tube od 2 mL, čija je masa prethodno izmeren, odmereno je 2 mL FT zajedno sa micelijumom. FT je odvojena od micelijuma centrifugiranjem tokom 10 min na 14000 rpm. Tube sa micelijumom su inkubirane preko noći na 80°C nakon čega su ohlađene i izmerena im je masa. Od

dobijenih vrednosti oduzete su vrednosti praznih tuba. Dobijeni rezultati su preračunati na 1 L biomase.

4.8.5 Ekstrakcija RNA molekula i sinteza cDNA

RNA je izolovana iz micelijuma dobijenog nakon 24, 48 i 72 časa fermentacije. Nakon homogenizacije micelijuma, upotrebom tečnog azota RNA je izolovana upotrebom RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) praćenjem predloženog protokola poreklom od proizvođača (Prilog 3).

Dobijena RNA je korišćena za sinezu cDNA. Upotrebom RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, (Thermo Ficher Scientific) praćenjem predloženog protokola sintetisana je cDNA (Prilog 3).

4.8.6 qPCR analiza *xyr1*, *lae1* i *cbh1*

Dobijena cDNA je razblažena 10 X i korišćena je za ekspresionu analizu *xyr1*, *lae1* i *cbh1* gena. Sve qPCR analize su rađene u qTOWER 2.0 / 2.2 Real-Time Thermal Cycler, Anlaytic Jenaje. U tabeli 24 su prikazane količine pripremljene smeše neophodna za jednu reakciju. Prajmeri za qPCR amolifikaciju gena su prikazani u Prilogu 2.

Tabela 24. Sastav komponenti za pripremu 1 reakcije za qPCR

2X SYBR Green PCR Master Mix	12,5 µL
Prajmer fw	1,0 µL
Prajmer rev	1,0 µL
RNAse free voda	8,5 µL
cDNA	2 µL

Komponente su pomešane u sterilnim uslovima i distriburane u pločicu za qPCR reakcije. Pločica je zatvorena i postavljena u aparat za qPCR. Uslovi qPCR su prikazani u tabeli 25.

Tabela 25. Uslovi za qPCR *lae1*, *xyr1* i *chb1* gena

		Temperatura (°C)	Vreme (min)
Denaturacija DNA		95	3
40 ciklusa	Denaturacija	95	15 sek
	Vezivanje prajmera	58	20 sek
	Sinteza fragmenta DNK (elongacija)	72	20 sek
	Kriva topljenja	65-95	6 sek sa promenom T od 1°C

Efikasnost amplifikacije gena *xyr1*, *lae1* i *chb1* je izračunata na osnovu dobijenih kriva u programu IQ5 optičkog sistemskog programa 2.0 (IQ5 Optical system Software v2.0). Relativna genska ekspresija je dobivena upotrebom programa REST© Software [330]. Svi uzorci su analizirani u tripplikatu.

5. Literatura

1. L. Fulop and T. Ponyi, *J. Microbiol. Methods* **29**, 15 (1997).
2. S. T. Merino and J. Cherry, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **108**, 95 (2007).
3. D. W. Schaffner and R. T. Toledo, *Biotechnol. Bioeng.* **37**, 12 (1991).
4. C. P. Kubicek, M. Mikus, A. Schuster, M. Schmoll, and B. Seiboth, *Biotechnol. Biofuels* **2**, 19 (2009).
5. M. Mandels and E. T. Reese, *J. Bacteriol.* **73**, 269 (1957).
6. Peterson, R. and Nevalainen, H., *Microbiology* **158**, 58 (2012).
7. S. E. Diener, M. K. Chellappan, T. K. Mitchell, N. Dunn-Coleman, M. Ward, and R. A. Dean, *Fungal Genet. Biol.* **41**, 1077 (2004).
8. R. C. Kasana, R. Salwan, H. Dhar, S. Dutt, and A. Gulati, *Curr Microbiol* **57**, 503 (2008).
9. H.-P. Hohn and H. Sahm, in *Enzyme Technol.*, edited by P. D. reer nat R. M. Lafferty (Springer Berlin Heidelberg, 1983), pp. 55–68.
10. M. Mandels, F. W. Parrish, and E. T. Reese, *J. Bacteriol.* **83**, 400 (1962).
11. D. Sternberg and G. R. Mandels, *J. Bacteriol.* **139**, 761 (1979).
12. Ó. J. Sánchez and C. A. Cardona, *Bioresour. Technol.* **99**, 5270 (2008).
13. Y. Lin and S. Tanaka, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**, 627 (2006).
14. F. Talebnia, D. Karakashev, and I. Angelidaki, *Bioresour. Technol.* **101**, 4744 (2010).
15. L. Laureano-Perez, F. Teymouri, H. Alizadeh, and B. E. Dale, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **121–124**, 1081 (2005).
16. B. Wu, Y. Zhao, and P. J. Gao, *BioResources* **1**, 189 (2007).
17. Y.-H. P. Zhang, S.-Y. Ding, J. R. Mielenz, J.-B. Cui, R. T. Elander, M. Laser, M. E. Himmel, J. R. McMillan, and L. R. Lynd, *Biotechnol Bioeng* **97**, 214 (2007).
18. B. Dojnov, M. Grujić, and Z. Vujčić, *Electrophoresis* **0**, 1 (2015).
19. M. Dashtban, M. Maki, K. T. Leung, C. Mao, and W. Qin, *Crit. Rev. Biotechnol.* **30**, 302 (2010).
20. B. S. Montenecourt and D. E. Eveleigh, *Appl. Environ. Microbiol.* **34**, 777 (1977).
21. V. Seidl and B. Seiboth, *Biofuels* **1**, 343 (2010).

22. A. R. Mach-Aigner, M. E. Pucher, M. G. Steiger, G. E. Bauer, S. J. Preis, and R. L. Mach, *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 6554 (2008).
23. <https://www.bio.org/what-biotechnology>, (n.d.).
24. M. Papagianni, *Biotechnol. Adv.* **22**, 189 (2004).
25. J. F. Peberdy, *Trends Biotechnol.* **12**, 50 (1994).
26. D. Lubertozzi and J. D. Keasling, *Biotechnol. Adv.* **27**, 53 (2009).
27. A. Fleissner and P. Dersch, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**, 1255 (2010).
28. P. Saranraj, D. Stella, and D. Reetha, *Int. J. Biochem. Biotech Sci.* **1**, 1 (2012).
29. J. C. van Suijdam and B. Metz, *Biotechnol. Bioeng.* **23**, 111 (1981).
30. P. J. Punt, N. van Biezen, A. Conesa, A. Albers, J. Mangnus, and C. van den Hondel, *Trends Biotechnol.* **20**, 200 (2002).
31. H. W. Doelle, J. S. Rokem, and M. Berovic, *BIOTECHNOLOGY - Volume VI: Fundamentals in Biotechnology* (EOLSS Publications, 2009).
32. Brotman, Y., Kapuganti, J. G., and Viterbo, A., *Curr Biol* **20**, 390 (2010).
33. Klein, D. and Eveleigh, D. E., in (1998), pp. 57–69.
34. W. M. Jaklitsch, *Stud. Mycol.* **63**, 1 (2009).
35. Saloheimo, M. and Pakula, T. M., *Microbiology* **46** (2012).
36. I. S. Druzhinina, A. G. Kopchinskiy, and C. P. Kubicek, *Mycoscience* **47**, 55 (2006).
37. <https://www.scribd.com/doc/153390114/How-much-we-know-about-Trichoderma>, (n.d.).
38. Persoon, C.H., 63 (1794).
39. Tulasne, L.-R. and Tulasne, C., *Jussu Paris* (1865).
40. Bisby, G.R., *Trans Br Mycol Soc* **23**, 149 (1939).
41. Dingley, J. M., *Fr Trans Proc R Soc N. Z.* **84**, 689 (1957).
42. E. T. Reese, *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **9** (1976).
43. E. G. Simmons, *Abstr. 2nd Int. Mycol. Congr.* **2**, 618 (1977).
44. Rifai, M. A., *Mycol Pap* **116**, 1 (1969).
45. Doi, Y., *Bull. Natl. Sci. Mus. Tokyo* **15**, 649 (1972).
46. Bissett, J., *Can J Bot* **60**, 2357 (1991).
47. Bissett, J., *Can J Bot* **69**, 2373 (1991).
48. Bissett, J., *Can J Bot* **62**, 924 (1984).

