

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Sanja Ž. Grbavčić

**PROIZVODNJA MIKROBNIH LIPAZA I
PROTEAZA KAO ADITIVA U
FORMULACIJAMA DETERGENATA**

doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Sanja Ž. Grbavčić

**PRODUCTION OF MICROBIAL LIPASES
AND PROTEASES AS ADDITIVES IN
DETERGENT FORMULATIONS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

MENTOR:

Dr Zorica Knežević-Jugović,
redovni profesor
Tehnološko-metalurškog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Dejan Bezbradica,
vanredni profesor
Tehnološko-metalurškog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Dr Suzana Dimitrijević,
vanredni profesor
Tehnološko-metalurškog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Dr Ivanka Karadžić,
redovni profesor
Medicinskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

DATUM ODBRANE: _____

Mom Andreju

Zahvalnica

Ova disertacija urađena je na Katedri za Biohemijsko inženjerstvo i Biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, kao i na Katedri za Hemiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Najveću zahvalnost dugujem prof. dr Zorici Knežević-Jugović koja mi je usadila ljubav prema enzimima i pružila priliku da se bavim ovom tematikom u okviru svog naučno-istraživačkog rada. Neizmerno sam zahvalna na prenetom znanju, trudu, razumevanju, divnoj saradnji i svesrdnoj pomoći koju mi je pružala tokom izrade ove disertacije.

Sa posebnim zadovoljstvom želim da zahvalim dr Dejanu Bezbradici na aktivnom učestvovanju u planiranju eksperimenata, analizi dobijenih rezultata kao i svim drugim segmentima naučno-istraživačkog rada.

Najtoplije zahvaljujem prof. dr Ivanki Karadžić na toplom prijemu i na mogućnosti rada sa izuzetnim mikroorganizmima iz kolekcije kultura laboratorije Katedre za Hemiju, Medicinskog fakulteta, kao i na značajnim savetima koji su doprineli povećanju kvaliteta ove disertacije.

Takođe, želela bih da zahvalim dr Suzani Dimitrijević koja mi je svojim velikim znanjem i iskustvom nesebično pomogla u eksperimentalnom radu i tumačenju rezultata.

Iskreno zahvaljujem dr Lidiji Izrael-Živković i dr Nataši Avramović na lepom dočeku u laboratorije Medicinskog fakulteta, kao i na svim dobronamernim sugestijama i korisnim savetima koji su značajno olakšali izvođenje eksperimenata.

Od srca zahvaljujem dr Marini Šćiban, dr Mirjani Rajilić-Stojanović i dr Darki Marković na nesebičnoj pomoći u različitim fazama eksperimentalnog rada.

Neizmernu zahvalnost dugujem i svim profesorima Katedre za Biohemijsko inženjerstvo i Biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, tehničarima i kolegama doktorandima za prijatnu i radnu atmosferu na katedri i prijateljskoj podršci i ohrabrivanju.

I na kraju, najveće hvala mojim najbližima, mami Mirjani, ocu Željku, bratu Dejanu i supruhu Nikoli na svojoj podršci i razumevanju i svemu što su za mene činili.

Proizvodnja mikrobnih lipaza i proteaza kao aditiva u detergetima

IZVOD

U okviru ove teze, ispitan je veliki broj mikroorganizama sa aspekta produkcije ekstracelularnih lipaza i proteaza koje bi se potencijalno koristile kao aditivi u detergentima. Selekcija proizvodnih mikroorganizama obuhvatila je nekoliko faza kako bi se identifikovali mikroorganizmi koji proizvode lipaze i proteaze dobrih svojstava i u dobrom prinosu. Ove studije su izdvojile dva mikroba producenta traženih enzima, koji pokazuju neophodnu funkcionalnost u alkalnim uslovima i u širokom spektru temperatura. Dobijene lipaze iz *Pseudomonas putida* B-21 i lipaze i proteaze iz *Pseudomonas aeruginosa* san-ai su zatim ispitane sa aspekta stabilnosti u prisustvu površinski aktivnih materija, oksidacionih agenasa i komercijalnih detergenata kako bi se utvrdila primenljivost dobijenih enzima kao aditiva u formulacijama detergenata.

Uzevši u obzir pokazanu stabilnost enzima koje produkuje *P. aeruginosa* san-ai oni su primenjeni u formulaciji nekoliko novih proizvoda koji pokazuju zadovoljavajuća svojstva sa stanovišta efikasnosti čišćenja, stabilnosti pri skladištenju i sastava otpadnih voda od pranja. Enzimska formulacija detergenata je optimizovana metodom odzivnih površina (RSM). Uzimajući u obzir ekološke aspekte kao i pokazanu efikasnost, pokazano je da se najbolji efekti odmašćivanja postižu u formulaciji koja pored enzima sadrži nisku dozu Lutensol[®]-a XP 80 (0,4%).

Dalja optimizacija produkcije enzima RSM metodom definisala je sastave podloga i procesne parametre kojima se modifikuju regulatorni putevi biosinteze enzima sa ciljem povećanja prinosa lipaza i proteaza. Visoka proteolitička aktivnost se tako može ostvariti fermentacijom u medijumu koji je obogaćen Triton[®]-om X-100 (0.12% w/v) pri čemu proces fermentacije treba voditi na 32 °C. Niže temperature (20 °C) i suplementacija suncokretovim uljem pogoduju biosintezi lipaze.

Ključne reči: lipaza, proteaza, detergents, produkcija enzima

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Biotehnologija i biohemijsko inženjerstvo

UDK broj: 577.152:66.022.3:661.18

Production of microbial lipases and proteases as additives in detergent formulations

ABSTRACT

In this thesis, a vast number of microorganisms was tested in terms of the production of extracellular proteases and lipases with the ability to be used as detergent additives. These studies have marked two microbial strains which produce enzymes that show the necessary functionalities in alkaline conditions and a wide range of temperatures. A lipase derived from *Pseudomonas putida* B-21, and protease and a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* san-ai were further tested with respect to stability in the presence of surfactants, oxidizing agents and commercial detergents in order to determine the applicability of the obtained enzymes in detergent formulations.

Taking into the account demonstrated properties of lipase and protease produced by *P. aeruginosa* san-ai, these enzymes were applied in the formulation of several new products that demonstrate satisfactory performance in terms of cleaning efficiency, storage stability and wastewater composition. Enzyme detergent formulation was optimized using respond surface methodology (RSM). Considering the environmental aspects and demonstrated degreasing efficacy, detergent formulation which contains the produced enzymes should be based on low-dose Lutensol[®] XP 80 (0.4 %).

Further optimization of the enzymes production using RSM defined medium composition and process parameters in order to increase the yield of lipases and proteases produced. The high proteolytic activity can be accomplished by fermentation in a medium enriched with Triton[®] X-100 (0.12% w/v) and the process should be run at 32 °C. Lower temperature (20 °C) and sunflower oil supplementation will favor lipase biosynthesis.

Keywords: lipases, proteases, detergents, enzyme production

Academic Expertise: Engineering technology

Major in: Biotechnology and Biochemical Engineering

UDK number: 577.152:66.022.3:661.18

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Savremena sredstva za čišćenje.....	3
2.1. Površinski aktivne materije	5
2.1.1. Anjonski surfaktanti.....	5
2.1.2. Katjonski surfaktanti.....	8
2.1.3. Amfoterni surfaktanti.....	8
2.1.4. Nejonski surfaktanti.....	9
2.2. Bilderski blok	10
2.3. Oksidacioni agensi	11
2.4. Blok poboljšivača	14
2.5. Enzimi	16
2.5.1. Primena α -amilaza u detergentima	17
2.5.2. Primena celulaza u detergentima	18
2.5.3. Primena mananaza u detergentima	19
2.5.4. Primena drugih enzima u detergentima	20
3. Lipaze.....	22
3.1. Biohemijske reakcije katalizovane lipazama	23
3.2. Struktura i mehanizam delovanja lipaza	26
3.3. Primena lipaza u industriji.....	31
3.3.1. Primena lipaza u prehrambenoj industriji.....	31
3.3.2. Proizvodnja optički aktivnih jedinjenja	34
3.3.3. Sintaza površinski aktivnih materija.....	35
3.3.4. Primena lipaza u kozmetičkoj indutriji.....	36
3.3.5. Primena lipaza u sinezi biodizela.....	37
3.3.6. Primena lipaza u papirnoj i drvnoprerađivačkoj industriji	38
3.3.7. Primena lipaza u kožarskoj industriji.....	38
3.3.8. Nove mogućnosti primene lipaza	39
3.3.9. Lipaze u industriji detergenata.....	40
4. Proteaze.....	47
4.1. Serinske proteaze.....	49

4.2. Cisteinske proteaze.....	50
4.3. Aspartatne proteaze.....	51
4.5. Metaloproteaze.....	52
4.6. Primena proteaza u industriji.....	53
4.6.1. Kožarska industrija.....	53
4.6.2. Proteaze u industriji hrane.....	54
4.6.3. Farmaceutska industrija.....	57
4.6.4. Proteaze u detergentima.....	57
5. Proizvodnja enzima.....	67
5.1. Mehanizam biosinteze enzima.....	68
5.2. Mikrobna proizvodnja enzima.....	71
5.2.1. Odabir proizvodnog soja.....	72
5.2.2. Optimizacija sastava hranljive podloge.....	73
6. Materijali.....	78
7. Metode.....	82
7.1. Inicijalni skrining lipolitičkih mikroorganizama.....	82
7.2. Inicijalni skrining proteolitičkih mikroorganizama.....	83
7.3. Proizvodnja mikrobnih lipaza.....	83
7.4. Ispitivanje lipolitičke aktivnosti.....	85
7.5. Ispitivanje temperaturnog profila dobijene lipaze.....	86
7.6. Ispitivanje pH profila proizvedene lipaze.....	86
7.7. Ispitivanje proteolitičke aktivnosti.....	86
7.8. Određivanje ukupnih proteina metodom po Lowry-u.....	87
7.9. Određivanje stabilnosti lipaze i proteaze u prisustvu površinski aktivnih materija, oksidacionih agenasa i komercijalnih detegenata.....	89
7.10. Biohemijski testovi za identifikaciju mikroorganizma.....	90
7.11. Identifikacija mikroorganizama metodom sekvencioniranja 16S ribozomalne DNK.....	91
7.12. Ispitivanje efikasnosti odmašćivanja.....	93
7.13. Optimizacija sastava enzimske formulacije detergenta.....	95
7.14. Određivanje parametara otpadnih voda.....	97
8. Rezultati i diskusija.....	99
8.1. Primarna selekcija mikrobnih producenata lipaze na selektivnim medijumima.....	99
8.2. Ispitivanje kinetike mikrobnog rasta i biosinteze lipaza u tečnim podlogama.....	102
8.3. Temperaturni i pH profili proizvedenih enzima.....	106

8.4. Ispitivanje sposobnosti mikroorganizama za produkciju ekstracelularnih proteaza, kinetika produkcije enzima i njegova osnovna svojstva	109
8.5. Identifikacija mikrobnih producenata lipaza za detergente	111
8.6. Enzimi iz <i>Pseudomonas aeruginosa</i> san-ai kao aditivi u detergentima	115
8.6.1. Stabilnost lipaze iz <i>Pseudomonas aeruginosa</i> san-ai u prisustvu surfaktanata, oksidacionih agenasa i komercijalnih detergenata	115
8.6.2. Stabilnost proteaze iz <i>Pseudomonas aeruginosa</i> san-ai u prisustvu surfaktanata, oksidacionih agenasa i komercijalnih detergenata	122
8.6.3. Kompatibilnost proizvedenih enzima sa komercijalnim detergentima	126
8.7. Lipaza iz <i>Pseudomonas putida</i> B-21 kao aditiv u detergentima	128
8.7.1. Stabilnost lipaze iz <i>Pseudomonas putida</i> B-21 u prisustvu surfaktanata, oksidacionih agenasa i komercijalnih detergenata	128
8.7.2. Kompatibilnost lipaze iz <i>Pseudomonas putida</i> B-21 sa komercijalnim detergentima	130
8.8. Formulacija enzimskog preparata za čišćenje	132
8.9. Optimizacija proizvodnje enzima	149
8.9.1. Optimizacija produkcije lipaza i proteaza iz <i>P. aeruginosa</i> san-ai metodom statistički planiranog eksperimenta	153
9. Zaključak	161
10. Literatura	163
11. Prilozi	178
12. Biografija autora	182
13. Izjava o autorstvu	183
14. Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije	184
15. Izjava o korišćenju	185

1. Uvod

Savremeni detergentski su kompleksne smеше koje sadrže površinski aktivne materije (PAM), omekšivače, oksidacione agense i različite enzime. Kako svest o zaštiti životne sredine raste tako i formulacije detergenata koje sadrže enzime velikom brzinom zamenjuju konvencionalne hemijske formulacije koje sadrže slabo razgradljive, korozivne i toksične materije.¹ Formulacije sa inkorporiranim enzimima danas čine preko 80 % dostupnih detergenata na tržištima Evrope, Sjedinjenih Američkih Država i Japana.^{2,3} Enzimi se smatraju ekološki prihvatljivim aditivima jer su biodegradabilni, a kako se njihovom upotrebom povećava efikasnost čišćenja, moguće je smanjenje količine agresivnih supstanci u formulacijama za čišćenje kao i ušteda energije jer se proces pranja može vršiti pri nižim temperaturama.^{4,5} Prema procenama vodećih svetskih proizvođača enzima, smanjenjem temperature pranja sa 40 °C na 30 °C ostvarila bi se ušteda energije od preko 30% po jednom ciklusu pranja, što bi na godišnjem nivou na području čitave Evrope predstavljalo uštedu od preko 4 milijardi kWh. Ova ušteda energije bi tako posredno doprinela smanjenju emisije CO₂ za 150-450 g po jednom ciklusu pranja, što na nivou Evrope predstavlja godišnji potencijal uštede od 12 miliona tona CO₂.⁶ Imajući ovo u vidu, jasno je da je uticaj na životnu sredinu koji se ostvaruje implementacijom enzima u formulacije za čišćenje mnogostruk. Osim značaja pitanja emisije CO₂ u kontekstu globalne borbe protiv klimatskih promena, uključivanje enzima u formulacije detergenata omogućava smanjenje udela slabo razgradivih jedinjenja prouzrokujući na taj način i značajno povećanje kvaliteta otpadnih voda.

Kako površinski aktivne materije zauzimaju najveće mesto u raspodeli troškova proizvodnje savremenih sredstava za čišćenje, smanjenje njihove koncentracije na račun dodatka enzima koji su izuzetno aktivni već pri niskim koncentracijama bi trebalo da

opravda cenu produkcije enzima čime bi u ukupnom bilansu troškovi proizvodnje detergenta trebalo da ostanu nepromenjeni ili čak i da budu niži.⁶

Na današnjem nivou, preko 30% tržišta enzima upravo predstavljaju enzimi namenjeni za primenu u detergentima, i to pre svega: proteaze, amilaze, lipaze i celulaze. Međutim, nisu svi enzimi pogodni za upotrebu u formulacijama detergenata. Pored toga što njihova proizvodnja mora biti ekonomična, enzimi koji se koriste u formulacijama detergenata moraju da budu stabilni u prisustvu agenasa koji često imaju inhibitorno ili deaktivirajuće dejstvo. Potreba za novim enzimima boljih performansi u detergentima, kao i nedostupnost podataka o razvijenim formulacijama zbog korišćenja patenata, dovele su da potraga za novim mikrobnim producentima enzima bude neprekidno u žiži naučnog i istraživačkog interesovanja i industrijskog razvoja.

Upravo iz tih razloga, u ovoj doktorskoj disertaciji će se izvršiti ispitivanje različitih mikrobnih sojeva sa aspekta produkcije ekstracelularnih lipaza i proteaza. Na osnovu utvrđenih svojstava dobijenih enzima, razmotriće se njihova primena u industrijskim procesima, odnosno ispitaće se njihova aktivnost i stabilnost u uslovima relevantnim za konkretan proces, gde će se najveći deo pažnje posvetiti mogućnosti primene ovih enzima kao aditiva u industriji detergenata. Mogućnost primene dobijenih lipaza i proteaza kao aditiva u detergentima će obuhvatiti ispitivanja njihove aktivnosti i stabilnosti u prisustvu različitih površinski aktivnih materija, oksidujućih agenasa i dezinficijenasa pri različitim koncentracijama i temperaturama sa ciljem razvoja novih enzimskih formulacija detergenata.

Selektovani enzimi će biti primenjeni u formulaciji nekoliko novih proizvoda koji pokazuju zadovoljavajuća svojstva sa stanovišta efikasnosti čišćenja u procesu pranja, stabilnosti pri skladištenju i sastava otpadnih voda od pranja. U cilju određivanja optimalnih svojstava enzimske formulacije detergenata, njen sastav biće optimizovan metodom odzivnih površina (RSM) uzimajući u obzir ekološke aspekte kao i pokazanu efikasnost u uklanjanju masnih onečišćenja. Dalja optimizacija produkcije enzima metodom statistički planiranog eksperimenta definišće sastave podloga i procesne parametre kojima se modifikuju regulatorni putevi biosinteze enzima sa ciljem povećanja prinosa selektovanih lipaza i proteaza.

2. Savremena sredstva za čišćenje

Savremena sredstva za čišćenje radnih i drugih površina su kompleksne smeše čiji sastav zavisi od specifičnih potreba krajnjih korisnika. Njihova funkcija i uloga je da izazovu uklanjanje nečistoća sa različitih površina rastvarajući onečišćenja i stabilizujući ih u rastvorenom stanju u smeši za pranje kako bi se mogle lakše ukloniti.

Sposobnost detergenta za obavljanje ovih funkcija zavisi od sastava formulacije, uslova korišćenja, prirode tretiranih površina i prirode onečišćenja. Shodno tome, formulisanje sastava detergenata je složen proces vođen namenom detergenta, troškovima proizvodnje, uticajem na životnu sredinu, kao i dostupnosti specifičnih komponenata koje obezbeđuju potrebnu funkcionalnost.⁷

Sintetički detergentsi kakve danas poznajemo počinju svoj razvoj od perioda Prvog svetskog rata, kada je nestašica ulja i masti neophodnih za pravljenje do tada korišćenih sapuna nametnula potrebu razvoja novih sredstava za čišćenje. Prvo sintetičko sredstvo za čišćenje- alkil naftalen sulfonat- razvijeno je u Nemačkoj 1916. godine a dobijeno je alkilovanjem i zatim sulfonovanjem naftalena, poznatog izocikličnog jedinjenja koje se izoluje iz katrana kamenog uglja.⁸ Nastavak geopolitičkih kriza u periodu između dva rata, nametao je sve veću potrebu za pronalaženjem adekvatne zamene za sapune spravljanih od prirodnih masnoća. Razvoj tehnologija u tom periodu omogućio je dobijanje sintetičkih masnih kiselina i masnih alkohola što je omogućilo sve veću primenu ovih sirovina za dobijanje sintetskih tenzida. Jedna od tih sirovina bila je i sekundarni alkan-sulfonat dobijen sulfoksidacijom alkana koji počinje da se primenjuje od 1941. godine kao osnovna komponenta sintetičkog praška za pranje rublja pod nazivom „Rif“.

Pojava nejonskih tenzida vezuje se za 1930. godinu kada su u Nemačkoj hemičari kompanije „IG Farben“ uspeali da proizvedu prve etoksilate masnih alkohola, a 1934. godine počela je proizvodnja i etoksilata alkilfenola. Sama upotreba nejonskih

tenzida u detergentima počela je oko 1940. godine, a njihova vrsta, količina i spektar proizvoda u kojima se koriste neprestano se proširuje sve do današnjih dana.⁸

Do razvoja savremenih formulacija za čišćenje, osvajane su tehnologije proizvodnje mnogih sintetičkih sirovina koje pokazuju bolja svojstva u pogledu efikasnosti čišćenja. Promene u načinu čišćenja i razvoj ekološke sveti zahtevale su razvoj čitavog asortimana ovih proizvoda i unapređivanje formulacija razvojem i dodatkom drugih aditiva poput omekšivača, optičkih izbeljivača i na kraju enzima.

Danas su daleko najčešći i najpoznatiji detergents koji se koriste u domaćinstvu za čišćenje i ličnu higijenu. Ovde pre svega spadaju:

- a. Detergents za veš i pomagala. Ovim su obuhvaćeni detergents u različitim oblicima poput praškastih, tečnih, u obliku gela ili čvrsti; omekšivači, obično u tečnom stanju; i čitav niz specijalnih proizvoda, kao što su sredstva za predpranje i izbeljivači.
- b. Detergents za pranje posuđa. Ovo uključuje detergente za ručno i mašinsko pranje sudova i obično se nalaze u obliku tečnosti, gela, u prahu, ili obliku tableta.
- c. Proizvodi za čišćenje domaćinstva. Uključuju različite formulacije, najčešće u tečnoj ili praškastoj formi, namenjeni različitim tipovima površina koje se mogu pronaći u domaćinstvima.
- d. Sredstva za ličnu higijenu. Ovo uključuje proizvode za pranje ruku i tela kao što su sapuni, šamponi, gelovi i paste za zube. Prvenstveno se prodaju u formi gela i tečnih formulacija.

Proizvodi u okviru svake od ovih kategorija su formulisani tako što su izabrani specifični sastojci koji obezbeđuju potrebnu svrhovitost, dok istovremeno ispunjavaju specifična ograničenja troškova, ekološke propise i bezbednosne smernice za ljudsku upotrebu.⁷

Pored ovih poznatih proizvoda široke potrošnje, detergents se koriste u velikom broju drugih aplikacija i industrije poput sanacije životne sredine, formulisanje boja i mastila, tekstilne obrade, nanoinženjeringa, poljoprivrede itd.

Na osnovu raznolikosti primene detergenata, kao i mnoštva formi u kome se on može nalaziti, vidi se da formulisanje sastava detergenta predstavlja prilično veliki izazov i nimalo lak zadatak. Uz to treba imati u vidu da savremeni detergentsi sadrže i preko 20 komponenti u zavisnosti od željenih performansi. U zavisnosti od hemijskog sastava i funkcije koju imaju u krajnjoj formulaciji detergenta, komponente možemo grubo razvrstati na površinski aktivne materije, bildere (graditelje), oksidacione agense, poboljšivače i enzime.

2.1. Površinski aktivne materije

Osnovna materija u sastavu modernih detergenata su površinski aktivne materije (PAM). Površinski aktivne materije (tenzidi ili surfaktanti –od engleskog naziva *surface active agents*) čine veliku grupu supstanci različitih po hemijskom sastavu i poreklu, koje u malim koncentracijama imaju svojstvo da se adsorbuju na površinama ili međupovršinama sistema i da pri tome u znatnoj meri menjaju slobodnu površinsku ili međupovršinsku energiju. Ovo svojstvo je posledica njihove strukture po kojoj svaki od ovih molekula sadrži hidrofobni i hidrofilni deo-kao konsekvencu, oni se koncentrišu na granici nemešljivih faza menjajući površinski napon tečnosti. U zavisnosti od prirode hidrofilnog dela razlikujemo anjonske, katjonske, amfoterne i neutralne surfaktante.

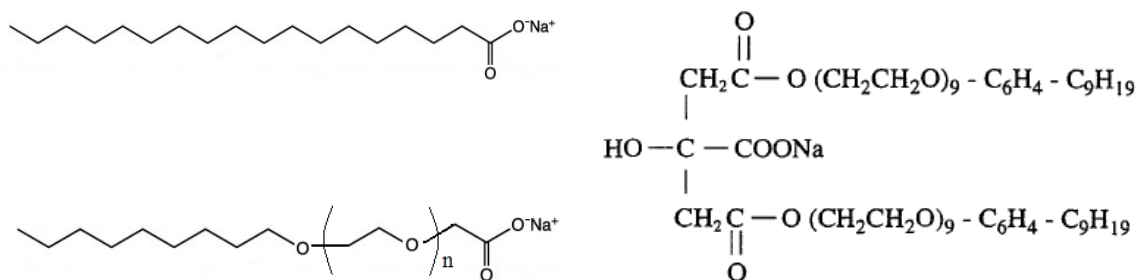
2.1.1. Anjonski surfaktanti

Ova klasa površinski aktivnih materija predstavlja najviše upotrebljivanu vrstu ovih jedinjenja u detergentima. Shodno tome, njihova proizvodnja je u velikoj meri ekonomski pristupačna. Njihova izuzetna svojstva u uklanjanju nečistoća posledica su upravo i činjenice da je većina nečistoća negativno naelektrisana, pa se i nakon uklanjanja nečistoće ovi surfaktanti pozicioniraju tako da sprečavaju redepoziciju prljavštine na površini.

Kod ove vrste surfaktanata, hidrofilni deo je negativno naelektrisan, a može biti karboksilatni jon, sulfat, sulfonat ili fosfat.⁹

- Karboksilne kiseline i njihovi derivati

Površinski aktivna svojstva pokazuju soli masnih kiselina, kao i soli mono estara di- i trikarboksilnih kiselina. Takođe u ovu podgrupu spadaju i soli pojedinih karboksilatnih etara, poput onih nastalih od etoksilovanih alkohola.



Slika 2.1. Strukture nekih anjonskih surfaktanata na bazi soli karboksilnih kiselina ili njihovih derivata

- Derivati sumporne kiseline

Ova klasa obuhvata organske estre sumporne kiseline, čija se svojstva razlikuju u zavisnosti od dužine i razgranatosti masne kiseline u njenom sastavu. Najznačajniji predstavnik ove vrste anjonskih detergenata je natrijum-dodecil-sulfat, koji je sve do pojave sulfonata bio vodeći surfaktant u proizvodima za higijenu. Ova jedinjenja su i danas sastavni deo formulacija za čišćenje jer se njihovim dodatkom ostvaruje dobra penušavost.

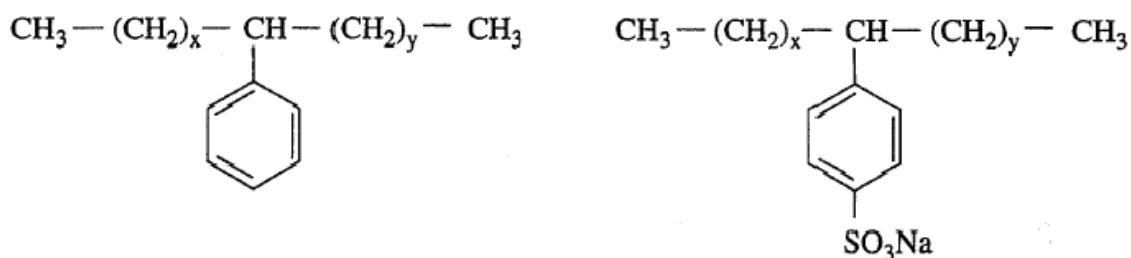


Slika 2.2. Strukture nekih surfaktanata na bazi soli organskih estara sumporne kiseline

Drugi tip surfaktanata nastao je sulfonovanjem etoksilovanih alkohola. Za razliku od alkilsulfata, ovaj tip surfaktanata pokazuje bolju rastvorljivost, a u zavisnosti od stepena etoksilovanja i bolja svojstva u pogledu uticaja tvrdoće vode. Ovaj tip surfaktanata pokazuje i zanimljiva reološka svojstva pa se tako viskozitet detergenata u čijem su sastavu može menjati u zavisnosti od prisustva elektrolita, čime se na jednostavan način može uticati na njihova svojstva.

Posebnu klasu ovih jedinjenja čine sulfonati-jedinjenja koja takođe nastaju u reakciji sulfonovanja masnih kiselina hlorsumpornom kiselinom ili u reakciji sa sumpor trioksidom, sa tom razlikom što se sulfonovanje odvija na vodonikovom atomu koji je direktno vezan za ugljenik. Ovim nastaje C-S veza što ova jedinjenja čini znatno otpornijim na hidrolizu.

U ovu grupu jedinjenja spadaju i danas najviše upotrebljavani linearni alkil aril sulfonati. Optimalna svojstva ovih surfaktanata u pogledu sposobnosti kvašenja, penušanja i sposobnosti uklanjanja nečistoća ostvaruju ona jedinjenja u čijem sastavu se nalazi lanac od 9-15 ugljenikovih atoma.⁹



Slika 2.3. Linearni alkilbenzen i natrijumova so linearnog alkilbenzen-sulfonata

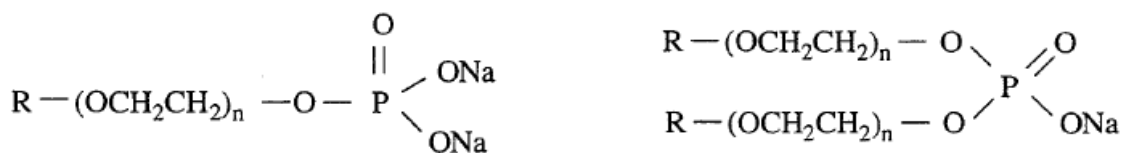
Kako je proizvodnja linearnih alkilbenzen-sulfonata izuzetno ekonomična, ovi surfaktanti se danas obilato koriste u većini tipova formulacija za čišćenje domaćinstava i tkanina. Pored toga, našli su svoju primenu i u drugim oblastima industrije, kao što je proizvodnja gipsanih ploča i papirna i tekstilna industrija.

Pored navedenih, od industrijskog značaja su i soli α i ϕ -sulfonovanih estara masnih kiselina kao i mono- i dialkil estara sulfonovane ćilibarne kiseline, kao i njima srodna jedinjenja.

- Derivati fosforne kiseline

U ovu klasu jedinjenja spadaju alkil fosfati i alkil etar fosfati. Ovi fosfatni estri masnih kiselina, nastaju reakcijom sa ortofosfornom kiselinom ili fosfor pentoksidom, što rezultuje smešom mono i difosfatnih estara, kao i izvesnom količinom slobodne

fosforne kiseline. Usled toga, ovi surfaktanti imaju primenu u kiselim formulacijama za čišćenje, a mogu se koristiti i za uklanjanje korozije sa metalnih površina.



Slika 2.4. Strukture nekih tenzida na bazi fosfatnih soli

2.1.2. Katjonski surfaktanti

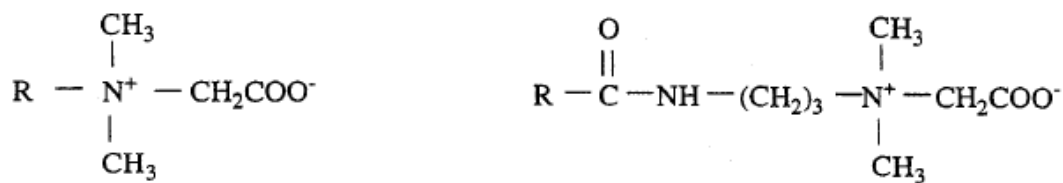
Ove površinski aktivne materije poseduju pozitivno naelektisanu grupu u svom hidrofilnom delu i najčešće imaju svojstvo da se dobro adsorbuju na površinama za čišćenje dugotrajno menjajući njihova svojstva, a često imaju i antimikrobno dejstvo. Usled ovoga, pojedini katjonski surfaktanti su našli svoju primenu kao omekšivači tkanina, dok se drugi koriste u predpripremi površina za različite tretmane ili kao emulgujući agensi.

U ovu grupu jedinjenja spadaju različiti alkil amini i njihovi derivati, alkilimidazoli i različite kvaternarne amonijum soli.

2.1.3. Amfoterni surfaktanti

Amfoterni surfaktanti poseduju i pozitivno i negativno naelektrisane grupe, pa se njihovo nelektrisanje menja u zavisnosti od pH rastvora, tako da se na određenim pH vrednostima nalaze i u formi dipolarnih jona, odnosno u formi cviterjona. Ova jedinjenja najčešće pokazuju nisku iritabilnost, pa se najčešće mogu naći u proizvodima za ličnu negu ili namenjenim ručnom pranju.

Najbolji predstavnici ove grupe surfaktanata su derivati N-trialkil derivati aminokiselina, poznati kao betaini.

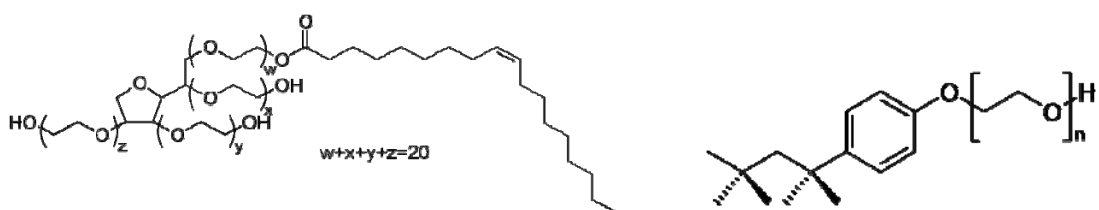


Slika 2.5. Strukture betaina- alkil-betain i alkil-amidopropil-betain

Pored njih, koriste se i derivati aciletilendiamina i N-alkil aminokiselina.