49. Bissett, J., Can J Bot **69**, 2418 (1991).
50. Bissett, J., Can J Bot 639 (1992).
51. Samuels, G. J. and Seifert, K. A., Annu Rev Phytopathol **33**, 37 (1995).
52. I. D. Cristian P. Kubicek, J. Zhejiang Univ. Sci. **6B**, 100 (2005).
53. I. S. Druzhinina, A. G. Kopchinskiy, M. Komon, J. Bissett, G. Szakacs, and C. P. Kubicek, Fungal Genet. Biol. **42**, 813 (2005).
54. A. G. Kopchinskiy, M. Komon, C. P. Kubicek, and I. Druzhinina, Mycol Res **109**, 657 (2005).
55. P. Chaverri and G. J. Samuels, EVOLUTION (2013).
56. P. Chaverri, L. A. Castlebury, G. J. Samuels, and D. M. Geiser, Mol. Phylogenetics AndEvolution **20**, 302 (2003).
57. Lieckfeldt, E., Kuhls, K., and Muthumeenakshi, M., Taylor Francis Lond. **1**, 35 (1998).
58. Szekeres A, Láday M, Kredics L, Varga J, Antal Z, Hatvani L, Manczinger L, Vágvölgyi C, and Nagy E, Clin Microbiol Infect **4**, 369 (2006).
59. M. Ruocco, S. Lanzuise, F. Vinale, R. Marra, D. Turrà, S. L. Woo, and M. Lorito, Mol. Plant. Microbe Interact. **22**, 291 (2009).
60. www.slideshare.net/pradnyarani/trichoderma-march-14th, (n.d.).
61. <http://www.fungionline.org.uk/glossary.html#chemo>, (n.d.).
62. <http://www.mold.ph/definition-of-terms.htm>, (n.d.).
63. <http://www.mycology.adelaide.edu.au/virtual/glossary/>, (n.d.).
64. <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/frameGenusOverview.cfm?gen=Trichoderma>, (n.d.).
65. <http://www.yeastgenome.org/go/GO:0001410/overview>, (n.d.).
66. M. Carlile, S. Watkinson, and G. Gooday, *The Fungi*, 2nd Edition (2001).
67. D. T. Klein, Q. Rev. Biol. **52**, 208 (1977).
68. K. N. Vanitha, William, C.F., and D. C. Westoff, in *Food Microbiol.*, 5th ed. (McGraw-Hill Education, 2013).
69. K. H. Domsch, W. Gams, and T.-H. Anderson, *Compendium of Soil Fungi* (Academic England, Eching, 1980).
70. Sivasithamparam, K. and Ghisalberti, E.L., in (1998).

71. B. Seiboth, C. Ivanova, and V. Seidl-Seiboth, in *Biofuel Prod.-Recent Dev. Prospects*, edited by M. A. Dos Santos Bernardes (InTech, 2011).
72. K. Kuhls, E. Lieckfeldt, G. J. Samuels, W. Kovacs, W. Meyer, O. Petrini, W. Gams, T. Börner, and C. P. Kubicek, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 7755 (1996).
73. D. Martinez, R. M. Berka, B. Henrissat, M. Saloheimo, M. Arvas, S. E. Baker, J. Chapman, O. Chertkov, P. M. Coutinho, D. Cullen, E. G. J. Danchin, I. V. Grigoriev, P. Harris, M. Jackson, C. P. Kubicek, C. S. Han, I. Ho, L. F. Larrondo, A. L. de Leon, J. K. Magnuson, S. Merino, M. Misra, B. Nelson, N. Putnam, B. Robbertse, A. A. Salamov, M. Schmoll, A. Terry, N. Thayer, A. Westerholm-Parvinen, C. L. Schoch, J. Yao, R. Barabote, R. Barbote, M. A. Nelson, C. Detter, D. Bruce, C. R. Kuske, G. Xie, P. Richardson, D. S. Rokhsar, S. M. Lucas, E. M. Rubin, N. Dunn-Coleman, M. Ward, and T. S. Brettin, *Nat. Biotechnol.* **26**, 553 (2008).
74. A. M. de Castro, M. C. Ferreira, J. C. da Cruz, K. C. N. R. Pedro, D. F. Carvalho, S. G. F. Leite, and N. Pereira, *Enzyme Res.* **2010**, (2010).
75. P. da S. Delabona, C. S. Farinas, M. R. da Silva, S. F. Azzoni, and J. G. da C. Pradella, *Bioresour. Technol.* **107**, 517 (2012).
76. C. Zachow, C. Berg, H. Müller, R. Meincke, M. Komon-Zelazowska, I. S. Druzhinina, C. P. Kubicek, and G. Berg, *ISME J.* **3**, 79 (2009).
77. Q. Migheli, V. Balmas, M. Komoń-Zelazowska, B. Scherm, S. Fiori, A. G. Kopchinskiy, C. P. Kubicek, and I. S. Druzhinina, *Environ. Microbiol.* **11**, 35 (2009).
78. Hanson JR, *Sci Prog* **88**, 237 (2005).
79. I. S. Druzhinina, C. P. Kubicek, M. Komoń-Zelazowska, T. B. Mulaw, and J. Bissett, **10**, (2010).
80. S. Parsa, A. M. García-Lemos, K. Castillo, V. Ortiz, L. A. B. López-Lavalle, J. Braun, and F. E. Vega, *Fungal Biol.* (n.d.).
81. L. Hoyos-Carvajal, S. Orduz, and J. Bissett, *Fungal Genet. Biol. FG B* **46**, 615 (2009).
82. I. S. Druzhinina, P. Chaverri, P. Fallah, C. P. Kubicek, and G. J. Samuels, *Stud. Mycol.* **50**, 401 (n.d.).
83. C. P. Kubicek, A. Herrera-Estrella, V. Seidl-Seiboth, D. A. Martinez, I. S. Druzhinina, M. Thon, S. Zeilinger, S. Casas-Flores, B. A. Horwitz, P. K. Mukherjee, M. Mukherjee, L. Kredics, L. D. Alcaraz, A. Aerts, Z. Antal, L. Atanasova, M. G.

- Cervantes-Badillo, J. Challacombe, O. Chertkov, K. McCluskey, F. Couplier, N. Deshpande, H. von Döhren, D. J. Ebbole, E. U. Esquivel-Naranjo, E. Fekete, M. Flipphi, F. Glaser, E. Y. Gómez-Rodríguez, S. Gruber, C. Han, B. Henrissat, R. Hermosa, M. Hernández-Oñate, L. Karaffa, I. Kosti, S. Le Crom, E. Lindquist, S. Lucas, M. Lübeck, P. S. Lübeck, A. Margeot, B. Metz, M. Misra, H. Nevalainen, M. Omann, N. Packer, G. Perrone, E. E. Uresti-Rivera, A. Salamov, M. Schmoll, B. Seiboth, H. Shapiro, S. Sukno, J. A. Tamayo-Ramos, D. Tisch, A. Wiest, H. H. Wilkinson, M. Zhang, P. M. Coutinho, C. M. Kenerley, E. Monte, S. E. Baker, and I. V. Grigoriev, *Genome Biol.* **12**, R40 (2011).
84. P. Chaverri, F. Branco-Rocha, W. Jaklitsch, R. Gazis, T. Degenkolb, and G. J. Samuels, *Mycologia* (2015).
85. Irina S. Druzhinina, Alex G. Kopchinskiy, and Christian P. Kubicek, *Mycoscience* **47**, 55 (2006).
86. B. Benolie, F. A. G. Torres, and L. M. P. de Moraes, *SpringerPlus* **2**, 656 (2013).
87. A. M. de Castro, K. C. N. R. Pedro, J. C. da Cruz, M. C. Ferreira, and S. G. F. Leite, *Appl Biochem Biotechnol* 2111 (2010).
88. O. García-Kirchner, M. Segura-Granados, and P. Rodríguez-Pascual, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **121–124**, 347 (2005).
89. U. Hölker, J. Dohse, and M. Höfer, *Folia Microbiol. (Praha)* **47**, 423 (2008).
90. P. S. J. CHEETHAM, *Enzyme Microb Technol* **9**, 194 (1987).
91. S. Omura, *Microbiol. Rev.* **50**, 259 (1986).
92. D. B. Steele and M. D. Stowers, *Annu. Rev. Microbiol.* **45**, 89 (1991).
93. Nave, Neveenkumar K. J., and Thippeswamy B, *NT J CURR SCI* **8**, 125 (2013).
94. Gaupam S.P., Bundela P.S., Pandey A.K., Awasthi M.K., and Sarsaiya S., *J. Appl. Sci. Environ. Sanit.* **4**, 391 (n.d.).
95. S. P. Gautam, P. S. Bundela, A. K. Pandey, Jamaluddin, M. K. Awasthi, S. Sarsaiya, S. P. Gautam, P. S. Bundela, A. K. Pandey, Jamaluddin, M. K. Awasthi, and S. Sarsaiya, *Int. J. Microbiol. Int. J. Microbiol.* **2012, 2012**, e325907 (2012).
96. D. Kosanović, I. Potočnik, B. Duduk, J. Vukojević, E. Rekanović, and S. Marčić Milijašević, *Ann Appl Biol* **163**, 218 (2013).
97. M. Grujić, B. Dojnov, I. Potočnik, B. Duduk, and Z. Vujčić, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **104**, 290 (2015).