2.1.4. Nejonski surfaktanti

Ovoj grupi surfaktanata, kao najznačajniji predstavnici pripadaju različiti estri i etri etoksilovanih masnih alkohola koji se danas obilno koriste u sredstvima za čišćenje jer se uspješno kombinuju sa anjonskim surfaktantima, u odnosu na koje pokazuju različita svojstva u pogledu uticaja temperature, pa se tako u većini savremenih formulacija koje se reklamiraju kao proizvodi koji su delotvorni na različitim temperaturama, nalaze upravo različite smeše ovih surfaktanata. Pored njih u upotrebi su i alkil estri i etri poliglikozida, kao i veliki broj drugih estara poput estara etoksilovanih alkohola i masnih kiselina, estri polihidroksilnog alkohola sorbitola, glikolni i estri glicerola.



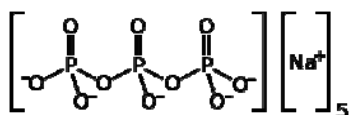
Slika 2.6. Strukture nejonских tenzida Tween[®] 80 (levo na slici) i Triton[®] X-100¹⁰ (desno na slici)

2.2 Bilderski blok

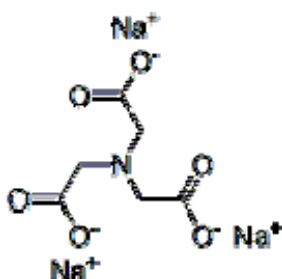
Bilderski blok ima veoma važnu ulogu u detergentu. Kako se pojedinačne supstance koje se nalaze u sastavu detergenta nalaze u različitim agregatnim stanjima, bilderi se dodaju kako bi preveli tečne surfaktante u čvrsto stanje pri formulaciji praškastih detergenata. Pored toga, od njega se očekuje brza eliminacija jona kalcijuma i magnezijuma iz vode, odnosno omekšavanje vode. Ovo je bitno svojstvo bilderskog bloka, jer višak ovih metalnih jona izaziva precipitaciju sapuna kao i taloženje pojedinih nečistoća u vidu teško uklonjivih taloga. Pored toga, bilderski blok treba da obezbedi postizanje alkalne sredine (i to sa relativno visokim puferskim kapacitetom).⁸

Prvi bilderi su bili karbonati, ali je njihov problem bio taloženje kalcijumom iz vode, pa su 1947. godine počeli da se koriste fosfati. Natrijum-tripolifosfat je najviše korišćeni bilder i u savremenim formulacijama detergenata. Fosfati imaju sinergetsko dejstvo sa surfaktantima jer omekšavajući vodu povećavaju moć pranja. Pored toga oni imaju ulogu da disperguju nečistoće na sitne čestice i da spreče ponovno taloženje. Zahvaljujući ovim karakteristikama fosfati su postali nezamenjiv deo detergenta u unosu (količini na ukupnu količinu gotovog proizvoda) od 20-25%. Upotreba fosfata je postepeno organičena u periodu od 1970. do 1990. iz ekoloških razloga. Naime, obzirom na količine efluenta u kanalizacionim cevima nakon pranja, tražene su materije koje će biti neutralne i neće izazivati eutrofikaciju vodenih resursa. Kao zamena za fosfate pojavio se sintetički zeolit koji je po hemijskom sastavu Na-Al-silikat kao i hemijske supstance koje imaju status pomoćnih bildera, polikarboksilati, nitrilosirćetna kiselina, etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA), limunska kiselina, fosfonati, natrijum-karbonat i natrijum-bikarbonat. Ipak, iako su neki negativni aspekti na životnu sredinu smanjeni, promena sastava detergenata nije u potpunosti zadovoljila kriterijume sa tehničkog aspekta učinkovitosti detergenta. Takođe, novi bilderi nisu rešili pitanje povećane koncentracije teških metala u vodama od ispiranja, a pojedini su i povećavali hemijsku potrošnju kiseonika.⁸

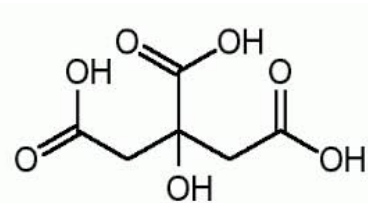
Kako prava zamena za fosfate nije ni do danas pronađena, tako da se u modernim detergentima kombinuje fosfat, zeolit i neki od pomenutih kobildera. Moderni detergenti najčešće sadrže tri kobildera: polikarboksilat, fosfonat i natrijum-karbonat.



Natrijum-tripolifosfat



Natrijum-nitilotriacetat



Limunska kiselina

Slika 2.7. Supstance korišćene kao bilderi u detergentima

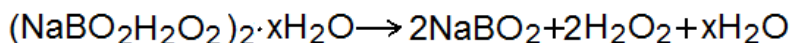
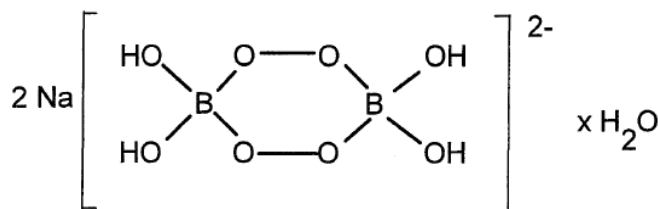
2.3. Oksidacioni agensi

Oksidacioni agensi, iako ne moraju nužno biti sastavni deo detergenata, često se posebno dodaju smeši za pranje neposredno pred upotrebu, kako bi uklonili onaj tip fleka koji nije podložan dejstvu surfaktanata ili enzima. Dalje, oksidacioni agensi deluju i na očuvanje boja oksidujući rastvorena obojena zaprljanja čime se sprečava njihova neželjena redepozicija na površinama za pranje. Takođe, oni često deluju kao dezificijensi, što je posebno važno ukoliko se pranje vrši na nižim temperaturama na kojima se ne ostvaruje željena dezinfekcija, a koju, između ostalog, diktira i sve veća upotreba sintetičkih tkanina koje ne trpe pranje na visokim temperaturama. Postizanje asepticnosti je pored redukcije patogenih mikroorganizama važno i sa aspekta sprečavanja stvaranja neprijatnih mirisa nastalih mikrobnom degradacijom zaostalih nečistoća, kao i uništavanje tekstila i površina za pranje dejstvom mikrobnih enzima ili mikrobnom indukovanom korozijom.

Budući da nečistoće na koje ove komponente detergenata deluju uključuju veliki broj različitih jedinjenja, teško je u potpunosti objasniti mehanizam njihovog dejstva. Obojene fleke koje oni uklanjaju najčešće su poreklom od kafe, čaja, crvenog vina i

različitih biljnih proizvoda. Hemijski gledano ovo su najčešće smeše različitih porfirina, karotenoida, antocijanina, tanina, flavona i drugih fenolnih jedinjenja.

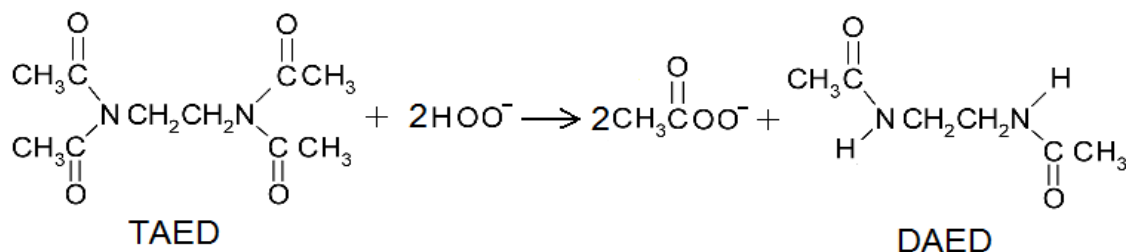
U savremenim sredstvima za čišćenje najčešće se dodaju natrijum-perborat-tetrahidrat i natrijum-perborat-monohidrat kao i natrijum-perkarbonat. Rastvaranjem ovih soli u smeši za pranje nastaje perhidroksilni anjoni, uz izvesne količine peroksoborata ili karbonata koji će doprineti dodatnom povišavanju pH vrednosti. Za uspešno formulisanje detergenata koji će sadržati neki od ovih agenasa, neophodno je uzeti u obzir sadržaj aktivnog kiseonika u njima kao i rastvorljivost na predviđenoj temperaturi pranja. Dalje, pri upotrebi manje stabilnih soli moraju se preduzeti mere njihove zaštite.



Slika 2.8. Natrijum-perborat monohidrat. Struktura i reakcija

Kako se zadovoljavajuća rastvorljivost ovih soli postiže na temperaturama iznad 60 °C, što nije u skladu sa savremenim težnjama uštede energije koje su nametnule trend pranja na niskim temperaturama i skraćivanju ciklusa pranja, u formulacije detergenata se inkorporiraju supstance koje deluju kao aktivatori oksidujućih materija. Dodatkom aktivatora, ove soli se najčešće prevode u perkiseline koje su jači oksidansi. Ova jedinjenja su hemijski gledano različiti estri ili amidi karboksilnih kiselina. Aktivatori oksidacionih agenasa bi trebalo da u uslovima pranja brzo izvrše konverziju perhidroksida u odgovarajuće perkiseline koje su stabilne u procesu pranja, i koje pokazuju zadovoljavajuća svojstva u pogledu efikasnosti čišćenja, dok sa druge strane ne smeju vršiti oksidaciju drugih komponenata detergenta i imati negativan uticaj na površine (tkanine) za pranje ili životnu sredinu. Danas se u te svrhe najviše koristi

tetraacetiletilendiamin (TAED) koji reagujući sa perhidroksilnim jonom u alkalnoj sredini daje peracetatni jon i diacetiletilendiamin (DAED).



Slika 2.9. Aktivacija oksidujućih materija u detergentima

Uzevši u obzir oksidacionu nestabilnost TAED-a, moraju se preduzeti mere njegove zaštite kako ne bi došlo do prerane oksidacije tokom lagerovanja, pa se tako on dodaje na kraju formulisanja detergenta i to u granulisanom formi. Nastali DAED je u potpunosti biodegradabilan jer njegovom razgradnjom nastaje amonijak, CO₂ i voda.⁷

Inkorporiranje peroksidne kiseline kao komponente detergenta kojim bi se zamenila sada upotrebljavana kombinacija persoli i aktivatora nije naišla na značajniju primenu usled niske stabilnosti tokom lagerovanja i poteškoća u formulisanju takvih detergenata.

Pored navedenih persoli i aktivatora, kao oksidacioni agensi koji se najčešće koriste samostalno u procesu predpranja treba spomenuti i oksidacione agense na bazi aktivnog hlora-perhlorate. Jačina ovih oksidacionih agenasa se najčešće izražava kao koncentracija aktivnog hlora koji sadrže. Pored konkretnog sadržaja izbeljivača, na njihovu stabilnost, aktivnost i reaktivnost prvenstveno utiče pH rastvora pranja, odnosno lagerovanja, kojim je određena ravnoteža HOCl/OCl⁻ a samim tim i sadržaj aktivnog hlora.

2.4. Blok poboljšivača

U ovaj segment možemo svrstati druge specifične supstance koje se dodaju detergentima kako bi se poboljšale njihove karakteristike, kao što su optički izbeljivači, sredstva protiv posivljenja i prenošenja boja, sredstva protiv korozije, antipenušavci, sredstva kojim se menjaju reološka svojstva tečnih detergenata, mirisne komponente i sl.

-optički izbeljivači

Ove supstance apsorbuju ultravioletne zrake svetlosti reflektujući zrake više talasne dužine koji pripadaju regiji plave boje (420-470 nm). Time se vizuelno smanjuje reflektovana žuta svetlost i prividno se postiže efekat izbeljivanja. Kao prvi pronalazač optičkih sredstava za izbeljivanje smatra se Paul Krais koji je 1929. utvrdio da je polubeljeno laneno vlakno natopljeno u rastvor euksalina, koji je derivat ekstrakta divljeg kestena, postalo приметно belje nego pre tretmana. Već 1934. godine stručnjaci britanskog ICI su patentirali stilben-disulfonsku kiselinu kao agens za optičko izbeljivanje. Ova sredstva su prvi put upotrebljena u detergentima 1944. godine. Danas su ova sredstva standardni dodatak detergentima u unosu od oko 0,3%.⁸

-sredstva protiv posivljenja i prenosa boje

U savremenim sredstvima za čišćenje se dodaju i supstance koje imaju sposobnost da dispergovane nečistoće i rastvorenu boju adsorbuju u floti, i time spreče njihovu redepoziciju na površinama za pranje. Danas je karboksimetil-celuloza obavezan sastojak svakog detergenta, a kombinuje se sa polimerima maleinske i akrilne kiseline. Takođe, sa tim ciljem dodaju se i različiti polimeri, poput polimera na bazi polivinil-pirolidona.⁸

-sredstva protiv korozije

Njihova uloga je da zaštiti metalne površine u formulacijama za čišćenje površina, kao i unutrašnju površinu mašine od korozije. U ove svrhe se dodaju različiti silikati. Silikati koji se dodaju, mogu se svrstati i pod kategorijom bildera. Oni uspešno

omekšavaju vodu uklanjanjem Ca^{2+} i Mg^{2+} jona, a imaju i helatorsko dejstvo i nad jonima teških metala. Ovo posledično utiče na brzinu dejstva oksidacionih agenasa, usporavajući prebrzu oksidaciju koja može naštetiti vlakna materijala i izazvati koroziju.

- sredstva kojim se menjaju reološka svojstva

Sredstva kojim se menjaju reološka svojstva se dodaju detergentima pri formulisanoj tečnosti detergenata kako bi se postigao zadovoljavajući viskozitet detergenata i postigla odgovarajuća stabilizacija formulisanoj detergenata. Postoji veliki broj jedinjenja koja se dodaju detergentima u ove svrhe, a po hemijskom sastavu to su najčešće različiti prirodni i sintetski polimeri (poput guma, biljnih polisaharida, hemijski modifikovanih prirodnih polimera, surfaktanata itd.). Rastvorljivost ovih jedinjenja u vodi je posledica strukture koju karakteriše veliki broj hidroksilnih grupa, naelektrisanje, polarnost i sklonosti ka stvaranju vodoničnih veza.⁸

- mirisne supstance

Zadatak mirisa je da privuče kupca i da bude jedan od faktora koji će ga usmeriti kod sledeće kupovine. Iako parfemske supstance ne učestvuju u procesu uklanjanja nečistoća, njihovo prisustvo umnogome utiče na subjektivni doživljaj čistoće kod korisnika. Iz tog razloga se velika pažnja posvećuje formulisanoj ovih komponenti koje same po sebi predstavljaju smeše velikog broja isparljivih organskih materija. Od mirisa se zahteva da održi svoju trajnost i stabilnost u detergentskim proizvodima u toku samog skladištenja (primarno fiksiranje), a treba da ima i sposobnost prijanjanja na tekstilna vlakna (sekundarno fiksiranje).⁸ Prilikom formulisanoj detergenata treba obratiti pažnju da upotrebljena parfemska komponenta ne destabilizuje proizvod i da ima sposobnost da prikriva neprijatne mirise upotrebljenih komponenti u formulaciji kao i one koji su posledica nečistoća na tretiranim površinama prilikom procesa pranja.

2.5. Enzimi

Zahvaljujući velikoj aktivnosti enzima pri malim koncentracijama kojima se postižu izuzetni efekti u uklanjanju različitih tipova nečistoća, enzimi su našli svoju poziciju kao nezamenljivi aditivi u proizvodnji detergenata. Primena enzima u industriji detergenata počinje 1914. godine, kada je Otto Röhm patentirao prvi enzimski detergent namenjen predpranju tkanina. Naziv ovog detergenta bio je „Burnus“ po nemačkom nazivu bele odeće tradicionalno nošene u arapskim zemljama. Ovaj detergent je sadržao životinjske pankreasne enzime- lipaze, proteaze (tripsin i himotripsin), karboksipeptidaze, α -amilaze, laktaze, maltaze i invertaze. Ovaj proizvod se prodavao širom Evrope tokom narednih 50 godina. Na tržištu su se tada javili i ekstrakti prečišćenih pankreasnih enzima koji su prodavani u iste svrhe. Prekretnica u primeni enzima u detergentima bila je 1959. godina kada je švajcarski hemičar Dr Jaag razvio proizvod nazvan Bio-40 koji je prvi detergent koji je sadržao proteaze bakterijskog porekla.^{11,12} Ubrzo je Novo Industry (današnji Novozymes) iz Danske patentirao Alcalase®-prvu alkalnu proteazu iz *B. licheniformis* što je otvorilo vrata širokoj upotrebi enzima u detergentima.

Od tada primena enzima, i to pre svega proteaza i lipaza, a zatim i α -amilaza i celulaza, u detergentima doživljava ekspanziju, pa tako oni postaju standardni aditivi u detergentima. Svojstva i tip enzima koji se dodaju zavise od namene i fizičkih svojstava formulacije. Enzimi se smatraju ekološki prihvatljivim aditivima jer su biodegradabilni, a kako se njihovom upotrebom povećava efikasnost čišćenja, moguće je smanjenje količine agresivnih supstanci u formulacijama za čišćenje kao i ušteda energije jer se proces pranja može vršiti pri nižim temperaturama.⁵

Međutim, nisu svi enzimi pogodni za upotrebu u formulacijama detergenata. Pored toga što njihova proizvodnja mora biti ekonomična, enzimi koji se koriste u formulacijama detergenata moraju da budu stabilni u prisustvu agenasa koji često imaju inhibitorno ili deaktivirajuće dejstvo. Takođe, proces pranja se često vrši pri povišenim temperaturama (iznad 40 °C) i u izrazito alkalnoj sredini (pH 9–12).¹³ Proizvođači

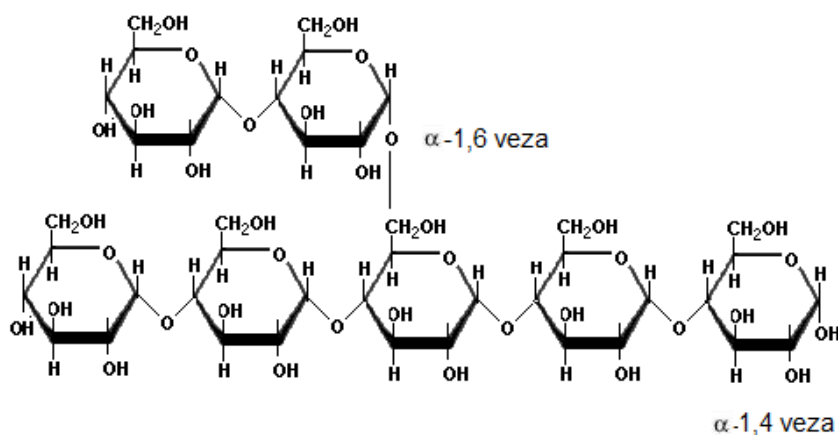
enzima su uspjeli da izoluju različite mikrobnje producente enzima koji su aktivni i stabilni pri navedenim temperaturnim i pH uslovima.

Pored toga, metode molekularnog inženjeringa omogućile su dobijanje enzima stabilnih u prisustvu izbeljivača, omekšivača i drugih agresivnih supstanci.

Pored lipaza i proteaza koje su predmet rada ove doktorske disertacije i čija svojstva će se detaljnije obraditi u narednim poglavljima, kao aditivi u detergentima se koriste amilaze, celulaze i mananaze.

2.5.1. Primena α -amilaza u detergentima

α -Amilaze počinju da se primenjuju u detergentima '70-tih godina prošlog veka, dok se danas primenjuju u većini detergenata za pranje rublja i pranje sudova. Njihova funkcija u detergentima je da potpomognu razgradnju mrlja na bazi skroba hidrolizujući α -1,4 glikozidnu vezu u molekulu amiloze i amilopektina do rastvorljivijih dekstrina, oligosaharida i prostih šećera.



Slika 2.10. Struktura skroba

Dejstvom ovih enzima uspešno se razgrađuju mrlje poput čokolade, različitih kaša, hrana za bebe i sl. Takođe, hidrolizovanjem želatinizovanog skroba koji deluje poput lepka uklanjaju se i nečistoće drugih tipova. Komercijalno, ovi enzimi su proizvedeni iz *B. subtilis*, *B. licheniformis* ili *B. amyloliquefaciens*. Ove amilaze

pokazuju izuzetna svojstva u pogledu uticaja temperature i pH, kao i nepodložnost proteolizi. Sa druge strane, podložne su oksidativnoj deaktivaciji, pa se zahvaljujući detaljnom poznavanju njihove strukture, poslednjih godina vrše intenzivna istraživanja sa ciljem da se proizvedu genetski modifikovani sojevi koji proizvode enzime izmenjene primarne strukture koji su stabilniji u prisustvu oksidacionih agenasa. Pregled komercijalnih amilaza koje su namenjene industriji detergenata dat je u sledećoj tabeli.

Tabela 2.1. Komercijalni preparati amilaze i njihove karakteristike¹⁴

Naziv	Proizvođač	Poreklo	pH optimum	Temperaturni profil, °C
Termamyl	Novozymes	<i>B. licheniformis</i>	7-11	70-90
Termamyl Ultra			7-11	
Stainzyme	Novozymes		7-11 (9)	30
Stainzyme Ultra			7-11 (9)	30
Duramyl	Novozymes		7-9,5	65-85
Purastar	Genencore	<i>B. licheniformis</i>	6-9	75-90
Purastar OxAm	Genencore		6-9	75-90

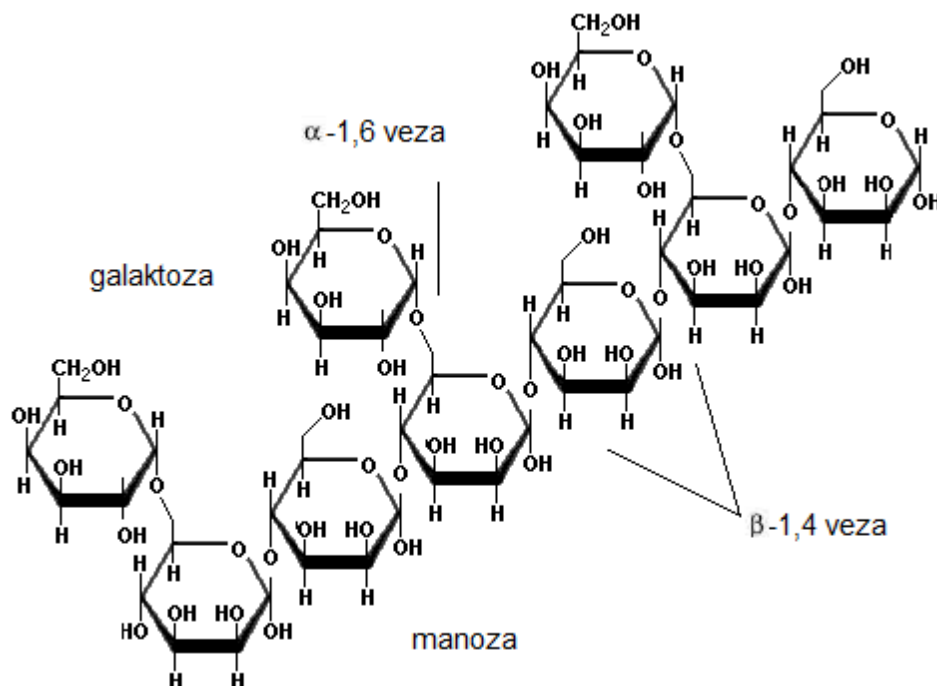
2.5.2. Primena celulaza u detergentima

Celulaze se, za razliku od drugih enzima koji se dodaju da bi uklonili određeni tip mrlja, dodaju detergentima za pranje rublja kako bi uklonili okržana mikrovlakna. Posledično, prividno se poboljšava sjaj i boja tretirane tkanine, ona postaje mekša i uklanjaju se neki tipovi tvrdokornih nečistoća koje su locirane na krajevima iskrzanih mikrovlakana. Celulaze hidrolizuju β -1,4 glikozidne veze u molekulima celuloze. Celulaze koje se koriste u detergentima su smeše egzocelulaza, endocelulaza i celobiazaza. One su prvi put inkorporirane u detergente 1987. godine u Japanu, kada se alkalna celulaza iz *Bacillus* sp. KSM-635 namenjena detergentima pojavila na tržištu pod komercijalnim nazivom Biotex.¹⁵ Budući da je u pitanju endoglukanaza, ovaj enzim je uspešno hidrolizovao amorfne regije celuloze u unutrašnjosti tkanine, te se njegov uticaj pre svega ogledao u uklanjanju nečistoća. Ubrzo su se pojavili i drugi enzimi koji su posedovali sposobnost razgradnje i kristalnih oblika glukoze, pa su se njihovim dejstvom pored uklanjanja nečistoće, ostvarivali i već pomenuti efekti omekšavanja

tkanine i osvežavanja boje. Jedan od takvih enzima bila je celulaza iz *Humicola insolens* DSM 1800 koju je proizveo Novozymes pod komercijalnim nazivom Celluzyme™. Ista kompanija je u međuvremenu proširila svoju paletu proizvoda i serijom proizvoda Carezyme® (iz *Aspergillus* sp.) i Celluclean® (iz *Bacillus* sp.). Druge komercijalne celulaze za ovu namenu dostupne su pod nazivima Puradex® (Genencor, Palo Alto, CA) i KAC-500(B)™ (Kao Corporation).

2.5.3. Primena mananaza u detergentima

U poslednjih desetak godina-detergentima počinju da se dodaju i mananaze. Ovi enzimski preparati namenjeni industriji detergenata pojavljuju se oko 2000. godine, i predstavljaju poslednju inovaciju u pogledu primene enzima na ovom polju. Mananaze hidrolizuju β -1,4 glikozidnu vezu u molekulima manana- složenih ugljenohidrata sastavljenih od lanaca manoze i bočnih ugljenohidratnih ostataka galaktoze (tzv. galaktomanana). Ova jedinjenja su poznata kao gume, i dodaju se velikom broju prehrambenih proizvoda kao zgušnjavajući agensi i stabilizatori. Najpoznatija jedinjenja ove vrste se dodaju kao guar guma (pod oznakom E412) i guma iz semena rogača (E410) i sastavni su deo mnogih sladoleda, gotovih soseva, sireva i proizvoda za higijenu. Zbog velikog broja hidroksilnih grupa imaju veliku sklonost ka stvaranju vodoničnih veza pa se izrazito jako vezuju za vlakna pamuka stvarajući mrlje koje je teško ukloniti. Trenutno je na tržištu prisutno nekoliko enzimskih preparata ovog tipa, a reč je u glavnom o enzimima poreklom iz *Bacillus* spp. Prva mananaza komercijalizovana u ove svrhe je proizvedena ekspresijom gena za ovaj enzim iz alkalofilnog *Bacillus* sp. I633 u domaćinu *Bacillus licheniformis*. Ovaj enzim veličine 33 kDa (pI 4,7) koji pokazuje optimalnu aktivnost na 50 °C i pri pH 6-8, razvijen je od strane kompanije Novozymes i dobio je komercijalni naziv Mannaway. Prvi put je primenjen u tečnom detergentu Ariel 2000. godine.¹⁴ Genencore je proizvođač Purabrite i Mannastar iz takođe iz *Bacillus* spp.



Slika 2.11. Struktura manana

2.5.4. Primena drugih enzima u detergentima

Pored navedenih, pretpostavka je da će se u bliskoj budućnosti i druge hidrolaze uključivati u formulacije detergenata kako bi se povećala efikasnost čišćenja pri očekivanim sve kompaktnijim formulacijama, koje su efikasne i pri smanjenoj količini vode kao ograničenom resursu, niskim temperaturama i kraćim ciklusima pranja sa ciljem što veće uštede energije. Mnoge hidrolaze se već ispituju od strane proizvođača detergenata/enzima kako bi se proširio opseg nečistoća koje je moguće ukloniti njihovom primenom kao aditiva u detergentima. Tako je primera radi, 2010. godine Novozymes lansirao na tržište Xpect[®], pektinazu namenjenu detergentima, čiji dodatak ima za cilj pospešivanje uklanjanja mrlja od voća već i pri 20 °C.¹⁶

Pored hidrolitičkih enzima, očekuje se da će u bliskoj budućnosti oksidaze pronaći primenu u detergentima čijom upotrebom bi se delimično izmenili do sada primenjivani oksidacioni agensi. Cilj enzimskog izbeljivanja bi bio dodatno smanjenje temperature pranja i smanjenje negativnog uticaja na strukturu vlakana koji savremeni

izbeljivači izazivaju. Za sada su različite peroksidaze i lakaze ispitivane sa aspekta uklanjanja mrlja na laboratorijskom nivou, ali još uvek nisu našle komercijalnu primenu. Razlog tome leži pre svega i u njihovoj neekonomičnoj proizvodnji pošto je reč uglavnom o intracelularnim enzimima.

Pored uključivanja novih tipova enzima u formulacije detergenata, optimizacijom proizvodnje već korišćenih enzima, očekuje se smanjenje njihove cene te posledično i sve veća primena u detergentima.

Potraga za producentima enzima sve boljih svojstava za ovu namenu je predmet brojnih istraživanja. Ekstremofilni mikroorganizmi su sa tog aspekta veoma interesantni jer se očekuje da i enzimi koje produkuju budu stabilni. Sa druge strane sve bolje poznavanje tehnika kojima se određuje struktura enzima, kao i gena kojim je kodirana njegova biosinteza, omogućava dalje modifikacije nativnih formi enzima metodama genetskog inženjerstva, kojima se dobijaju enzimi izmenjene strukture u specifičnim regijama i koji pokazuju bolja svojstva za ovu namenu. Varijante enzima povećane oksidativne stabilnosti, smanjenog alergijskog potencijala, uticaja jona/tvrdoće vode, izmenjene specifičnosti za supstrat su predmet brojnih patenata.

3. Lipaze

Lipaze (E.C. 3.1.1.3.) su enzimi koji katalizuju hidrolizu triglicerida do slobodnih masnih kiselina, di-, monoglicerida i glicerola. Iako su prirodni supstrati lipaza trigliceridi, lipaze mogu da katalizuju hidrolizu velikog broja različitih estara karboksilnih kiselina od najjednostavnijih estara monohidroksilnih alkohola preko estara sorbitola i ugljenih hidrata do tricikličnih acetata. Zahvaljujući aktivnosti lipaze u velikom broju reakcija, njihovoj jedinstvenoj strukturi i mehanizmu reakcije, one su jedne od najviše proučavanih enzima u literaturi.¹⁷ Poznavanje sve većeg broja mikrobnih producenata lipaza, strukture i fizioloških svojstava enzima koje proizvode raste rapidnom stopom. Ovakvo uporedno sagledavanje primarne strukture enzima i njegovih osnovnih bioloških karakteristika poslužilo je kao baza za uvođenje savremene klasifikacije lipaza koja razlikuje osam familija ovih enzima pri čemu se najveća podgrupa može podeliti na sedam podfamilija. Ovo grupisanje lipaza dalo je naučnicima mogućnost da predvide važne strukturne odlike enzima, mehanizme sekrecije i osnovne biohemijske karakteristike.¹⁸

Kako je osnovna biološka funkcija lipaza da potpomognu razgradnju masti u prirodi, one su široko rasprostranjene među različitim formama živih organizama. Ovi enzimi tako potiču iz raznih životinjskih, biljnih i mikrobnih izvora. Iako je karakteristična hidrolitička reakcija ista, njihova se svojstva (specifičnost, temperaturni i pH profili) razlikuju u zavisnosti od porekla. Generalno, lipaze biljnog i životinjskog porekla najaktivnije su u slabo alkalnoj oblasti (pH od 8 do 9), dok aktivnost mikrobnih lipaza varira u širokom opsegu (3-12), posebno među ekstremofilnim mikroorganizmima. Temperaturni optimum mikrobnih lipaza se uglavnom kreće u opsegu 30-60 °C, iako i tu mogu postojati značajna odstupanja. Primera radi, optimalna temperatura *Bacillus sphaericus* MTCC iznosi svega 15 °C, dok pojedinih *Pseudomonas* sp. i *Pyrococcus* sp. iznosi preko 90 °C.^{19,20}

Za ispoljavanje katalitičke aktivnosti lipaze ne zahtevaju prisustvo kofaktora, ali divalentni katjoni, kao što je kalcijum, obično imaju pozitivan uticaj. Nasuprot tome,

teški metali kao što su joni Co^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} i Sn^{2+} značajno, a Zn^{2+} i Mg^{2+} blago inhibiraju katalitičku aktivnost lipaze.²¹

Katalitičko dejstvo lipaza nije ograničeno samo na vodenu sredinu kao jedini reakcioni medijum. Otkriće da lipaze mogu biti aktivne u skoro anhidrovanim organskim rastvaračima, znatno je proširilo opseg reakcija koje se mogu izvesti biokatalizom.²²

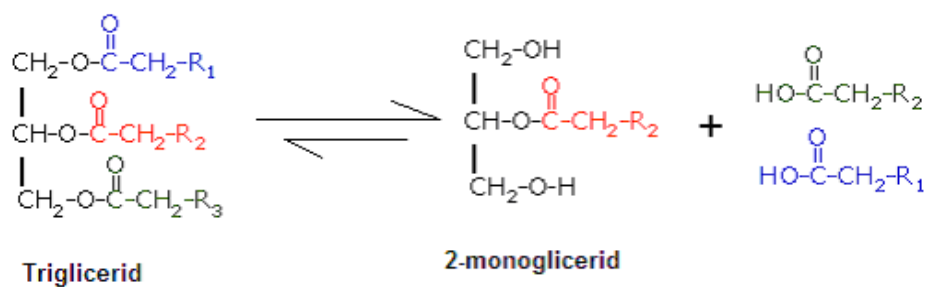
Za primenu u industriji najznačajnije su bakterijske lipaze kao i one iz gljiva i kvasaca. U prehrambenoj industriji prednost se daje lipazama iz plesni i kvasaca jer se one uopšteno smatraju bezbednim.