98. B. A. Bailey, M. D. Strem, and D. Wood, *Mycol. Res.* **113**, 1365 (2009).
99. Rong Zeng, Xiao-Yan Yin, Tao Ruan, Qiao Hu, Ya-Li Hou, Zhen-Yu Zuo, Hao Huang, and Zhong-Hua Yang, *Bioengineering* **3**, 13 (2016).
100. Gams W, and Bissett J, in (1998).
101. V. Gupta, M. Schmoll, H. Estrella, R. Upadhyay, I. Druzhinina, and M. Tuohy, in *Biotechnol. Biol. Trichoderma*, 1st ed. (Wyman Street, Waltham, USA, 2014).
102. Kredics L, Kocsubé S, Nagy L., Komoń-Zelazowska M, Manczinger L, Sajben E, Nagy A, Vágvölgyi C, Kubicek CP, Druzhinina IS, and Hatvani L, *FEMS Microbiol Lett* **300**, 58 (2009).
103. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2565738/>, (n.d.).
104. Jaklitsch WM, *Stud Mycol* **63**, 1 (2009).
105. Tom Okuda, Akiko Fujiwara, and Mitsuhiko Fujiwara, **46**, 1811 (2014).
106. Samuels J. Gary, Petrini Orlando, and Manguin Sylvie, *Mycologia* **83**, 421 (1994).
107. Hebert, P.D.N. and Beaton, M.J., Helena Lab. Beaumont TX (1993).
108. Neuhof T., Dieckmann R., Druzhinina IS., Kubicek CP., Nakari-Setälä T., Penttilä M., and von Döhren H, *FEBS J* **247**, 841 (2007).
109. Mikus M, Hatvani L, Neuhof T, Komoń-Zelazowska M, Dieckmann R, Schwecke T, Druzhinina IS, von Döhren H, and Kubicek CP., *Appl Env. Microbiol* **75**, 3222 (2009).
110. White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J., in (1990).
111. Druzhinina, I. S., Chaverri, P., Fallah, P., Kubicek, C. P., and Samuels, G. J., *Studies Mycol.* **50**, 401 (2004).
112. Lieckfeldt, E., Kuhls K., and Muthumeenakshi, S., Taylor Francis Lond. **1**, 35 (1998).
113. A. J. Griffiths, J. H. Miller, D. T. Suzuki, R. C. Lewontin, W. M. Gelbart, A. J. Griffiths, J. H. Miller, D. T. Suzuki, R. C. Lewontin, and W. M. Gelbart, *An Introduction to Genetic Analysis*, 7th ed. (W. H. Freeman, 2000).
114. I. S. Druzhinina and A. G. Kopchinskiy, 8th Int. Mycol. Congr. Cairns Aust. 53 (2006).
115. <http://www.isth.info/tools/molkey/>, (n.d.).
116. Mayer RJ, *Appl Env. Microbiol* **57**, 2269 (1991).

117. J. Kindermann, Y. El-Ayouti, G. Samuels, and C. Kubicek, *Fungal Genet. Biol.* **24**, 298 (1998).
118. G. J. Samuels, *Phytopathology* **96**, 195 (2006).
119. S. A. Rehner and G. J. Samuels, *Can. J. Bot.* (2011).
120. S. L. Dodd, E. Lieckfeldt, P. Chaverri, and B. E. Overton, *Mycol. Prog.* **1**, 409 (2002).
121. E. Bellemain, T. Carlsen, C. Brochmann, E. Coissac, P. Taberle, and Håvard Kauserud, *BMC Microbiol.* **10**, (2010).
122. C. L. Schoch, K. A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J. L. Spouge, C. A. Levesque, W. Chen, Fungal Barcoding Consortium, and Fungal Barcoding Consortium Author List, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 6241 (2012).
123. Kořljalg U, Larsson K-H, and Abarenkov K, *New Phytol* **166**, 1063 (2005).
124. Bruns TD and Shefferson RP, *Can J Bot* **82**, 1122 (2004).
125. C. M. Kullnig-Gradinger, G. Szakacs, and C. P. Kubicek, *Mycol. Res.* **106**, 757 (2002).
126. E. Lieckfeldt, C. Kullnig, G. J. Samuels, and C. P. Kubicek, *Mycologia* **92**, 374 (2000).
127. P. Chaverri, L. A. Castlebury, B. E. Overton, and G. J. Samuels, *Mycologia* **95**, 1100 (2003).
128. G. J. Samuels, S. L. Dodd, B.-S. Lu, O. Petrini, H.-J. Schroers, and I. S. Druzhinina, *Stud. Mycol.* **56**, 67 (2006).
129. W. M. Jaklitsch, C. P. Kubicek, and I. S. Druzhinina, *Mycologia* **100**, 796 (2008).
130. W. M. Jaklitsch, G. J. Samuels, S. L. Dodd, B.-S. Lu, and I. S. Druzhinina, *Stud. Mycol.* **56**, 135 (2006).
131. W. M. Jaklitsch, *Fungal Divers.* **48**, 1 (2011).
132. P. Chaverri, L. A. Castlebury, G. J. Samuels, and D. M. Geiser, *Mol. Phylogenet. Evol.* **27**, 302 (2003).
133. David M. Hillis, Craig Moritz, and Barbara K. Mable, *Molecular Systematics*, Second Edition (Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts U.S.A., n.d.).
134. P. Lemey, M. Salemi, and A.-M. Vandamme, *The Phylogenetic Handbook*, 2 nd Edition (2009).

135. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/NAWBIS/Modules/Phylogenetics/phylo7.html>, (n.d.).
136. D. Grauer and W.-H. Li, *Fundamentals of Molecular Evolution*, second (2000).
137. J. D. Thompson, D. G. Higgins, and T. J. Gibson, *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673 (1994).
138. R. C. Edgar, R. M. Drive, and M. Valley, *Nucleic Acids Res.* **32**, 1792 (2004).
139. K. Katoh, K. Kuma, H. Toh, and T. Miyata, *Nucleic Acids Res.* **33**, 511 (2005).
140. C. Notredame, D. G. Higgins, and J. Heringa, *J. Mol. Biol.* **302**, 205 (2000).
141. S. Kumar, K. Tamura, and M. Nei, *Comput. Appl. Biosci. CABIOS* **10**, 189 (1994).
142. M. Gouy, S. Guindon, and O. Gascuel, *Mol Biol Evol* **27**, 221 (2010).
143. D. M. R. Page, *Cabios Appl. Note* **12**, (1996).
144. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, (n.d.).
145. R. D. M. Page, *Curr. Protoc. Bioinforma. Ed. Board Andreas Baxevanis Al Chapter 6, Unit 6.2* (2002).
146. J. D. Retief, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **132**, 243 (2000).
147. J. P. Huelsenbeck and F. Ronquist, *Bioinforma. Oxf. Engl.* **17**, 754 (2001).
148. F. Ronquist, M. Teslenko, P. van der Mark, D. L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard, and J. P. Huelsenbeck, **61**, 539 (2012).
149. C. Florencio, S. Couri, and C. S. Farinas, *Hindawi Publ. Corp. Enzyme Res.* **2012**, 7 (2012).
150. R. M. Teater and P. J. Wood, *Appl. Environ. Microbiol.* **3**, 777 (1982).
151. S. Vaithyanathan, A. Misra, R. Prasad, T. MK, A. Misra, O. Chaturvedi, and R. Jakhmola, *Indian J. Biotechnol.* **4**, 144 (2004).
152. S. O. C. Brigitte and F. C. J. Aloisio, *Afr. J. Biotechnol.* **13**, 4694 (2014).
153. Y.-H. P. Zhang, M. E. Himmel, and Mielenz Jonathan R., *Biotechnol. Adv.* **24**, 452 (2006).
154. G. Banerjee, S. Car, J. S. Scott-Craig, M. S. Borrusch, N. Aslam, and J. D. Walton, *Biotechnol. Bioeng.* **106**, 707 (2010).
155. Y.-H. P. Zhang and L. R. Lynd, *Biotechnol. Bioeng.* **94**, 888 (2006).
156. E. C. Webb, xiii + 863 pp. (1992).
157. <http://www.cazy.org/>, (n.d.).

158. B. L. Cantarel, P. M. Coutinho, C. Rancurel, T. Bernard, V. Lombard, and B. Henrissat, *Nucleic Acids Res.* **37**, D233 (2009).
159. R. Cohen, M. R. Suzuki, and K. E. Hammel, *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 2412 (2005).
160. T. Mejia-Castillo, M. E. Hidalgo-Lara, L. G. Briebe, and J. Ortega-Lopez, *Biotechnol. Lett.* **30**, 681 (2008).
161. G. Parsieglá, C. Reverbel, C. Tardif, H. Driguez, and R. Haser, *J. Mol. Biol.* **375**, 499 (2008).
162. J.-J. Yoon, C.-J. Cha, Y.-S. Kim, and W. Kim, *Biotechnol. Lett.* **30**, 1373 (2008).
163. <http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.4>, (n.d.).
164. C. M. Payne, B. C. Knott, H. B. Mayes, H. Hansson, M. E. Himmel, M. Sandgren, J. Ståhlberg, and G. T. Beckham, *Am. Chem. Soc.* **115**, 1308–1448 (2015).
165. (n.d.).
166. X.-Z. Zhang and Y.-H. P. Zhang, in *Bioprocess. Technol. Biorefinery Sustain. Prod. Fuels Chem. Polym.*, edited by S.-T. Yang, H. A. El-Enshasy, and N. Thongchul (John Wiley & Sons, Inc., 2013), pp. 131–146.
167. <http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.91#SYNONYMS>, (n.d.).
168. A. Koivula, L. Ruohonen, G. Wohlfahrt, T. Reinikainen, T. T. Teeri, K. Piens, M. Claeysens, M. Weber, A. Vasella, D. Becker, M. L. Sinnott, J.-Y. Zou, G. J. Kleywegt, M. Szardenings, J. Ståhlberg, and T. A. Jones, *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 10015 (2002).
169. D. J. Vocadlo and G. J. Davies, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12**, 539 (2008).
170. (n.d.).
171. M. Nummi, M. L. Niku-Paavola, A. Lappalainen, T. M. Enari, and V. Raunio, *Biochem. J.* **215**, 677 (1983).
172. (n.d.).
173. (n.d.).
174. O. García-Kirchner, M. Segura-Granados, and P. Rodríguez-Pascual, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **121–124**, 347 (2005).
175. T. Juhász, A. Egyházi, and K. Réczey, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **121–124**, 243 (2005).
176. <http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.21#SYNONYMS>, (n.d.).

177. Y.-H. P. Zhang, M. E. Himmel, and J. R. Mielenz, *Biotechnol. Adv.* **24**, 452 (2006).
178. D. Kumar and G. S. Murthy, *Biotechnol. Biofuels* 2013 **6**, (2013).
179. M. Saloheimo, M. Paloheimo, S. Hakola, J. Pere, B. Swanson, E. Nyyssönen, A. Bhatia, M. Ward, and M. Penttilä, *Eur. J. Biochem. FEBS* **269**, 4202 (2002).
180. X.-L. Li, S. Spániková, R. P. de Vries, and P. Biely, *FEBS Lett.* **581**, 4029 (2007).
181. M. Dashtban, M. Maki, K. T. Leung, C. Mao, and W. Qin, *Crit. Rev. Biotechnol.* **30**, 302 (2010).
182. Gang Hu, John A. Heitmann, Jr, and Orlando J. Rojas, *Anal Chem* 1872 (2009).
183. T. K. Ghose, *Pure Appl. Chem.* **59**, (1987).
184. Y.-H. P. Zhang and L. R. Lynd, *Biomacromolecules* **6**, 1510 (2005).
185. M. G. Tuohy, D. J. Walsh, P. G. Murray, M. Claeysens, M. M. Cuffe, A. V. Savage, and M. P. Coughlan, *Biochim. Biophys. Acta* **1596**, 366 (2002).
186. V. V. Zverlov, G. A. Velikodvorskaya, and W. H. Schwarz, *Microbiol. Read. Engl.* **148**, 247 (2002).
187. J. J. Child, D. E. Eveleigh, and A. S. Sieben, *Can. J. Biochem.* **51**, 39 (1973).
188. G. L. Miller, *Anal. Chem.* **31**, 426 (1959).
189. K. Fleming, D. G. Gray, and S. Matthews, *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* **7**, 1831 (2001).
190. Y.-H. P. Zhang and L. R. Lynd, *Biotechnol. Bioeng.* **88**, 797 (2004).
191. THOMAS M. WOOD and K. MAHALINGESHWARA BHAT, (n.d.).
192. Ghose, T.K., *Pure Appl Chem* **59**, 257 (1987).
193. V. Deshpande, K.-E. Eriksson, and B. Pettersson, *Eur J Biochem* 191 ~ 198 (1978).
194. P.-E. Courty, K. Pritsch, M. Schloter, A. Hartmann, and J. Garbaye, *New Phytol.* **167**, 309 (2005).
195. Strobel, H. J. and Russel, J. B., *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2505 (1987).
196. B. Setlow, A. Cabrera-Hernandez, R. M. Cabrera-Martinez, and P. Setlow, *Arch. Microbiol.* **181**, 60 (2004).
197. J. K. McCarthy, A. Uzelac, D. F. Davis, and D. E. Eveleigh, *J. Biol. Chem.* **279**, 11495 (2004).

198. G. Coward-Kelly, C. Aiello-Mazzari, S. Kim, C. Granda, and M. Holtzapple, *Biotechnol. Bioeng.* **82**, 745 (2003).
199. C. Breuil, P. Mayers, and J. N. Saddler, *Biotechnol. Bioeng.* **28**, 1653 (1986).
200. Z. Xiao, R. Storms, and A. Tsang, *Biotechnol. Bioeng.* **88**, 832 (2004).
201. T. S. Nordmark, A. Bakalinsky, and M. H. Penner, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **137–140**, 131 (2007).
202. M. Mandels, R. Andreotti, and C. Roche, *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 21 (1976).
203. T. K. Ghose, *Pure Appl Chem Vol 59 No 2 Pp 257—268 1987* **59**, 257 (1987).
204. J. Gross and C. M. Lapiere, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **48**, 1014 (1962).
205. A. Granelli-Piperno and E. Reich, *J. Exp. Med.* **148**, 223 (1978).
206. M. S. Hibbs, K. A. Hasty, J. M. Seyer, A. H. Kang, and C. L. Mainardi, *J. Biol. Chem.* **260**, 2493 (1985).
207. L. Paemen, E. Martens, K. Norga, S. Masure, E. Roets, J. Hoogmartens, and G. Opdenakker, *Biochem. Pharmacol.* **52**, 105 (1996).
208. S. Masure, A. Billiau, J. Van Damme, and G. Opdenakker, *Biochim. Biophys. Acta* **1054**, 317 (1990).
209. R. Rossano, M. Larocca, and P. Riccio, *J. Plant Physiol.* **168**, 1517 (2011).
210. V. Thimon, M. Belghazi, V. Labas, J.-L. Dacheux, and J.-L. Gatti, *Anal. Biochem.* **375**, 382 (2008).
211. J. Vandooren, N. Geurts, E. Martens, P. E. Van den Steen, and G. Opdenakker, *Nat. Methods* **10**, 211 (2013).
212. V. K. Nathan, M. Esther Rani, G. Rathinasamy, K. N. Dhiraviam, and S. Jayavel, *SpringerPlus* **3**, (2014).
213. J. Zhou, Y.-H. Wang, J. Chu, Y.-P. Zhuang, S.-L. Zhang, and P. Yin, *Bioresour. Technol.* **99**, 6826 (2008).
214. J. Williams, J. M. Clarkson, P. R. Mills, and R. M. Cooper, *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 4192 (2003).
215. A. K. Badhan, B. S. Chadha, J. Kaur, H. S. Saini, and M. K. Bhat, *Bioresour. Technol.* **98**, 504 (2007).
216. M. P. Coughlan, in edited by B.-M. in *Enzymology* (Academic Press, 1988), pp. 135–144.
217. J. F. Rissler, *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 315 (1983).

218. K.-S. Kwon, J. Lee, H. G. Kang, and Y. C. Hah, *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 4584 (1994).
219. H. van Tilbeurgh and M. Claeysens, **187**, (1985).
220. N.-S. Choi, J. H. Choi, B.-H. Kim, Y.-J. Han, J. S. Kim, S.-G. Lee, and J. J. Song, *Electrophoresis* **30**, 2234 (2009).
221. R. M. Parker and N. M. Barnes, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **106**, 247 (1999).
222. T. B. Morrison, J. J. Weis, and C. T. Wittwer, *BioTechniques* **24**, 954 (1998).
223. P. Bucher, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 400 (1999).
224. S. A. Bustin, *J. Mol. Endocrinol.* **25**, 169 (2000).
225.
http://qcbs.ca/wiki/_media/stratagene_introduction_to_quantitative_pcr_methods_and_a_pplication_guide.pdf, (n.d.).
226. <http://dyes.gene-quantification.info/>, (n.d.).
227. H. Zipper, H. Brunner, J. Bernhagen, and F. Vitzthum, *Nucleic Acids Res.* **32**, e103 (2004).
228. M. Bengtsson, H. J. Karlsson, G. Westman, and M. Kubista, *Nucleic Acids Res.* **31**, e45 (2003).
229. (n.d.).
230.
http://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_eco_absolutequant_sybr_green.pdf, (n.d.).
231. <http://rest.gene-quantification.info/>, (n.d.).
232. <http://www.gene-quantification.de/hellemans-qbase-2007.pdf>, (n.d.).
233. <http://people.tamu.edu/~syuan/sars/>, (n.d.).
234. <http://icbi.at/software/qpcr/qpcr.shtml>, (n.d.).
235. S. Pabinger, S. Rödiger, A. Kriegner, K. Vierlinger, and A. Weinhäusel, *Biomol. Detect. Quantif.* **1**, 23 (2014).
236. K. J. Livak and T. D. Schmittgen, *Methods San Diego Calif* **25**, 402 (2001).
237. P.Saranraj, D. Stella, and D. Reetha, (n.d.).
238. P.F.H. Harmsen, W.J.J. Huijgen, L.M. Bermúdez López, and R.R.C. Bakker, *ECN-E--10-013* (2010).
239. Ó. J. Sánchez and C. A. Cardona, *Bioresour. Technol.* **99**, 5270 (2008).