Prednosti primene lipaza kao katalizatora u velikom broju reakcija su: blagi reakcioni uslovi, usmerenost reakcije, znatno manji troškovi za energiju i dobijanje proizvoda boljeg kvaliteta i u većem prinosu sa znatno manjim zagađivanjem životne okoline.

Svetske potrebe za proizvodima koji se mogu proizvesti „prirodnim“ enzimskim putem su sve veće. Pored očiglednih prednosti i znatno većih mogućnosti, primena lipaza u industriji ne prati dostignuća naučnih istraživanja i otkrića. Osnovni razlozi su nedovoljna aktivnost i stabilnost lipaza, visina cene i neekonomičan način njihove primene. Imobilizacijom enzima na materije nerastvorne u vodi omogućava se njihova ponovna upotreba i otklanjaju se u velikom broju uzroci koji su smetnja za njihovu široku primenu u industriji.¹³

3.1. Biohemijske reakcije katalizovane lipazama

Lipaze katalizuju reakciju hidrolize triglicerida pri čemu kao produkti nastaju slobodne masne kiseline, digliceridi i monogliceridi. Kako je reakcija hidrolize reverzibilna reakcija, moguće je menjati smer reakcije u pravcu sinteze estera modifikacijom reakcionih uslova.



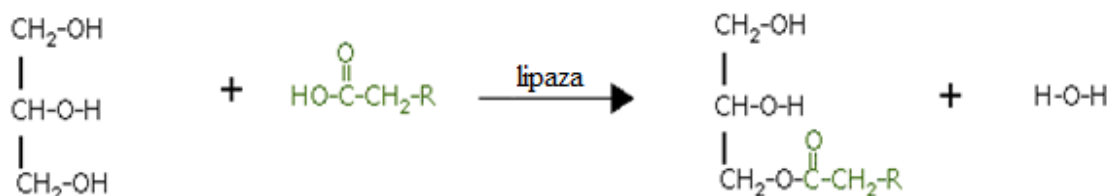
Slika 3.1. Hidroliza triglicerida pod dejstvom 1,3-poziciono specifičnih lipaza

Molekul glicerola kao osnovni gradivni blok osnovnog supstrata lipaza-triglicerida, sadrži dve primarne i jednu sekundarnu hidroksilnu grupu. Mikrobne lipaze se na osnovu njihove pozicione specifičnosti mogu svrstati u dve grupe. Prvu grupu čine poziciono nespecifične lipaze koje ne pokazuju specifičnost ni u pogledu pozicije na molekulu glicerola, ni u pogledu hemijske strukture masne kiseline. Rezultat ovakve nespecifičnosti je potpuna razgranja triglicerida do glicerola i slobodnih masnih kiselina. Drugu grupu lipaza čine 1,3-specifične lipaze koje katalizuju samo hidrolizu primarnih estarskih veza, odnosno veza na C₁ i C₃ atomima glicerola.²³

Međutim, većina autora se slaže da je teško strogo podeliti lipaze na ove dve grupe zbog neenzimskog premeštanja acil grupa iz β- u α-položaj u molekulu triglicerida. Naime, specifičnost lipaza se može kretati od stroge specifičnosti preko vrlo slabe specifičnosti do potpune nespecifičnosti.¹⁷

Konvecionalni hemijski proces hidrolize masti u cilju dobijanja glicerola, masnih kiselina i sapuna zahteva oštre uslove u pogledu temperature i pritiska (170-240 °C, 1.2-5 MPa). Ova reakcija se može odigravati u kiseloj sredini uz prisustvo sumporne kiseline, ili u neutralnoj sredini uz prisustvo neorganskih katalizatora (cink-oksidi, magnezijum-oksidi, kalcijum-oksidi). Ovakvi uslovi neizbežno stvaraju neželjene sporedne efekte, kao što su promena boje i degradacija nekih masnih kiselina, posebno polinezasićenih masnih kiselina koja imaju važnu nutritivnu vrednost i vrlo korisne primene. Iako je se enzimaska hidroliza odvija pod znatno blažim uslovima, uz manje utroške energije i visoku efikasnost koja obezbeđuje visoku čistoću proizvoda, usled visoke cene lipaza, dužine trajanja procesa i malih kapaciteta, enzimski bazirane tehnologije mogu konkurisati hemijskim procesima samo u specijalnim slučajevima.

Kako je hidroliza masti reverzibilna reakcija koja se odvija preko nastajanja di- i monoglicerida do slobodnih masnih kiselina, ukoliko se ne odvodi nastali glicerol, ili ako voda nije u velikom višku uspostavlja se ravnoteža između reakcije hidrolize i povratne reakcije tj. esterifikacije. Favorizovanje ove reakcije se postiže uklanjanjem vode i velikim viškom alkohola.



Slika 3.2. Sintaza estara katalizovana lipazom

Razlikujemo više tipova sintetičkih reakcija, od jednostavnih sinteza estara iz glicerola i masnih kiselina do biološki mnogo važnijih reakcija u kojima nastaju različiti tipovi važnih estarskih jedinjenja. Tako, u reakcijama masnih kiselina sa primarnim i sekundarnim alkoholima i polihidroksilnim jedinjenjima katalizovanim lipazom mogu se dobiti različiti tipovi korisnih estara. Ovo svojstvo nalazi sve veću primenu u sintezi različitih komponenata kozmetičke i prehrambene industrije. Tako se enzimskom sintezom estara katalizovanoj lipazom mogu dobiti različite mirisne arome poput terpenskih alkoholnih estara, ali i različiti šećerni estri koji dobijaju sve veći značaj kao netoksični i biodegradibilni emulgatori kojima se čak pripisuju i antimikrobna i antitumorska svojstva.²⁴⁻³⁰

Lipaze katalizuju i brojne reakcije u kojima dolazi do izmene acil grupe-čime se proširuje opseg korisnih visoko vrednih proizvoda koji se mogu dobiti enzimskim putem. Transesterifikacija podrazumeva transfer acil grupe, i u zavisnosti od akceptora acil grupe, razlikujemo četiri tipa hemijske reakcije transesterifikacije:

1. Alkoholiza



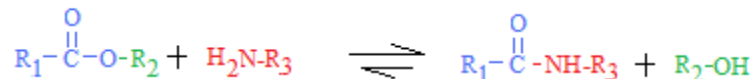
2. Acidoliza



3. Interesterifikacija



4. Aminoliza



Zahvaljujući ovom svojstvu lipaza, one nalaze sve veću primenu u sintezi tzv. „strukturnih lipida“. Tako, rafinacijom jeftinih i široko dostupnih biljnih masnoća je moguće dobiti zamene za specijalne trigliceride pod značajno superiornijim uslovima u odnosu na alternativnu hemijsku transesterifikaciju.

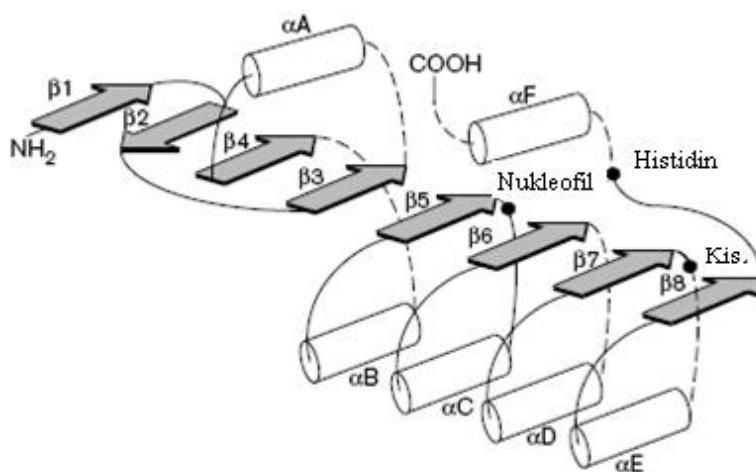
3.2. Struktura i mehanizam delovanja lipaza

Razvoj savremenih fizičko-hemijskih metoda pomoću kojih je određena trodimenzionalna struktura velikog broja lipaza omogućio je bolje razumevanje njihovog specifičnog katalitičkog mehanizma delovanja koje ih odvaja od srodnih esteraza. Naime, prve kinetičke studije utvrdile su da priroda i veličina granične površine među fazama sistema u mnogome određuju aktivnost lipaza.

Lipaza iz *Rhizomucor miehei* i pankreasna lipaza su bili prvi enzimi ovog tipa čije su trodimenzionalne strukture određene 1990. godine. Od tada, su ustanovljene strukture velikog broja mikrobnih lipaza sekvencioniranjem samih proteina ili gena koji kodiraju njihovu biosintezu.³¹ Komparativna analiza poznatih struktura lipaza je pokazala da se aktivni centar ovog enzima nalazi u unutrašnjosti molekula i da je zaklonjen peptidnim lancem. Molekuli supstrata ne mogu da stupe u kontakt sa aktivnim centrom enzima u ovom slučaju, zbog čega su lipaze prilično inertne u vodenim rastvorima. Kada se lipaza adsorbuje na graničnoj površini između vodene i nepolarne faze, dolazi do promene prostornog rasporeda molekula usled pomeranja hidrofobnih delova peptidnog lanca ka nepolarnoj fazi. Molekul lipaze zauzima tzv. „otvorenu konformaciju“ pri kojoj je aktivni centar postaje dostupan molekulima supstrata i omogućava se stvaranje kompleksa enzim-supstrat.¹⁷

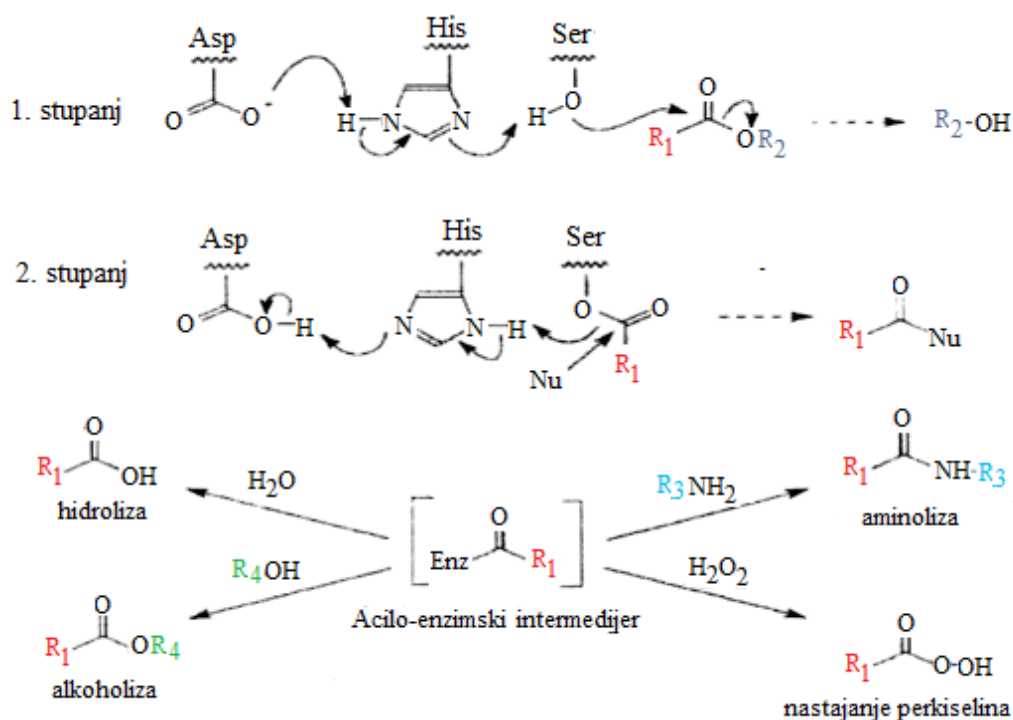
Tačna lokacija i primarna struktura peptidnog lanca koji zaklanja aktivni centar zavisi od porekla lipaze i njegova dužina i kompleksnost se povećavaju sa povećanjem molekula lipaze. Međutim, ni postojanje poklopca, ni pojava površinske aktivacije nisu strogi preduslovi za svrstavanje enzima u ovu familiju. Ipak, veliki broj studija ide u prilog pretpostavci da poklopac ima važnu ulogu moduliranju ne samo aktivnosti lipaze, već i njene specifičnosti, enantioselektivnosti i stabilnosti.³²⁻³⁵

Iako veličina lipaza varira opsegu od 20 kDa (lipaza iz *Bacillus subtilis*) do 60 kDa (lipaza iz *Geotrichum candidum*), sve poznate lipaze pokazuju istu karakterističnu strukturu poznatu kao struktura α/β -hidrolaza.³⁶



Slika 3.3. Sekundarna struktura α/β -hidrolaza³⁷

Samo jezgro enzima čini do 8 različitih paralelnih β -nabranih ploča (samo je $\beta 2$ ploča antiparalelna) koju povezuje do 6 α -heliksa. Aktivni centar čini katalitička trijada sastavljena od ostataka serina, asparaginske (ili glutaminske) kiseline i histidina uz par aminokiselina čija je funkcija da stabilizuju oksianjonske intermedijare koji nastaju u toku reakcije. Ostatak serina koji je nosilac enzimske aktivnosti je pri tome lociran na C-terminalnom kraju $\beta 5$ nabrane ploče u okviru visoko konzervirane sekvence Gly-X-Ser-X-Gly nazvanom „nukleofilni lakat“. Ostatak asparaginske (ili glutaminske) kiseline koji takođe sačinjava aktivni centar enzima se najčešće nalazi iza $\beta 7$ nabrane ploče, dok položaj histidina varira od dužine i konformacije samog enzima. Ipak, prostorni raspored ostataka histidina je takav da vodoničnim vezama koje ostvaruje sa ostacima katalitičkog serina i ostacima karboksilne grupe neke od kiselina glutamina ili asparagina omogućava nukleofilni napad serina na karbonilnu grupu molekula supstrata. Sama reakcija hidrolize odvija se u dva stupnja.³¹



Slika 3.4. Mehanizam delovanja serinskih hidrolaza³⁸

U prvom stupnju, reakcija hidrolize započinje nukleofilnim napadom kiseonika katalitičkog serina na karbonilni ugljenikov atom supstrata koji dovodi do stvaranja tetraedarskog intermedijera stabilizovanog vodoničnim vezama sa azotom na susednim

aminokiselinama. Konsekventno, dolazi do otpuštanja molekula alkohola kao prvog proizvoda reakcije. U drugom stupnju reakcije, molekul vode vrši nukleofilni napad na novoformirani acilo-enzimski kompleks čijom hidrolizom dolazi do otpuštanja karboksilne kiseline kao drugog proizvoda reakcije i regeneracije enzima. U zavisnosti od medijuma u kojem se odvija reakcija (vodeni rastvor ili organski rastvarač) i drugi nukleofili mogu zameniti vodu u reakciji sa aciloenzimskim intermedijerom čime se mogu ostvariti brojne korisne transformacije. Tako, ukoliko bi to bio molekul nekog alkohola ili drugog estera, došlo bi do odigravanja reakcije transesterifikacije. Formirani acilo-enzimski kompleks može reagovati i sa aminima pri čemu bi došlo do odigravanja reakcije aminolize estera i nastajanja odgovarajućih amida.

Afinitet enzima prema supstratu u velikoj meri zavisi od oblika aktivnog centra enzima koji određuje strukturni prostor za vezivanje supstrata.³⁹ Specifičnost mikrobnih lipaza u odnosu na različite supstrate se obično izražava kao relativna brzina hidrolize jednog triglicerida prema broju ugljenikovih atoma masne kiseline koja je u njegovom sastavu. Međutim, na ovu brzinu ne utiče samo struktura enzima već i hemijska priroda supstrata kao i brojni fizički faktori kao što su: čvrsto ili tečno stanje supstrata, veličina emulgovanih čestica, rastvorljivost u vodi u slučaju triglicerida sa malim brojem C-atoma. Afinitet enzima prema supstratima najčešće nije striktan.