240. Y. Zheng, Z. Pan, and R. Zhang, *Int. J. Agric. Biol. Eng.* **2**, 51 (2009).
241. <http://glossary.periodni.com/glossary.php?en=cellulose>, (n.d.).
242. Zhang YZ, Liu J, and Gao P, *Acta Biophys Sin* **13**, 375 (1997).
243. <http://www.joostdevree.nl/shtmls/cellulose.shtml>,
Http://www.joostdevree.nl/shtmls/cellulose.shtml (n.d.).
244. Xu F, Sun RC, and Zhan HY, *Trans Chin Pul Pap* **18**, 145 (2003).
245. Yin ZF and Fan RW, *Bull Bot Res* **19**, 407 (1999).
246. H. V. Lee, S. B. A. Hamid, and S. K. Zain, *Sci. World J.* **2014**, e631013 (2014).
247. Gao J, and Tang LG., Beijing Sci. Press (1996).
248. Michael E. Himmel, Shi-You Ding, David K. Johnson, William S. Adney, Mark R. Nimlos, John W. Brady, and Thomas D. Foust, *Science* **315**, 804 (2007).
249. G. Hu, J. A. Heitmann, and O. J. Rojas, *BioResources* **3**, 270 (2008).
250. T. Searchinger, R. Heimlich, R. A. Houghton, F. Dong, A. Elobeid, J. Fabiosa, S. Tokgoz, D. Hayes, and T.-H. Yu, *Science* **319**, 1238 (2008).
251. Robert D. Perlack, Lynn L. Wright, Anthony F. Turhollow, Robin L. Graham, Bryce J. Stokes, and Donald C. Erbach, (2005).
252. Atwell, W.A., 2001, *Cereal Foods World* **46**, (2001).
253. J. D. Kerstetter and J. K. Lyons, (2001).
254. S. Kim and B. E. Dale, *Biomass Bioenergy* **26**, 361 (2004).
255. S. Prasad, A. Singh, and H. C. Joshi, *Resour. Conserv. Recycl.* **50**, 1 (2007).
256. Muhammad Yasin, Abdul Waheed Bhutto, Aqeel Ahmed Bazmi, and Sadia Karim, *Int. J. Chem. Environ. Eng.* **1**, (2010).
257. J. Lee, *J. Biotechnol.* **56**, 1 (1997).
258. K. C. Lee, M. Bulls, J. Holmes, and J. W. Barrier, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **66**, 1 (1997).
259. H. Jørgensen, J. B. Kristensen, and C. Felby, *Biofuels Bioprod. Biorefining* **1**, 119 (2007).
260. H. A. Ruiz, R. M. Rodríguez-Jasso, R. Rodríguez, J. C. Contreras-Esquivel, and C. N. Aguilar, *Biochem. Eng. J.* **65**, 90 (2012).
261. A. Singh, S. Tuteja, N. Singh, and N. R. Bishnoi, *Bioresour. Technol.* **102**, 1773 (2011).
262. D. S. Chahal, *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 205 (1985).

263. Galbe, M. and Zacchi, G., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**, 618 (2002).
264. Rabinovich, M.L., Melnik, M.S., and Boloboba, A.V., *Appl. Biochem. Microbiol.* **305**, 308 (2002).
265. <http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2013/gc/c2gc36364j>, (n.d.).
266. S. Mani, L. G. Tabil, and S. Sokhansanj, *Biomass Bioenergy* **27**, 339 (2004).
267. N. Mosier, R. Hendrickson, N. Ho, M. Sedlak, and M. R. Ladisch, *Bioresour. Technol.* **96**, 1986 (2005).
268. F. Alfani, A. Gallifuoco, A. Saporosi, A. Spera, and M. Cantarella, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 184 (2000).
269. Zia-ullah Khokhar, Q. Syed, M. Nadeem, M. Irfan, Jing Wu, Z.Q. Samra, I. Gul, and M. Amin Atha, *World Appl. Sci. J.* **30**, 1095 (2014).
270. B. Sharma, R. Agrawal, R. R. Singhania, A. Satlewal, A. Mathur, D. Tuli, and M. Adsul, *Bioresour. Technol.* **196**, 518 (2015).
271. R. Manfredini, V. Cavallera, L. Marini, and G. Donati, *Biotechnol. Bioeng.* **25**, 3115 (1983).
272. Yokotosuka T, Pergamon Press 395 (1985).
273. J. E. Bailey, *Biotechnol. Prog.* **14**, 8 (1998).
274. Perekh S, in (*Academic Press, San Diego, 1999*), pp. 6170–6197.
275. Vinci V and Byng G, in *Strain Improv. Non-Recomb. Methods* (*Am Soc Microbiol, Washington, DC, 1998*), pp. 103–113.
276. P. K. Foreman, D. Brown, L. Dankmeyer, R. Dean, S. Diener, N. S. Dunn-Coleman, F. Goedegebuur, T. D. Houfek, G. J. England, A. S. Kelley, H. J. Meerman, T. Mitchell, C. Mitchinson, H. A. Olivares, P. J. M. Teunissen, J. Yao, and M. Ward, *J. Biol. Chem.* **278**, 31988 (2003).
277. A. R. Mach-Aigner, M. E. Pucher, M. G. Steiger, G. E. Bauer, S. J. Preis, and R. L. Mach, *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 6554 (2008).
278. A. Saloheimo, N. Aro, M. Ilmén, and M. Penttilä, *J. Biol. Chem.* **275**, 5817 (2000).
279. S. Zeilinger, A. Ebner, T. Marosits, R. Mach, and C. P. Kubicek, *Mol. Genet. Genomics MGG* **266**, 56 (2001).
280. N. Aro, A. Saloheimo, M. Ilmén, and M. Penttilä, *J. Biol. Chem.* **276**, 24309 (2001).

281. N. Aro, M. Ilmén, A. Saloheimo, and M. Penttilä, *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 56 (2003).
282. A. R. Stricker, K. Grosstessner-Hain, E. Würleitner, and R. L. Mach, *Eukaryot. Cell* **5**, 2128 (2006).
283. A. R. Stricker, R. L. Mach, and L. H. de Graaff, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **78**, 211 (2008).
284. R. Mantovani, *Nucleic Acids Res.* **26**, 1135 (1998).
285. M. Häkkinen, M. J. Valkonen, A. Westerholm-Parvinen, N. Aro, M. Arvas, M. Vitikainen, M. Penttilä, M. Saloheimo, and T. M. Pakula, *Biotechnol. Biofuels* **7**, 14 (2014).
286. N. Aro, M. Ilmén, A. Saloheimo, and M. Penttilä, *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 56 (2003).
287. J. Strauss, H. K. Horvath, B. M. Abdallah, J. Kindermann, R. L. Mach, and C. P. Kubicek, *Mol. Microbiol.* **32**, 169 (1999).
288. J. Sun and N. L. Glass, *PloS One* **6**, e25654 (2011).
289. M. Ilmén, C. Thrane, and M. Penttilä, *Mol. Gen. Genet. MGG* **251**, 451 (1996).
290. R. L. Mach, J. Strauss, S. Zeilinger, M. Schindler, and C. P. Kubicek, *Mol. Microbiol.* **21**, 1273 (1996).
291. E. Fekete, L. Karaffa, R. Karimi Aghcheh, Z. Németh, É. Fekete, A. Orosz, M. Pahlócsek, A. Stágel, and C. P. Kubicek, *BMC Genomics* **15**, 447 (2014).
292. R. Karimi-Aghcheh, J. W. Bok, P. A. Phatale, K. M. Smith, S. E. Baker, A. Lichius, M. Omann, S. Zeilinger, B. Seiboth, C. Rhee, N. P. Keller, M. Freitag, and C. P. Kubicek, *G3 Bethesda Md* **3**, 369 (2013).
293. B. Seiboth, R. A. Karimi, P. A. Phatale, R. Linke, L. Hartl, D. G. Sauer, K. M. Smith, S. E. Baker, M. Freitag, and C. P. Kubicek, *Mol. Microbiol.* **84**, 1150 (2012).
294. B. Seiboth, S. Hakola, R. L. Mach, P. L. Suominen, and C. P. Kubicek, *J. Bacteriol.* **179**, 5318 (1997).
295. J. C. Carle-Urioste, J. Escobar-Vera, S. El-Gogary, F. Henrique-Silva, E. Torigoi, O. Crivellaro, A. Herrera-Estrella, and H. El-Dorry, *J. Biol. Chem.* **272**, 10169 (1997).
296. N. Kato, Y. Murakoshi, M. Kato, T. Kobayashi, and N. Tsukagoshi, *Curr. Genet.* **42**, 43 (2002).
297. N. Bansal, R. Tewari, R. Soni, and S.K.Soni, *Waste Manag* **32**, 1341 (2012).