Većina lipaza katalizuje hidrolizu estera zasićenih masnih kiselina srednjeg broja ugljenikovih atoma (od C₄) do lanaca dužine C₁₆. Izvesni izuzeci postoje, pa tako, primera radi, pankreasna i *Penicillium roquefortii* imaju izražen afinitet prema esterima masnih kiselina kratkog lanca. Ponekad isti mikroorganizam proizvodi više različitih izoformi enzima koji se mogu razlikovati i po specifičnosti koju pokazuju u odnosu na različite supstrate. Jedan od takvih primera su i lipaze poreklom iz *Candida rugosa*. Dok izoforma označena kao CRL1 ima najveći afinitet prema masnim kiselinama srednje dužine (C₈–C₁₀), CRL2 i CRL4 najbrže hidrolizuju estere masnih kiselina dugog lanca (C₁₆–C₁₈).⁴⁰ Četvrta izoforma CRL3 je specifična prema masnim kiselinama kratkog lanca. Ipak, lipaza koju proizvodi *Geotrichum candidum* je pokazala veliku specifičnost prema estarskim vezama određenog tipa masnih kiselina. Specifičnost prema supstratu ovog enzima proučavali su Alford, Jensen i Franzke, koji su pokazali da je ova lipaza strogo specifična prema masnim kiselinama koje sadrže *cis* dvostruku

vezu u položaju C₉.⁴¹ Zasićene masne kiseline dugog lanca, kao i nezasićene masne kiseline bez dvostruke veze u položaju C₉, se slabo oslobađaju iz estara pomoću ove lipaze. Osim položaja, i konformacija dvostruke veze nezasićenih masnih kiselina može igrati značajnu ulogu u sternim efektima koji omogućavaju/onemogućavaju odigravanje reakcije. Tako, lipaze iz *C. rugosa* i *R. miehei* imaju mnogo veći afinitet prema oleinskoj kiselini naspram njenog *trans* izomera, dok *C. antarctica* lipaza pokazuje suprotan obrazac ponašanja.⁴²

Sa druge strane, lipaze pokazuju specifičnost i prema različitim alkoholima koji grade estarsku vezu. Primera radi, strukturni oblik supstrat vezujućih mesta izoenzimskih formi lipaza iz *Candida antarctica* (*C. antarctica* lipaze A i B (CaLA i CaLB) otkriva razlog njihovih različitih afiniteta prema supstratu. Dok CaLA lipaza ima ograničeni prostor u vidu uskog tunela za smeštanje masne kiseline i mnogo širi deo za prihvatanje alkoholnog dela što omogućava reakcije derivata velikih i razgranatih alkohola, CaLB lipaza ima mnogo veći prostor za masnu kiselinu i manji za alkohol.³⁹

Veličina i položaj supstrat vezujućih mesta određuje i bitna svojstva lipaza kao što su poziciona i enantioselektivnost. Osim razlike u veličini žljebova na ova svojstva bitno utiču i njihova hidrofobnost/hidrofilnost.⁴³ Stereospecifičnost ili enantioselektivnost je sposobnost enzima da deluju kao selektivni katalizatori koji prave razliku među enantiomerima tako što reaguju samo sa jednim optičkim izomerom. U ovako katalizovanim reakcijama nastaje čist optički aktivan proizvod. Na ovaj način, lipaze su omogućile čistiju proizvodnju različitih farmaceutika, od nesteroidnih antiinflamatornih lekova do blokatora, antibiotika i citostatika.⁴⁴⁻⁴⁷

Treba imati u vidu da konformacija enzima u rastvoru zavisi od uslova sredine, naročito u pogledu položaja poklopca koji zaklanja aktivni centar. Shodno tome, otvorenost poklopca će takođe uticati na dostupnost enzima supstratima različitih veličina. Ova zavisnost položaja poklopca i aktivnosti je veoma složena i uključuje interakcije sa molekulima supstrata i ravnotežu između aktivnih i neaktivnih enzimskih formi.

Smatra se da struktura poklopca u mnogome određuje i druge tipove osobenih specifičnosti prema supstratima lipaza poput specifičnosti za hidrolizu parcijalnih

glicerida i fosfolipazne aktivnosti. Naime, dok većina lipaza hidrolizuje kako trigliceride, tako i parcijalne gliceride, postoje enzimi koji strogo reaguju sa mono i digliceridima. Tako, lipaza koju produkuje *P. cyclopium* vrsta neuporedivo brže hidrolizuje monogliceride, a zatim digliceride, nego trigliceride i ova vrsta lipaza opisana je kao hidrolaza parcijalnih glicerida.⁴⁸ Ovakvu osobinu pokazuju i lipaze iz *Penicillium camemberti*, *Aspergillus oryzae*, *Malassezia globosa* i *Bacillus* sp. H257. Danas su poznate i strukture ovih enzima koje delom otkrivaju razlog ove osobenosti iako sam mehanizam još uvek nije u potpunosti razjašnjen. Naime, kristalografske studije su pokazale da se kod ovakvih enzima u neposrednoj blizini aktivnog centra uočavaju dve glomazne hidrofobne aminokiseline koje ograničavaju pristup triglicerida enzimu. Uz to, kod ovih enzima je utvrđena i nesvakidašnja struktura regije poklopca koja svojim specifičnim oblikom ograničava prostor za vezivanje supstrata i deluje kao sterna prepreka vezivanju triglicerida.^{49,50}

3.3. Primena lipaza u industriji

3.3.1. Primena lipaza u prehrambenoj industriji

Primena lipaza u prehrambenoj industriji se prvenstveno zasniva na proizvodnji strukturnih lipida u industriji jestivih ulja i margarina shodno njihovoj fiziološkoj ulozi. Zahvaljujući saznanjima da se fizička svojstva prirodnih masti mogu menjati intra- i transesterifikacijom, lipaze nalaze sve veću primenu u proizvodnji proizvoda poput specijalnih margarina, putera i preliva za salate, polako potiskujući termički zahtevne i neselektivne hemijske postupke, koji dovode do nasumičnog stvaranja proizvoda nezadovoljavajućeg kvaliteta i čistoće.

Ovom reakcijom se u industrijskim uslovima dobijaju ekvivalenti kakao butera, lipidi sa željenim sadržajem polinezasićenih masnih kiselina i trigliceridi niže kalorijske vrednosti. Kakao buter ima visok sadržaj stearinske kiseline, usled čega ima jedinstvenu tačku topljenja koja je vrlo bliska temperaturi ljudskog tela. Ova osobina ga čini vrlo atraktivnim za primenu u proizvodnji čokolade jer izaziva rashladni efekat, a pored toga poboljšava glazuru i konzistenciju finalnog proizvoda. Lipaze se danas koriste u

komercijalnim postupcima za interesterifikovanje palminog ulja u ekvivalent kakao butera, koji se primenjuje u ne samo u prehrambenoj, već i u kozmetičkoj i tekstilnoj industriji. U komercijalnoj proizvodnji se koristi lipaza iz *Mucor miehei* koja se izdvaja precipitacijom acetonom i nakon toga imobilize na neorganski nosač jonskom izmenom.^{31,36}

U proizvodnji margarina, odgovarajući sastav i odnos palmitinske i laurinske kiseline koji obezbeđuje dobru mazivost i poželjnu β' kristalnu strukturu čvrste faze margarina se može ostvariti enzimski katalizovanom reakcijom koja usled brojnih prednosti može potisnuti trenutno dominantan hemijski postupak. Između ostalog, tradicionalan postupak hidrogenizovanja biljnih ulja dovodi do stvaranja *trans* masnih kiselina čije se prisustvo u ishrani vezuje za brojna oboljenja. Dalje, uvođenjem polinezasićenih masnih kiselina povećava se funkcionalna vrednost ovih proizvoda, odnosno smanjuje se negativan uticaj na ljudsko zdravlje pripisan visokom sadržaju zasićenih masnih kiselina. Primenom termostabilnih lipaza, ovakva reakcija se može odigravati na temperaturama većim od temperature topljenja masnoća, te se može izbeći primena organskih rastvarača, što dalje pojednostavljuje i pojeftinjuje proces, i olakšava postupak dobijanja čistog proizvoda.⁵¹

Pored toga, lipaze se primenjuju i u mlečnoj industriji gde je njihovo katalitičko dejstvo usmereno ka ostvarivanju karakteristične arome različitih mlečnih proizvoda kojoj značajno doprinose izvesne slobodne masne kiseline oslobođene iz mlečnih masti.²² Dosadašnja upotreba lipaza u mlečnoj industriji odnosi se na poboljšanje organoleptičkih osobina različitih sireva, ubrzavanje procesa zrenja sireva, proizvodnja različitih mlečnih proizvoda i lipolizu mlečne masti i pavlake. Dodatkom lipaze, prvenstveno se oslobađaju masne kiseline kratkog lanca (C_4 i C_6) što dovodi do razvijanja oštrog ukusa, a oslobađanjem masnih kiselina srednje dužine lanca (C_{12} i C_{14}) sirevi dobijaju odgovarajuću teksturu. Oslobođene masne kiseline dalje imaju ulogu u stvaranju drugih aromatičnih jedinjenja, kao što su: β -keto kiseline, metil ketoni, različiti estri, i laktoni. U skorije vreme širok spektar lipaza se koristi u mlečnoj industriji: *Rhizopus miehei*, *Aspergillus niger* i *A. oryzae*.⁴⁸ Modifikacijom kravljeg mleka posredstvom lipaza se na ovaj način dobijaju sirevi senzornih osobina sličnih sirevima od ovčijeg ili kozijeg mleka.⁵²

Lipaze se koriste i u pekarskoj industriji gde se njihovim dejstvom istovremeno povećava voluminoznost pekarskih proizvoda i delimično ili potpuno zamenjuju emulgatori.^{36,53}

Zahvaljujući sposobnost lipaza da katalizuju reakciju transesterifikacije polako se osvajaju nove tehnologije njihove primene u proizvodnji funkcionalne hrane-hrane koja osim nutritivne vrednosti utiče pozitivno na različite aspekte ljudskog zdravlja.

Primena lipaza je našla industrijsku primenu u proizvodnji mlečnih formula za bebe-BetapolTM i InFatTM, budući da masnokiselinski sastav masti humanog mleka igra krucijalnu ulogu u njegovoj svarljivosti i intestinalnoj apsorpciji kod odojčadi. Za razliku od kravljeg mleka i biljnih ulja, humano mleko sadrži zasićene masne kiseline na *sn-2* poziciji (pre svega palmitinsku) i nezasićene masne kiseline na pozicijama *sn-1,3*. Stoga, njegovom digestijom posredstvom pankreasne *sn-1,3* specifične lipaze ne dolazi do stvaranja slabo rastvornih kalcijumovih soli zasićenih masnih kiselina koji bi otežavali apsorpciju kalcijuma i masnih kiselina. To je jedan od razloga iz kojih je neophodno približiti sastav mlečnih formula humanom mleku. Obe komercijalno dobijene formule supstituenata masti humanog mleka su dobijene acidolizom masti koje pretežno sadrže esterifikovanu palmitinsku kiselinu na poziciji *sn-2* (poput čvrste frakcije palminog ulja ili tripalmitina) sa mešavinom slobodnih masnih kiselina sa velikim udelom oleinske kiseline pomoću *sn-1,3* specifičnih lipaza poput *Rhizomucor miehei* i *Rhizopus oryzae*.⁵⁴

Pored alteracije lipidnog profila sa ciljem da se sastav supstituenata približi sastavu prirodnih masnoća, lipaze nalaze sve veću primenu u sintezi potpuno novih sintetskih farmakoloških agenasa, poput estara masnih kiselina i antioksidanasa. Postoje naučni dokazi da prekomerena proizvodnja slobodnih radikala u organizmu kao posledica aerobnog metabolizma sa jedne strane, i neravnoteža između njihove koncentracije i koncentracije antioksidanasa koji sprečavaju neželjene oksidacije sa druge, može biti povezano sa procesima kao što su starenje, kao i sa raznim bolestima poput raka, dijabetesa, arteroskleroze, reumatoidnog artritisa i dr. Inhibitori oksidacije poput vitamina A, E i C, cinka, selen, arginina, taurina, biljnih polifenola, i enzima poput superoksid dizmutaze i katalaze sprečavaju lančane reakcije u kojima se oštećuju drugi molekuli tako što se sami oksidišu.

Acilovanje antioksidanata esterifikacijom ili transesterifikacijom proširuje njegova svojstva kako u fizičkom, tako i u biološkom smislu. Modifikacijom prirodnih antioksidanasa unapređuje se njihova hemijska, oksidativna i termalna stabilnost. Promenom hidrofilnog-lipofilnog balansa (HLB) novonastala jedinjenja postaju rastvorljivija u mastima što posledično unapređuje njihovu bioraspoloživost. Tako ovi derivati, ne samo da deluju kao konzervansi, već imaju svoju nutritivnu važnost kao komponente funkcionalne hrane.

Iako još nisu u potpunosti zaživeli u industriji, istraživačka i patentna literatura je prepoznala lipaze kao atraktivne biokatalizatore za dobijanje estara vitamina C i E, kao i pojedinih biljnih polifenola.^{51,55,56}

3.3.2. *Proizvodnja optički aktivnih jedinjenja*

Zahvaljujući jedinstvenoj osobini stereoselektivnosti lipaza, one predstavljaju veliki potencijal za proizvodnju hiralnih organskih jedinjenja. Razdvajanje racemskih smeša katalizovano lipazom se odvija putem asimetrične hidrolize odgovarajućih estara, dok se u nevodenom medijumu ovaj pristup može proširiti na stereospecifične (trans)esterifikacione reakcije.

Na ovaj način, dobijaju se optički aktivna jedinjenja, važni intermedijari u sintezi farmaceutskih i poljoprivrednih proizvoda. Npr. (*S*)-2-halopropionska kiselina je intermedijar u proizvodnji (*R*)-2-fenoksipropionske kiseline, koja je efikasan herbicid. Za ovu namenu, svinjska pankreasna lipaza ima najbolju kombinaciju aktivnosti, selektivnosti i cene u odnosu na druge enzime.⁴⁸

Za farmaceutsku industriju su važne sinteze raznih hiralnih lekova, kao što su α -blokatori, dobijeni pomoću lipaza iz *Pseudomonas cepacia* ili različita jedinjenja epihlorhidrina.²² I druge lipaze pokazuju veliki potencijal za primenu u proizvodnji lekova i njihovih prekursora. Tako na primer, (*S*)-izomer ketoprofena poseduje najveći deo antiinflamatorne aktivnosti, dok (*R*)-izomer deluje kao toksin u gastro interstinalnom traktu, pa je njihovo razdvajanje od izuzetne važnosti. *Acinetobacter* sp. i *Candida rugosa* lipaze su pokazale kapacitet za enantioselektivnu hidrolizu (*R,S*)-ketoprofen etil estra do optički čistog fiziološki aktivnog jedinjenja.^{46,57,58} *Candida*

antarctica lipaza B se može primeniti za racemsku hidrolizu i razdvajanje estara sintetskih aminokiselina poput D,L-fenilglicin metil estera. Asimetričnom hidrolizom ovog jedinjenja omogućeno je jednostavno razdvajanje D i L forme fenilglicina koji mogu poslužiti kao prekursori sintetskih antibiotika (D forma) ili inhibitora HIV proteaza (L forma).⁴⁷

Potencijalna primena lipaza za razdvajanje hirala jedinjenja je enantioselektivna hidroliza estara epoksi alkohola ili epoksi kiselina. Estri glicidola služe za dobijanje β -blokatora i srodnih jedinjenja (blokatora kalcijumovih kanala) koja se koriste za lečenje hipertenzije ili angine pektoris. Primera radi, lipaze iz *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* i *Pseudomonas putida* su pokazala izuzetna svojstva u pogledu stereospecifične hidrolize *trans*-3-(4-metoksifenil) metil estera glicidine kiseline kojom se dobija optički čist prekursor kardiovaskularnog leka Diltiazem.⁴⁴

Pored brojnih prednosti, razdvajanje racemskih smeša posredstvom lipaza ima i ograničenja. Enzimi mogu vršiti samo transformacije onih jedinjenja koja predstavljaju njihove supstrate, pa se stoga još uvek takmiče sa alternativnim hemijskim metodama. Metod izbora će zavisiti od prirode jedinjenja koje treba razdvojiti, ekonomske opravdanosti procesa i zahteva za stepenom čistoće dobijenog enantiomera.