298. J. P. Day and R. C. Shattock, *Eur. J. Plant Pathol.* **379** (1997).
299. <http://www.ipm.iastate.edu/ipm/icm/2007/2-12/diseases.html>, (n.d.).
300. Sinden JW. and Hauser E, *Mushroom Sci* **2**, 123 (1953).
301. Hatvani L, Antal Z., Manczinger L., Szekeres A., Druzhinina IS., Kubicek CP., Nagy A., Nagy E., Vogvolgyi C., and Kredics L., *Phytopathology* **97**, 532 (2007).
302. <http://www.isth.info/>, (n.d.).
303. A. Blandino, K. Dravillas, D. Cantero, S. S. Pandiella, and C. Webb, *Process Biochem.* **37**, 497 (2001).
304. P. Bernfeld, in *Methods Enzymol.* (1955), pp. 149–158.
305. M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **72**, 248 (1976).
306. A. Das, T. Paul, S. K. Halder, C. Maity, P. K. D. Mohapatra, B. R. Pati, and K. C. Mondal, *Pol. J. Microbiol.* **62**, 31 (2012).
307. C.-P. Artur, L. Almeida, and D. Bishop, *Text. Res J* 287 (1996).
308. F. C. Dominguesa, J. A. Queiroza, and J. M. S. Cabralb, *Enzyme Microb. Technol.* **26**, 394 (2000).
309. K. Chandel, S. Jandaik, V. Kumari, S. Sarswati, A. Sharma, D. Kumar, and N. Kumar, *Int. J. Curr. Res.* **5**, 222 (2013).
310. A. M. Coffman, Q. Li, and L.-K. Ju, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **91**, 1331 (2014).
311. Sunita Mukhopadhyay, B, and Nandi, *J. Sci. Ind. Res.* **58**, 107 (1999).
312. L. Luo, E. van der Voet, and G. Huppes, *Bioresour. Technol.* **101**, 5023 (2010).
313. V. Balan, *Int. Sch. Res. Not. Int. Sch. Res. Not.* **2014**, **2014**, e463074 (2014).
314. <http://scholarsresearchlibrary.com/JMB-vol3-iss5/JMB-2013-3-5-63-78.pdf>, (n.d.).
315. C. P. Kubicek, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1981).
316. Kubicek CP., in *Fungi Lignocellul. Biomass*, First Edition (John Wiley & Sons, Inc, 2013), pp. 30–39.
317. J. BUSWELL, *Proc. 8th Int. Conf. Mushroom Biol. Mushroom Prod. ICMBMP8* (2014).
318. B. Dojnov and Z. Vujčić, *Anal. Biochem.* **421**, 802 (2012).
319. H. T. S. Boschker and T. E. Cappenberg, *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3592 (1994).
320. A. K. Kumar and B. S. Parikh, *Bioresour. Bioprocess.* **2**, (2015).
321. H. Liao, S. Li, Z. Wei, Q. Shen, and Y. Xu, *Biotechnol. Biofuels* **7**, (2014).

322. T. Pirzadah, S. Garg, J. Singh, A. Vyas, M. Kumar, N. Gaur, M. Bala, R. Rehman, A. Varma, V. Kumar, and M. Kumar, SpringerPlus **3**, (2014).
323. D. Liu, J. Li, S. Zhao, R. Zhang, M. Wang, Y. Miao, Y. Shen, and Q. Shen, Biotechnol. Biofuels **6**, 149 (2013).
324. R. Zhang, X. Li, and J. G. Fadel, Bioresour. Technol. **82**, 277 (2002).
325. M. A. T. Hansen, J. B. Kristensen, C. Felby, and H. Jørgensen, Bioresour. Technol. **102**, 2804 (2011).
326. A. Nazir, R. Soni, H. S. Saini, A. Kaur, and B. S. Chadha, Appl. Biochem. Biotechnol. **162**, 538 (2010).
327. R. R. Singhanian, R. K. Sukumaran, K. P. Rajasree, A. Mathew, L. Gottumukkala, and A. Pandey, Process Biochem. **46**, 1521 (2011).
328. M. G. Adsul, J. E. Ghule, R. Singh, H. Shaikh, K. B. Bastawde, D. V. Gokhale, and A. J. Varma, Carbohydr. Polym. **57**, 67 (2004).
329. <http://www.uvm.edu/~cgep/Education/Mutations.html>, (n.d.).
330. M. W. Pfaffl, Nucleic Acids Res. **29**, e45 (2001).
331. D. L. Rabosky, M. Grudler, C. Anderson, P. Title, J. J. Shi, J. W. Brown, H. Huang, and J. Larson, Methods Ecol. Evol. **5**, (2014).
332. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, (n.d.).

Prilog 1.

Sekvence PCR produkata dobijenih amplifikacijom *tef1* i ITS1/4 gena

1. ITS1/4 sekvenca

>UB483FTH2

AGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGA
TCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCCGGAGGACCAACCAAAAACCTTTTTT
TATACCCCTCGCGGGTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAAT
CAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA
TGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGG
GCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTG
CCTCTTTTGGCGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTG
TGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGGTCCACAGCCGTTAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTC
GGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAA

>UB483FT15 (T55) *Trichoderma* sp. Grupa 3

AGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGA
TCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCCGGAGGACCAACCAAAAACCTTTTTT
TATACCCCTCGCGGGTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATGAAT
CAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAA
TGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGG
GCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTG
CCTCTTTTGGCGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTG
CACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGGTCCACAGCCGTTAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCG
ATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAA

>UB483FTH1 (T10) *Trichoderma harzianum*

AGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGA
TCTCTGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCCGGAGGACCAACCTAAAACCTTTATT
GTATACCCCTCGCGGGTTTTTATAATCTGAGCCTTCTCGGCGCCTCTCGTAGGCGTTTCGAAAATG
AATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAG
TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGG
CGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCC
CTCCCTTAGCGGGTGGCCGTCTCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTT
TGCACACTCGCATCGGGAGCGCGGCGGTCCACAGCCGTTAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTC
GGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAA

>UB483FTK1 (TK1) *Trichoderma koningii*

CCATACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGGTACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCC
CCGGAGGGACCAACCAAACTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAA
ATTCAAAATGAATCAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA
ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCC
AGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTG
GGGATCGGGAACCCCTAAGACGGGATCCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCC
TGCGCAGTAGTTTGCACAACCTCGCACCGGGAGCGCGGCGGTCCACGTCCGTAACACCCAACCTTCTG
AAATGTGACCTCGGAT

>UB43FTA1 (TA1) *Trichoderma atroviride*

AGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACCATACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGG
TCACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGACCAAGGCGCCCGCCGGAGGACCAACCAAACTTTTTTCT
GTAGTCCCCCTCGCGGACGTTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGAATCAAAACCTTCAAC
AACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA
ATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCG
AGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGACCTCGGGAGCCCCCTAAGACGG
GATCCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACAACCTCG
ACCGGGAGCGCGGCGGTCCACGTCCGTAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTA
GGAATACCCGCTGAACTTAA

>UB483FTA2 (T42) *Trichoderma atroviride*

GGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCAATGTGAACCATACCAAACCTGTTGCCTCGGGGGGT
CACGCCCCGGGTGCGTTCGACGCCCCGGAACCAGGCGCCCGGAGGGACCAACCAAACCTCTTTTCTG
TAGTCCCTTCGCGGACGTTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATTCAAAATGAATCAAAACTTTCAACA
ACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAA
TTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGA
GCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGACCTCGGGAGCCCCTAAGACGGG
ATCCCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGACGCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACAACCTCGCA
CCGGGAGCGCGGCGGTCCACGTCCGTAAAACACCAACT