3.3.3. Sintaza površinski aktivnih materija

Površinski aktivne materije su amfipatični molekuli sa hidrofobnim i hidrofilnim udelom. Zahvaljujući ovoj strukturnoj karakteristici primenjuju se za: smanjenje površinskog napona rastvora, rastvaranje i disperziju inače nerastvorljivih supstanci, kao i za redukovanje penušanja vodenih rastvora. Oni čine važnu klasu industrijskih hemijskih jedinjenja, široko primenljivih u skoro svakom sektoru moderne industrije. Zahvaljujući svojoj amfipatičnoj strukturi, imaju veliki značaj i primenu kao emulgatori u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.

Monoacilgliceroli i njihovi derivati se koriste kao emulgatori u prehrambenoj industriji. Konvencionalni hemijski postupci za njihovo dobijanje hidrolizom masti

imaju značajnih nedostataka jer se odvijaju na visokim temperaturama i pritiscima uz korišćenje neorganskih katalizatora. Pri ovako drastičnim procesnim uslovima, obrazuju se proizvodi promenjene boje i neprijatne arome, koji se moraju naknadno prečišćavati, što dodatno poskupljuje proizvodnju. Minimiziranje troškova proizvodnje je glavni razlog razvoja enzimskih procesa za dobijanje ovih jedinjenja. Sinteza monoacilglicerola pomoću lipaza se može ostvariti enzimskom hidrolizom masti i ulja, esterifikacijom masnih kiselina i glicerola ili transesterifikacijom masti i ulja glicerolom (gliceroliza).⁵⁹ Katalizatori u ovim procesima su uglavnom 1,3-specifične lipaze. Iako enzimski postupci još uvek nisu zaživeli na industrijskom nivou, prednosti takve proizvodnje su očigledni, a veliki broj lipaza poput onih iz *Rhizopus arrhizus*, *Candida antarctica* ili *Pseudomonas fluorescens* su pokazale veliki potencijal za ovu primenu.

Estri šećera i masnih kiselina su drugi tip amfipatičnih jedinjenja koji se mogu dobiti u enzimski katalizovanim reakcijama pomoću lipaza. Ova jedinjenja se koriste kao industrijski detergents i emulgatori brojnih proizvoda prehrambene industrije. Ovi nejonski surfaktanti, bez boje i mirisa se mogu dobiti hemijskim putem, ali neselektivnost ovakvog procesa dovodi do stvaranja toksičnih nusprodukata za koje postoji i sumnja da deluju kancerogeno i/ili da imaju alergena svojstva.⁶⁰ Ipak, i enzimski sinteza estara šećera i masnih kiselina je suočena sa velikim izazovima. Naime, pravilan izbor organskog rastvarača za odvijanje ove reakcije je od ključne važnosti za efikasnu sintezu estara budući da se rastvorljivosti oba reaktanta u ovoj sintezi (šećer i masna kiselina) u velikoj meri razlikuju pa je teško ostvariti zadovoljavajuću koncentraciju reaktanata u istoj fazi. Dalje, izabrani rastvarač ne sme predstavljati opasnost za zdravlje ljudi i životnu sredinu, niti negativno uticati na enzim u pogledu aktivnosti i stabilnosti. U poslednje vreme jonske tečnosti i superkritični fluidi se nameću kao odgovarajući rastvarači za ekološki prihvatljive transformacije pomoću lipaza, među kojima je i enzimski sinteza estara šećera i masnih kiselina.⁶¹⁻⁶³

3.3.4. Primena lipaza u kozmetičkoj industriji

Dugolančani estri voskova, identični prirodnim proizvodima poreklom iz biljaka/životinja, mogu se dobiti direktnom esterifikacijom dugolančanih masnih

kiselina i masnih alkohola u nepolarnim rastvaračima, uz lipaze kao biokatalizatore. Ovi estri imaju sposobnost da održavaju vlažnost na međupovršinama stvarajući prevlaku dobre stabilnosti na vodenoj subfazi. Zbog toga su našli svoju primenu, ne samo u kozmetičkoj, već i u farmaceutskoj, zatim industriji boja i lakova i industriji maziva.^{64,65}

Unichem International je patentirao proizvodnju izopropil-miristata, izopropil-palmitata i 2-ethylheksil-palmitata upotrebom lipaze dobijene pomoću *C. rugosa* koji se koriste kao hidratanti u kozmetičkim proizvodima kao što su kreme za lice i sunčanje. Ovi proizvodi dobijeni su direktnom esterifikacijom polihidroksi masnih kiselina sa masnim alkoholima u nepolarnim rastvaračima.⁵³

Literatura pokazuje i nekoliko primera primene lipaza u sintezi parfemskih konstituenta, poput optički čistih (-)-mentol estara. *Burkholderia cepacia* se pokazala kao efikasan katalizator u sintezi mentil-metakrilata, čijom polimerizacijom nastaje sporo otpuštajuća mirisna aroma. Lipaza P (Amano) se pokazala kao efikasan katalizator u sintezi optički čistog prekusora biljnog faktora rasta mirisnih svojstava (-) metil-jasmonata.⁶⁶

3.3.5. Primena lipaza u sintezi biodizela

Biodizel je visokokvalitetno tečno biogorivo, proizvedeno iz poljoprivrednih kultura, kao obnovljivih resursa, koje sa tehničkog aspekta u potpunosti može da zameni fosilno gorivo u motorima sa unutrašnjim sagorevanjem. Njegovom upotrebom smanjuje se potreba za korišćenjem fosilnog goriva što osim pozitivnih aspekata sa ekološke tačke gledišta, umanjuje rizik nesigurnog snabdevanja naftom iz politički nestabilnih regiona sa bogatim nalazištima. Dalje, supstitucija uvoza nafte ili naftinih derivata domaćim proizvodima ima pozitivan uticaj na mikro- i makroekonomiju, te predstavlja podsticaj za otvaranje novih radnih mesta. Sa ekološkog aspekta biodizel gorivo ne zagađuje životnu sredinu, jer se pri sagorevanju ovog goriva proizvodi onoliko ugljen-dioksida koliko biljke uljarice, iz kojih je dobijeno ulje kao polazna sirovina, vezuju iz atmosfere prilikom rasta. Pored smanjenja emisije CO₂ u ukupnom bilansu, sagorevanjem ovog goriva smanjuje se emisija i drugih zagađujućih jedinjenja poput oksida azota i sumpora, benzola, toluola i sl. Hemijski gledano, biodizel predstavlja

metil estre masnih kiselina dobijenih u reakciji transesterifikacije biljnih ulja, pri čemu treba imati u vidu da se kao polazna sirovina može upotrebiti i iskorišćeno ulje iz prehrambene industrije i domaćinstava.

Iako je industrija usvojila nekoliko hemijskih postupaka za sintezu biodizela, postoje jasni razlozi za primenu enzima za ovu modifikaciju. Enzimski bazirana tehnologija omogućava snižavanje energetskog utroška, izdvajanje čistog glicerola kao nusproizvoda, kao i esterifikaciju slobodnih masnih kiselina prisutnih u uljima, tako da su zahtevi za čistoćom polaznih sirovina znatno blaži.

U dosadašnjim istraživanjima na laboratorijskom i/ili poluindustrijskom nivou, kao efikasni biokatalizatori korišćeni su intra- i ekstracelularni enzimi koje proizvode različiti mikroorganizmi poput *Burkholderia cepacia*, *Candida antarctica*, *Rhizomucor miehei*, *Thermomyces lanuginosus*, *Rhizopus oryzae*, *Pseudomonas fluorescens* i drugi.⁶⁷⁻⁷² Pored očiglednih prednosti enzimske tehnologije u proizvodnji biodizela, oni nisu u potpunosti zaživeli u industriji zbog visoke cene enzima. Da bi se ova prepreka uklonila, što bi otvorilo put primeni enzima u ovom sektoru industrije, neophodno je dalje istraživanje i razvijanje tehnika imobilizacije i/ili pronalaženje novih stabilnih enzima. Smanjenjem cene biokatalizatora, enzimski bazirana tehnologija industrijske proizvodnje biodizela bi trebalo da postane konkurentna hemijskim postupcima.

3.3.6. Primena lipaza u papirnoj i drvnoprerađivačkoj industriji

Smola je ugljovodonična sekrecija nekih biljaka koja se uglavnom sastoji od triglicerida i prirodnih voskova. Ova smeša izaziva brojne probleme sa tehničkog aspekta u proizvodnji papira. Nippon Paper Industries iz Japana, uspešno primenjuju tehnologiju hidrolize ovih jedinjenja baziranoj na primeni lipaze iz *Candida rugosa* kojom je obezbeđeno uklanjanje drvnih triglicerida i do 90%.⁵²

3.3.7. Primena lipaza u kožarskoj industriji

Lipaze se u kožarskoj industriji najviše koriste u fazi odmašćivanja koža koje sadrže umerenu količinu masnog tkiva. Konvencionalne metode tretmana sirove kože

uključuju upotrebu organskih rastvarača i surfaktanata koja dovodi do zagađenja životne sredine. Alternativa ovom postupku je dodavanje lipaza koje imaju pH optimum u alkalnoj oblasti u fazi močenja kože, obično u kombinaciji sa proteazama. Proteaze poboljšavaju efekat lipaza jer razaraju ćelijske membrane što olakšava pristup lipaza mastima. Razgradni produkti hidrolize masti imaju osobine emulgatora što dovodi do smanjenja troškova prerade kože jer se u fazi odmašćivanja ne moraju dodavati surfaktanti. Prednost upotrebe lipaza je postizanje uniformnije boje finalnog proizvoda, a unapredile su i proizvodnju hidrofobnih (vodootpornih) koža. Lipaze sa niskim pH optimumom se koriste u procesima koji se odvijaju u kiseloj sredini, kao što su neki delovi postupka prerade vune ili krzna. Kompanija Novozyme proizvodi komercijalne preparate koji sadrže kombinaciju lipaza i proteaza, kako onih sa pH optimum u kiseloj sredini (NovoCor ABL[®] i NovoCor ADL[®]), tako i alkalnih (NovoLime[®]).³⁶

3.3.8. Nove mogućnosti primene lipaza

U budućnosti lipaze bi mogle naći primenu u proizvodnji biosenzora za brzo kvantitativno određivanje triglicerida za potrebe kliničke dijagnostike. Visok nivo triglicerida u ljudskom krvotoku povezan je sa mnogim oboljenjima poput arteroskleroze i rizika od srčanog udara i šloga. Većina analitičkih metoda za određivanje lipidnog profila u krvi i serumu, iako precizna, ne omogućava jednostavno i brzo izvođenje testa i zahteva složenu pripremu uzoraka i postavljanje složene instrumentalne postavke.

Osnovni koncept primene biosenzora je upotreba lipaza za razlaganje triglicerida i određivanje nastalog glicerola ili masnih kiselina daljim hemijskim ili enzimskim metodama. Ovaj princip omogućava preciznu dijagnozu pacijenata sa kardiovaskularnim problemima.⁷³ Da bi ova tehnologija u potpunosti zaživela, dosadašnja istraživanja je neophodno unaprediti sa aspekta povećanja biološke stabilnosti, prenosa transdukcionih signala i isplativosti primene.⁷⁴

3.3.9. Lipaze u industriji detergenata

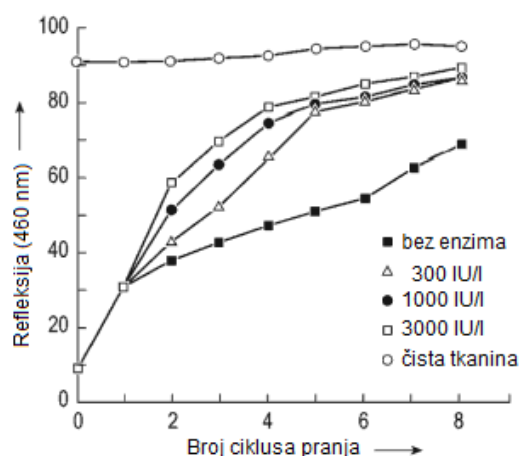
Razvoj proizvodnje enzima za primenu u detergentima odvija se u dva pravca i postoji veliki broj publikacija koje opisuju nove enzime poboljšanih svojstava za primenu u detergentima (enzimi koji su aktivni na nižim temperaturama, u prisustvu većeg broja agresivnih supstanci-posebno u prisustvu oksidujućih materija, enzimi koji su manje podložni proteolizi, enzimi koji pokazuju veliku aktivnost već u prvom ciklusu pranja i dr.). Jedan od načina podrazumeva razvoj rekombinantnih enzima čija se svojstva prilagođavaju potrebama procesa pranja. Ipak, kako najveći broj prirodnih oblika mikrobnih enzima još uvek nije ispitan, skrining mikroorganizama i ispitivanje svojstava enzima koje proizvode je i dalje jedan od osnovnih načina pronalaženja enzima za određenu namenu.

Prvi komercijalni lipolitički preparat namenjen primeni u detergentima-Lipolase[®], dobijen je tehnikom genetskog inženjeringa kako bi se enzim proizveo u dovoljnim količinama i kako bi njegovo korišćenje bilo ekonomski opravdano. Ovaj enzim je prirodno izolovan iz *Thermomyces lanuginosus* (stari naziv *Humicola lanuginosa*), a tehnikom rekombinacije gena izvršena je ekspresija gena za proizvodnju ove lipaze u domaćinu *Aspergillus oryzae*. Ovaj preparat razvio je Novo (današnji Novozymes) 1987. godine, a vodeći svetski proizvođači detergenata 90-tih godina počinju njihovo korišćenje u većoj meri.

U međuvremenu Novozymes je razvio i preparate poboljšanih karakteristika, kao što je Lipolase[®] Ultra koji je aktivan i na niskim temperaturama (ispod 20 °C). Ovaj preparat dobijen je metodama proteinskog inženjeringa tako što je negativno naelektrisana asparaginska kiselina (na položaju 96) koja se pozicionira na granici faza ulje-voda zamenjena leucinom (neutralnom, hidrofobnom aminokiselinom). Ova promena dovodi do smanjenja odbojnih elektrostatičkih sila između masne nečistoće i enzima, a hidrofobni efekti povećavaju konformacione promene na kontaktnoj površini što aktivan centar čini otvorenijim a enzim aktivnijim.