2. *tef1* sekvenca

>UB483FTH2 *Trichoderma guizhouense*

CTCGATTCTTCTTTCTATTCAATTGTGCCCGACAATTCAGAGAATTTTCGTGTGCGACAATTTTCATCAC
CCCGCTTTCCATTACCCCTCCTTTGCAGCGACGCAAAATTTTTTTGCTGCCGTTTGGAGTTTTAGTGGGGT
CTCTGTGCAACCCCACTAGCTCACTGCTTTTTTTGTGCTTACACTCACTTCCAAGTCATCATTCAACGT
GCTCTGTGTCTTTGGTCATTCAACGATGCTAACCACTTTTCCATCAATAGGAAGCCGCCGAACCTCGCA
AGGGTTCCTTCAAGTACGCTTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCG
ACATTGCTCTGTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTCTACTTCATCAAC
TTCATGCTGCAATTGCAACCCAGTGTCTAACAGGCAATTCACAGACGCTCCCGGCCACCGTGATTTTCATC
AAGAACATGATCACTGGTACTTCCCAGGCCGATTGCGCTATCCTCATCATGCGCGGTAAGTGGTGAG
TTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGCCAGACCCGTGAGCACGCTCTGCTCGCCTACACCCTGGGTGTC
AAGCAGCTCATCGTTGCCATCAACAAGATGGACTGCCAACCTGGGCCGAGGCTCGTTACCAGGAAAT
CATCAAGGAGACCTCCAACCTTCATCAAGAAGGTGGCTTCAACCCCAAGGCTGTTGCTTTTCGTCAT
CTCCGGTTTCAACGGTGACAACATGCTCCAGCCCTCCACCAACTGCCCTGGTACAAGGGCTGGGAGAA
GGAGACCAAAGCTGGCAAGTTCACCGGCAAGACCCTCCTTGAGGCCATCGACTCCATCGAGCCCCCA
AGCGTCCACGGACAAGCCCCTCCGTCTTCCCCTCCAGGATG

>UB483FTH8 *Trichoderma simonsii*

TCCCTCCACATTTCAATTGTGTCCGACAATTCAGAGAATTTTCGTGTCAACAATTTTTCATCACCCCG
CTTTCGATTACCCCTCCTTTGCAGCGACGCAAAATTTTTTTGCTGTGCGTTTGGTTTTAAGTGGGGTTTCTT
GTGCACCCCACTAGCTCGTTTTTTCTGCTTCTCACTTCCCAGCCATCATTCAACGTATTCTGTGTCT
CGTCACTTTTCAGCGATGCTAACCACTTTTCCATCAATAGGAAGCCGCCGAACCTCGGCAAGGGTTCCTTC
AAGTACGCTTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCTCTG
TGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTCTTTCCATCAATTTACACAGCG
ATTACAAGCCAGTGCTAACAAGCAATTCACAGACGCTCCCGGCCACCGTGATTTTCATCAAGAACATGAT
CACTGGTACTTCCCAGGCCGATTGCGCTATCCTCATCATTGCCGCCGTAAGTGGTGAAGCAGCTCAT
TATCTCCAAGGATGGCCAGACCCGTGAGCAGCTCTGCTCGCCTACACCCTGGGTGTAAGCAGCTCAT
CGTTGCCATCAACAAGATGGACTGCCAACCTGGGCCGAGGCTCGTTACCAGGAAATCATCAAGGAGA
CTTCCAACCTTCATCAAGAAGGTGGCTTCAACCCCAAGGCTGTTGCTTTTCGTCATCTCCGGTTTCAA
CGGTGACAACATGCTCCAGCCCTCCACCAACTGCCCTGGTACAAGGGCTGGGAGAAGGAGACCAAGG
CTGGCAAGTTCACCGGCAAGACCCTCCTTGAGGCTATCGACTCCATCGAGCCCCCAAGCGTCCACGG
ACAAGCCCCTCCGTCTTCCCCTCCAGATGT

>UB483FTL2 *Trichoderma simonsii*

ATTGGTATGTTCTTTTCATCAATTTACACAGCGATTACAAGCCAGTGCTAACAAGCAATTCACAGACG
CTCCCGGCCACCGTGATTTTCATCAAGAACATGATCACTGGTACTTCCCAGGCCGATTGCGCTATCCTCAT
CATTGCCGCCGGTACTGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGCCAGACCCGTGAGCAGCTCT
GCTCGCTACACCCTGGGTGTAAGCAGCTCATCGTTGCCATCAACAAGATGGACTGCCAACCTGGG
CGAGGCTCGTTACCAGGAAATCATCAAGGAGACTTCCAACCTTCATCAAGAAGGTGGCTTCAACCCCA
AGGCTGTTGCTTTTCGTCATCTCCGGTTTCAACGGTGACAACATGCTCCAGCCCTCCACCAACTGCC
CTGGTACAAGGGCTGGGAGAAGGAGACCAAGGCTG

>UB483FTH5 *Trichoderma guizhouense*

ACTCGGCAAGGGTTTCCTTCAAGTACGCTTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGTTAT
CACCATCGACATTGCTCTGTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTCTACT
TCATCAACTTCATGCTGCAATTGCAACCCAGTGCTAACAGGCAATTCACAGACGCTCCCGGCCACCGTG
ATTTTCATCAAGAACATGATCACTGGTACTTCCCAGGCCGATTGCGCTATCCTCATCATTGCCGCCGGTAC
TGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGCCAGACCCGTGAGCACGCTCTGCTCGCCTACACCT
GGGTGTCAAGCAGCTCATCGTTGCCATCAACAAGATGGACTGCAACTGGGCCGAGGCTCGTTACC
AGGAAATCATCAAGGAGACCTCCAACCTTCATCAAGAAGGTTCGGCTTCAACCCCAAGGCTGTTGCTTTCG
TCCCCATCTCCGGTTTCAACGGTGACAACATGCTCCAGCCCTCCACCAACTGCCCTGGTACAAGGGCT
GGGAGAAGGAGACCAAGGCTGGCAAGTTCACCGGCAAGACCCCTCCTTGAGGCCATCGACTCCATCGAG
CCCCCAAGCGTCCCACGGACAAGCCCCTCCGTCTTCCCCTCCAGGATGTCTACAAGATCGGTGGTATT
GGAACAGTTCCTCGTCCGCGTATCGAGACTGGTATCCTCAAGCCCGGTATGGTTGTCACCTTCGCTCCC
TCCAACGTCAACACTGAAGTCAAGTCCGTGAGATGCACCACGAGCAGCTCGTCGAGGGTGTCCCGGT
GACAACGTTGGTTT

> UB483FTH7 *Trichoderma orientale*

CGCAAAAATTTTTGGTTGCGTTTCGGGTTTTAGTGGGGTGCACACCTGCACCAACCCACTACCTGCTGG
CCGACCTCTGTTCTGGTCTCCCATCACATTTGCACACGCGTCATCACTCAGCAATCTGTGCAGCAATGCT
AATCATTTTTCCCCTCAACAGGAAGCCGCCGAACCTCGCAAGGGTTCCCTCAAGTACGCGTGGGTTCTTG
ACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTTGGAAGTTCGAGACTCCCA
AGTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTTGATCCATCGCACTGCATCATTGCCCACAACAACATGCTAAT
GTCTCTCACAGACGCTCCCGGCCACCGTGATTTTCATCAAGAACATGATCACTGGTACTTCCCAGGCCG
ACTGCGCTATCTCATCATTGCCGCCGGTACTGGTGAGTTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGCCAGA
CCCGTGAGCACGCTCTGCTCGCCTACACCCTGGGTGTCAAGCAGCTCATCGTCGCCATCA

>UB483FTL3 *Trichoderma citrinoviride*

ACCCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTAAGCTTCAAATCCTTCAGTTTCGAGCCCATTTCCGCCTCATGCC
TCTGTGCCAATATTTGTCGTGCAACGGATGCCCCGTTTCGACAGGGACTTGCCCATCACCCCGCTTTCCC
TTACCCCTCCTTTGAGCGACGCAAATTTTTTTGCTGCTTCATCAATTTAGTGGGGGTGCATCTCGAGC
AACCCCGTACTGCCTTCAGACCACTATTTCTTGCTGTGTCCTACAACAGTCTCACTGCACTCGTCCGC
GTCATCATCACTGCAGCTGTATTTTCGCGATGCTAACCATCTTCCCCTTAACAGGAAGCCGCCGAACCTG
GCAAGGGTTCCTTCAAGTATGCGTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGCATCACCA
TCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTGGATCCATTG
CCTCACCGCTCTTTCGGACACGGCACTAACGATCCCCGCACAGACGTGCCG

Prilog 2.

Korišćeni prajmeri

1. Prajmeri za verifikaciju ITS1/4 gena

ITS1 5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3'

ITS4 5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'

2. Prajmeri za verifikaciju *tef1* gena

EF1-782f 5' CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG 3'

TEF1_LLErev 5' AAC TTG CAG GCA ATG TGG 3'

3. Prajmeri za verifikaciju *xyl1* gena

Xyr1_916_Fw 5' ATGTTGTCCAATCCTCTCCG 3'

Xyr1_916_Rev 5' TTAAAGGGCGAGGCCGGTTC 3'

4. Prajmeri za verifikaciju *lae1* gena

916Lae1_inf_fw 5'CAACTTCTCTCATCGATATGTCGCTCAACGCTCGAAAT 3'

916Lae1_inf_rev 5'TGCAGGTCGACATCGATTTACAGAGTGCAGTAGGCCGT 3'

5. RT-PCR prajmeri

	Prajmeri	Sekvence prajmera	TH2	TH6
<i>lae1</i>	RTrev-Lae1	TTCTGCGTCTGGTAGCCTC	pE =1	pE =1
	RTfw-Lae1	ACTGGAGATTGACTGGATGC	T=58°C	T=58°C
<i>xyl1</i>	qPCR_xyl1_fw	CGACATCAAGTGGCAGGCAG	pE =1	pE =1
	qPCR_xyl1_rev	CTATCGCCAAACTCGTCCGTC	T=58°C	T=58°C
<i>cbh1</i>	Cel7aTh7497 - fw	GTTCATCATTCGCTCTTG	T=58°C	pE =1
	Cel7aTh7497 - rev	GAACTTGACCAAATG	pE =1	T=58°C

Prilog 3.

Protokoli

1. Protokol za prečišćavanje PCR produkata

(mi-PCR Purification Kit (Metabion international AG, Nemačka)[330].

- PCR smešama je dodato 500 μ L PX pufera
- Homogena smeša je prebačena u GP kolone koje su postavljene u tube za sakupljanje prođenog supernatanta.
- Kolone su centrifugirane tokom 1 min na 14500 rpm, supernatant je odbačen.
- Kolona je isprana sa 500 μ L WN pufera, centrifugirana tokom 1 min na 14500 rpm, supernatant je odbačen.
- Kolona je isprana sa 500 μ L WS pufera, centrifugirana tokom 1 min na 14500 rpm, supernatant je odbačen.
- Kolona je centrifugirana dodatno još 5 min na 14500 rpm kako bi se uklonio višak etanola poreklom iz pufera
- Kolona je prebačena u ependorfe od 1,5 mL i na sredinu filtera kolone je dodato 22 μ L PCR vode za eluciju PCR produkta
- Nakon 10 min inkubiranja na sobnoj temperaturi kolone su centrifugirane 2 min na 14500 rpm i eluatu.
- PCR produktima su izmerene koncentracije DNA na Nanodropu.

2. Protokol za ekstrakciju RNA

(Rneasy Mini Kit, Qiagen) [331]

Homogenizacija uzoraka

Homogenizacija uzoraka je urađena upotrebom tečnog azota. Sterilni avani sa tučkom su korišćeni za homogenizaciju uzoraka. U avane je, u sterilnim uslovima, dodat tečni azot nakon čega je dodat micelijum. Micelijumu je dodat tečni azot i kruzinim pokretima je micelijum usitnjen. Postupak dodavanja tečnog azota je ponavljan do trenutka dobijana micelijuma izgleda pudera. Dobijeni homogenizovan micelijum je sakupljen u ependorf od 2 mL u kome je prethodno dodat pufer RTL.

Postupak izolovanja i prečišćavanja RNA

- Inkubacija uzoraka u RTL na 56°C tokom 3 min
- Centrifugiranje uzoraka tokom 2 min na 14500 rpm
- Supernatant je pažljivo prebačen u ljubičastu mini spin kolonu, sa tubom za kolektovanje uzoraka, i kolone su centrifugirane 2 min na 14500 rpm.
- Uzorak (500 µL) je pažljivo sakupljen iz tube za kolektovanje i prebačen u novi ependorf 1,5 mL.
- Ovom uzorku je dodato 250 µL etanol 99,9% i smeša je promešana pipetiranjem, i smeša je prebačena u nove roza mini spin kolone sa tubom za kolektovanje uzorak. Uzorci u kolonama su centrifugirani 1 min na 14500 rpm i supernatant je odbačen.
- U kolone je dodato 700 µL RW1 pufera. Uzorci su centrifugirani 1 min na 14500 rpm i supernatant je odbačen.
- U kolone je dodato 500 µL PRE pufera. Uzorci su centrifugirani 1 min na 14500 rpm i supernatant je odbačen.
- U kolone je dodato 500 µL PRE pufera. Uzorci su centrifugirani 1 min na 14500 rpm i supernatant je odbačen.
- Kolone sa uzorcima su dodatno centrifugirane 1 min na 14500 rpm kako bi se membrana osušila od prisutnog etanola.

- Kolone su prebačene u ependorfe od 1,5 mL i na membranama kolona je dodato 30 μ L RNase free vode kako bi se eluirala RNA i kolone su centrifugirane 1 min na 14500 rpm.
- Nakon centrifugiranja uzorci RNA su direktno stavljeni u led i merena koncentracija na nanodropu.

3. Protokol za sintezu komplementarne DNA (cDNA)

(Thermo Scientific ReverdAid First Strand cDNA synthesis)[332]

Sinteza cDNA je urađena upotrebom Thermo Scientific ReverdAid First Strand cDNA synthesis Kit po preporučenom protokolu.

RNA	5000 μ g
10X reakcioni pufer $MgCl_2$	5 μ L
DNase I, RNase-free	5 μ L
voda, nuclease-free	do 45 μ L

- Reakciona smeša je inkubirana tokom 30 min na 37°C.
- Nakon toga dodato je 5 μ L 50 mM EDTA I smeša je inkubirana 10 min na 65°C.
- Smeša je nakon 10 min stavljena u led i nakon hlađenja je spinovana
- Uzeto je 11 μ L dobivene reakcione smeše i dodat je 1 μ L oligo(dT)₁₈ prajmeri i smeša je inkubirana tokom 5 min na 70°C, nakon čega je stavljena u led.
- Smeša je centrifugirana i njoj je dodato:

Reakcioni pufer	4 μ L
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ μ L)	1 μ L
10 mM dNTP Mix	2 μ L
- Smeša je inkubirana 5 min na 37°C i smeši je dodat 1 μ L RevertAid H M-Mul V minus reverzna transkriptaza (200 U/ μ L) i inkubirana 60 min na 42°C.
- Reakcija je prekinuta inkubiranjem smeše tokom 10 min na 70°C i sintetisana cDNA je odmah stavljena u led. Koncentracija cDNA je merena na nanometru.

Biografija

Marica Grujić je rođena 22.02.1986. godine u Kruševcu, Repubika Srbija. Upisala je Hemijski fakultet, smer Diplomirani biohemičar 2005. godine, a diplomirala 2010. godine sa ocenom 10 na diplomskom ispitu. Iste godine je upisala studijski program doktor biohemijskih nauku na Hemijskom fakultetu.

Od 01.10.2010. do 1.10.2016 godine je bila zaposlena na Inovacionom centru Hemijskog fakulteta u zvanju istraživač saradnik i angažovana na projektu koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod brojem 172048. Od decembra 2014. godine, i trenutno, je angažovana kao asistent na FWF projektu (Austrijski fond sa podržavanje naučnih istraživanja) na Institutu za hemijski inženjering, Tehničkog Univerziteta u Beču, Austrija. U periodu 2012. i 2013. godine je bila angažovana kao asistent na studentskim vežbama iz predmeta Eksperimentalna biohemija i Biotehnologije u životnoj sredini predmetnog profesora dr. Zorana Vujčića, na Hemijskom fakultetu u Beogradu.

Oblasti naučnog interesovanja su ispitivanje celulaznog kompleksa enzima (endocelulaze, egzocelulaze, β -glukozidaze) kao i hemicelulaznog enzimskog kompleksa, njihova produkcija i karakterizacija i upotreba u produkciji bioetanolu.

U saradnji sa Institutom za Hemijski inženjering Tehničkog univerziteta u Beču, u toku 2012. godine završila je kurs za DNA identifikaciju gljiva roda *Trichoderma*.

Do sada je objavila 7 naučnih radova u međunarodnim časopisima, od toga 1 u časopisima kategorije M21, 2 u časopisima kategorije M22 i 4 u časopisima kategorije M23; sedam saopštenja na skupovima međunarodnog značaja M64. Član je Srpskog hemijskog društva, Biohemijskog društva Srbije, FEBS-a i FEMS-a.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Марица М.Грујић

Број индекса ДБ09/2010

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Целулазе гљиве *Trichoderma harzianum*: продукција, контрола продукције и карактеризација експримираних ензима

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 10.10.2016

Марица Грујић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Марица М. Грујић

Број индекса: ДБ09/2010

Студијски програм: доктор биохемијских наука

Наслов рада:

Целулазе гљиве *Trichoderma harzianum*: продукција, контрола продукције и
карактеризација експримираних ензима

Ментори: р.проф. др Зоран Вујчић и научни сарадник др Биљана Дојнов

Потпис ментора: Зоран Вујчић / Биљана Дојнов

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 10.10.2016

Марица Грујић

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Целулазе гљиве *Trichoderma harzianum*: продукција, контрола продукције и карактеризација експримираних ензима

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____ 10.10.2016 _____

Марица Трујић

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.