Takođe, pored aktivnosti na niskim temperaturama, javila se i potreba za enzimom koji će pokazati aktivnost već u prvom ciklusu pranja. Primena lipaza u

detergentima pokazuje efekte tek pri ponovljenim ciklusima pranja. Naime, utvrđeno je da ovi enzimi pokazuju značajnu aktivnost u toku sušenja. Lipolase® tako pokazuje maksimum aktivnosti pri vlažnosti tkanine od 20-30%, što ukazuje na to da će se najveći deo razgradnje masnih fleka odvijati u toku sušenja. Efekti ove pojačane hidrolitičke aktivnosti se neće uočiti nakon sušenja tkanine, ali će se u sledećem ciklusu pranja masne fleke efikasnije ukloniti. Ipak, ovim je primena lipaza u industriji detergenata najčešće ograničena usled pojave neprijatnih mirisa koji nastaju kao posledica oslobađanje masnih kiselina kratkog lanca pod dejstvom ovih enzima. Zbog toga lipaze pokazuju veliki potencijal primene pre svega kao agensi za predtretman jako zamašćenih materijala.¹⁴



Slika 3.6. Učinak ponovljenog pranja tkanine detergentom koji sadrži lipazu na uklanjanje masne fleke (svinjska mast) pod standardnim evropskim uslovima pranja¹⁴



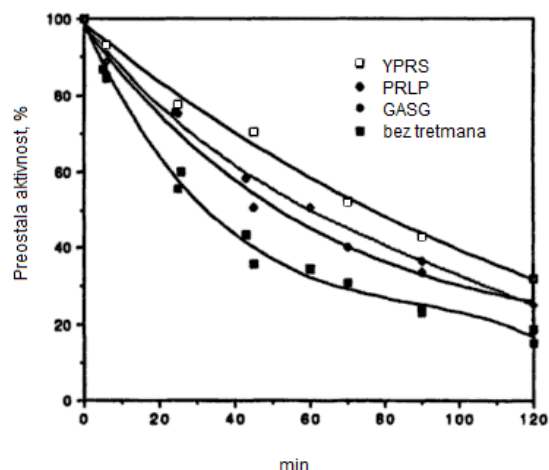
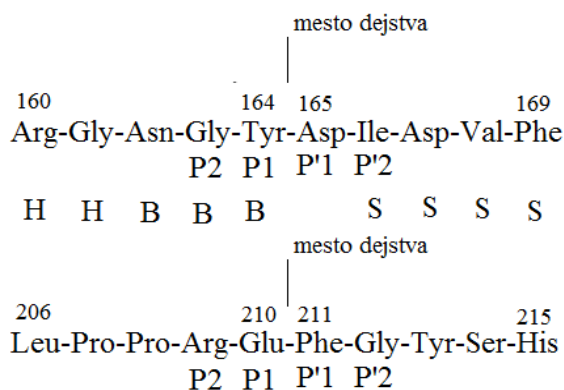
Slika 3.7. Relativna aktivnost enzima u toku sušenja tkanine nakon pranja pod evropskim standardima i jednostepenim ispiranjem česmenskom vodom¹⁴

U patentnoj literaturi se mogu pronaći varijante *T. lanuginosa* lipaze koje su dizajnirane sa ciljem da se poveća učinak odmašćivanja već u prvom ciklusu pranja. Tako se aktivnost lipaze u prvom ciklusu po patentu Bojsena i saradnika može višetruko povećati ukoliko se metodom genetskog inženjerstva proizvedenom enzimu sa N-terminalnog kraja doda pozitivno naelektrisani polipeptidni lanac uz određene modifikacije aminokiselina na pozicijama 90-101 i 210. Prema ovoj grupi autora, za aktivnost enzima u prisustvu anjonskih detergenata je od izuzetnog značaja da na poziciji 210 bude negativno naelektrisan aminokiselinski ostatak (poželjno aspartat).⁷⁵

Andersen i saradnici su takođe vršili dalja ispitivanja sa ciljem da se poveća uspešnost pranja u prvom ciklusu tako što su osmislili način proizvodnje enzima koji bi uz izvesne promene specifičnih aminokiselina sadržao i peptidni lanac na C-terminalnom kraju koji bi se sastojao od neutralnih, hidrofobnih aminokiselinskih ostataka i svoj pronalazak su zaštitili patentnom prijavom.⁷⁶ Povećanje efikasnosti čišćenja ove varijante lipaze u prvom ciklusu pranja je delom pripisan zameni treonina na poziciji 231 argininom i asparaginske kiseline na poziciji 233 argininom. Fuglsang i saradnici fokusirali su svoja istraživanja ka promeni svojstva Lipolase[®] dodatkom peptidnih lanaca na N- i/ili C-terminalnom kraju, a zatim su vršili nasumične mutacije sa ciljem da dođe do promene bar jedne negativno naelektrisane aminokiseline u regiji koja nije esencijalna za strukturu enzima, po mogućstvu pozitivno naelektrisanom/hidrofobnom aminokiselinom. U međuvremenu, Novozymes je na bazi ovih istraživanja komercijalizovao dve lipaze veće efikasnosti čišćenja u prvom ciklusu pranja namenjene industriji detergenata-Lipex[®] i LipoPrime[®].

Istraživanja u ovom smeru su nastavljena, pa tako postoji još dosta patenata u kojima su autori fokusirali svoju pažnju ka dobijanju varijanti *T. lanuginosa* lipaze povećane efikasnosti čišćenja u prvom ciklusu pranja promenom aminokiselinskih ostataka u specifičnim regijama koja su ostvarivana metodama usmerene, ali za sada novi preparati na bazi ovih istraživanja nisu zaživeli u komercijalnim uslovima.^{77,78} Kasnija istraživanja bila su usmerena ka proizvodnji lipaza povećane otpornosti prema dejstvu proteaza koje su često prisutne u enzimskim detergentima. Lipaze poboljšanih karakteristika su dobijene identifikacijom primarnih mesta dejstva proteaza i promenom broja i redosleda aminokiselina na tim pozicijama metodama genetskog inženjerstva. Tako je utvrđeno da dejstvom Savinase[™] na Lipolase[®], primarno dolazi do raskida peptidne veze na dve pozicije.

Istraživanja su pokazala da se promenom strukture enzima na pozicijama 162-165 ili 209-215 na način na koji ne dolazi do promene trodimenzionalne strukture enzima, značajno povećava stabilnost Lipolase[®] u prisustvu proteaza. Tako, zamenom aminokiselina na poziciji 162-165 sekvencom prolin-arginin-leucin-prolin (PRLP) ili zamenom aminokiselina na poziciji 209-215 sekvencama tirozin-prolin-arginin-serin (YPRS) ili glicin-alanin-serin-glicin (GASG), dobijene su tri varijante ovog enzima povećane stabilnosti u prisustvu ispitivane komercijalne proteaze.⁷⁹



Slika 3.8. Mesta primarnog dejstva Savinase™ na *T. lanuginosus* lipazu. H- α heliks, B-navoj, S- β -ravan.⁷⁹

Slika 3.9. Stabilnost Lipolase i njenih varijacija (1 mg/ml) na stabilnost u prisustvu Savinase™ (5 mg/ml) na 22 °C.⁷⁹

Boel i saradnici su primenili drugi pristup ka ostvarivanju veće stabilnosti enzima tako što su patentirali novi vektor za ekspresiju *T. lanuginosa* lipaze u domaćinu *A. oryzae* koji omogućava da se proizvede enzim za koji autori patenta tvrde da je drugačije glikolizovan u odnosu na nativni protein, što dobijeni enzim čini termostabilnijim i otpornijim na dejstvo proteaza.⁸⁰

Detaljno poznavanje strukture *T. lanuginosa* lipaze omogućilo je i da se ode i korak dalje ka njegovom usavršavanju, pa je deo istraživanja bio posvećen modifikaciji enzima kako bi se dobio enzim smanjenog alergijskog potencijala. Takvi pokušaji zasnovani na promeni redosleda određenih aminokiselina koje su prepoznate kao epitopi u 3D strukturi *T. lanuginosa* lipaze ili glikolizaciji nativnog enzima su zaštićeni patentnim prijavama i još uvek nisu našli svoju primenu u komercijalnim uslovima.^{81,82} Pored navedenih, na tržištu su od 1995. godine prisutni i drugi komercijalni preparati Lumafast™ poreklom iz *Pseudomonas mendocina* i Lipomax™ koju proizvodi *Pseudomonas alcaligenes*. Oba preparata prizvodi Genencor International (SAD).

Pored navedenih komercijalnih enzima, u istraživačkoj i patentnoj literaturi mogu se pronaći i drugi enzimi koji imaju potencijal za primenu u industriji detergenata.

Hemachander i Puvanakrishnan (1998) su tako prepoznali *Ralstonia pickettii* lipazu kao potencijalni aditiv u industriji detergenata. Naime, oni su ispitivali kompatibilnost dobijene lipaze sa komercijalnim formulacijama detergenata, kao i pojedinim površinski aktivnim materijama (Triton X 100 i SDS) i utvrdili su da proizvedeni enzim ostaje stabilan u većini ispitivanih detergenata (poput Ariel-a, Rin-a, Surf Ultra), dok veliki broj detergenata čak i aktivira *R. pickettii* lipazu. Testovi pranja su pokazali da se dodatkom istog enzima, pospešuje efikasnost uklanjanja masnih fleka sa tkanine 7-20% u zavisnosti od vrste upotrebljenog detergenta. Tako je najveću efikasnost u odmašćivanju tkanine ovaj enzim pokazao u prisustvu detergenta Triton[®] X-100, pa je nakon tretmana enzimskom formulacijom na tkanini zaostalo 31% masnoće. Ista grupa autora je uočila i da je količina enzima potrebna za efikasno uklanjanje masne nečistoće u sistemu sa površinski aktivnom materijom zavisna od kontaktne površine između nerastvorne nečistoće sa jedne strane, i enzima i detergenta sa druge, pa povećanje koncentracije enzima preko određene koncentracije ne dovodi do srazmerno očekivanog povećanja efikasnosti odmašćivanja.⁵

Ruchi i saradnici su ispitali mogućnost primene alkalne lipaze iz *Pseudomonas aeruginosa* PseA kao aditiva u detergentima. Ispitana je stabilnost ovog enzima u prisustvu velikog broja surfaktanata koncentracija 2% i 5%. Proizvedeni enzim je očuvao gotovo svu početnu aktivnost nakon sat vremena inkubacije na 30 °C sa velikim brojem površinski aktivnih materija pri koncentraciji od 2% (w/v ili v/v) poput Triton[®]-a X-114, CHAPS-a, Tween[®]-a 20, Tween[®] 80, Brij[®]-35, SDS-a, kao i oksidacionih materija kao što su H₂O₂ i natrijum-hipohlorit. Pojedine površinski aktivne materije su snažno aktivirale enzim, pa je aktivnost enzima u prisustvu Triton[®]-a X-100, Span[®]-a 20 i Span[®]-a 80 povećana 13, 15 i 20% redom u odnosu na kontrolu. Cetiltrimetilamonijum-bromid je sa druge strane snažno denaturisao ispitivani enzim, tako da je on već pri koncentraciji od 2% surfaktanta nakon sat vremena izgubio gotovo svu aktivnost (>95%).⁸³

Fusarium solani N4-2, plesan izolovana iz jezera Dali u Kini čiji pH vode iznosi 9,6 je takođe potencijalno dobar izvor enzima za primenu u detergentima. Liu i saradnici su pokazali da lipaza koju proizvodi ova plesan ostaje stabilna u velikom broju nejonskih detergenata poput Triton[®]-a X-100 (100,1%), Tween[®]-80 (108,5%), Tween[®]-

20 (100,0%), natrijum-holata (128.3%) i natrijum-tauroholata (106,1 %), čime je pokazala bolja svojstva od komercijalnog preparata Lipolase[®], koji pod istim uslovima (30 °C, pH 9, koncentracija surfaktanata 1 % w/v) zadržava 68,5, 52,3, 31,6, 108,5 i 100,1% aktivnosti, redom. *Fusarium solani* N4-2 lipaza je prema istom istraživanju pokazala i veliku oksidativnu stabilnost, a u velikoj meri i nepodložnost proteolizi dejstvom komercijalnih proteaza za primenu u detergentima.⁸⁴

Još jedna plesan, *Aspergillus niger* MTCC 2594 je pokazala dobra svojstva sa aspekta potencijalne primene u proizvodnji lipaze za industriju detergenata. Ova lipaza je stabilna u širokom temperaturnom i pH opsegu, a dodatak SDS-a, Tween[®]-a 80 i velikog broja komercijalnih formulacija detergenata povećava njenu aktivnost, čak i nakon sat vremena inkubacije. Kada je ova lipaza upotrebljena kao aditiv, efikasnost čišćenja komercijalnih detergenata je uvećana 7-12% u zavisnosti od vrste detergenta. Najveću kompatibilnost, ova lipaza je pokazala sa komercijalnim detergentom Tide, a dodatnom optimizacijom metodom statističkog planiranja eksperimenta, kada su varirane koncentracije enzima, detergenta, pH i temperature pranja, dodatkom ovog enzima ostvareno je povećanje efikasnosti odmašćivanja od 33% u odnosu na sam detergent.⁸⁵

Bora i Kalita (2008) su ispitivali stabilnost lipaze iz termofilne *Bacillus* sp. DH4 vrste i pri većim koncentracijama surfaktanata i utvrdili su da Tween[®] 80, Triton[®] X-100 i Triton[®] X-114 pozitivno deluju na aktivnost i stabilnost ove lipaze. Naime, čak i pri koncentraciji od 10% w/v ovih surfaktanata, aktivnost lipaze se povećala do 64% u prisustvu nejonskih detergenata tipa Triton[®]. Sa druge strane, ova lipaza je potpuno inhibirana/denaturisana u prisustvu SDS-a koji je glavni sastojak većine savremenih komercijalnih detergenata, pa je tako nakon sat vremena u prisustvu 0,2% ovog surfaktanta, ispitani enzim očuvao svega 2% svoje aktivnosti.⁸⁶

U literaturi se može videti da SDS ima izrazito negativan uticaj i na druge *Bacillus* spp. lipaze. Tako *Bacillus smithii* BTMS 11 proizvodi lipazu koja je potpuno deaktivirana dodatkom ove površinski aktivne supstance. Dalje, ova lipaza je izrazito podložna oksidaciji pa je tako dodatak H₂O₂ potpuno deaktivira već pri malim koncentracijama. Ipak, i ova lipaza je ocenjena kao potencijalno dobar aditiv za detergente usled visoke aktivnosti koju zadržava u velikom broju komercijalnih

formulacija budući da pri uslovima pranja i nakon 3h zadržava preko 90% aktivnosti, dok je pojedine formulacije čak i povećavaju.⁸⁷

Acinetobacter sp. MTCC 6816 izolovan u šumskom zemljištu takođe proizvodi lipazu koja pokazuje slična svojstva-gotovo sve pojedinačno ispitivane površinski aktivne materije je u velikoj meri deaktiviraju (>60%) već nakon sat vremena. Sa druge strane, komercijalni detergentsi nemaju ni približan uticaj pa je u njihovom prisustvu (7 mg/ml, pH 8,5) gubitak aktivnosti nakon sat vremena iznosio do 10%. Dodatkom ove lipaze komercijalnom detergentu, efikasnost odmašćivanja je povećana do 24%, a proces pranja se može sasvim uspešno izvoditi i na niskim temperaturama 15-25 °C.⁸⁸

Interesantan izbor za producenta lipaza za aplikaciju u detergentima predstavljaju i pripadnici *Burkholderia cepacia* vrste. U istraživačkoj literaturi se mogu pronaći podaci o dva takva enzima. Prvi proizvodi termofilni soj RGP-10 izolovan iz komposta.⁸⁹ Ova lipaza pokazuje izuzetnu oksidativnu stabilnost, kao i nepodložnost proteolitičkoj degradaciji dejstvom više proteaza iz *Bacillus* spp., što je od izuzetne važnosti budući da savremene formulacije detergenata uglavnom sadrže subtilizinske proteaze iz *Bacillus* spp. kao osnovne enzimске aditive. Drugi soj LP08 izolovan iz zemljišta, proizvodi enzim aktivan na nižim temperaturama što je u skladu sa novim tendencijama u pogledu uštede energije.⁹⁰ I ovaj enzim pokazuje visoku oksidativnu stabilnost, kao i sličan obrazac ponašanja u prisustvu različitih surfaktanata. Naime, oba enzima su snažno denaturisana u prisustvu SDS-a, dok ih nejonski detergentsi poput Tween®-a 20 i 80 i saponina (1% w/v) takođe deaktiviraju ali u manjoj meri (~50% nakon 10 minuta i 1h respektivno). Oba enzima bi se uspešno mogla kombinovati sa natrijum-holatom i natrijum-tauroholatom-oba surfaktanta ne umanjuju aktivnost RGP-10 lipaze, dok je LP08 lipaza i aktivirana u prisustvu ovih detergenata.

4. Proteaze

Proteaze i peptidaze (E.C.3.4) su enzimi koji katalizuju hidrolizu peptidne veze u molekulima proteina i/ili peptida. Njihova osnovna funkcija u prirodi je, kao i većine drugih hidrolitičkih enzima, da potpomognu asimilaciju hranljivih materija hidrolizujući velike molekule do njihovih sastavnih činioca koje ćelije mogu da absorbuju. Proteaze hidrolizuju molekule proteina do peptona, polipeptida, dipeptida, pa sve do slobodnih aminokiselina. Pored njihove funkcije u digestiji proteinskih nutrijenata, proteaze igraju veliku ulogu i u drugim metaboličkim procesima poput posttranslacionih modifikacija drugih proteina, aktivacije zimogenih oblika enzima, germinacije spora kod sporulišućih mikroorganizama i kao deo složenih metaboličkih kaskada.⁹¹

Ovi enzimi takođe mogu biti biljnog, životinjskog ili mikrobnog porekla, pri čemu proteaze mikrobnog porekla imaju najveću industrijsku primenu zbog velike brzine rasta mikroorganizama koji ih produkuju na jeftinim sirovinama i sa visokim prinosima. Najpoznatiji predstavnici biljnih proteaza uključuju papain, bromelin, keratinazu i ficin. Primena enzima iz biljnih vrsta zahteva veliki utrošak vremena, kao i velike površine za uzgajanje ovih biljnih kultura te je njihova industrijska primena prilično ograničena. Takođe sastav izoenzimskih formi u njima, zavisiće i od klimatskih uslova i uslova kultivacije, kao i metoda ekstrakcije i prečišćavanja što utiče na krajnji kvalitet ovih preparata.

Najpoznatije proteaze životinjskog porekla su pankreasni tripsin, himotripsin, pepsin i renin. Kao osnovnih crevnih digestivnih enzima kod većine kičmenjaka, njihova proizvodnja je ograničena i zavisna od dostupnosti stoke za klanje na koju utiču brojni faktori, počev od klimatskih pa do državnih mera poljoprivrednih politika.

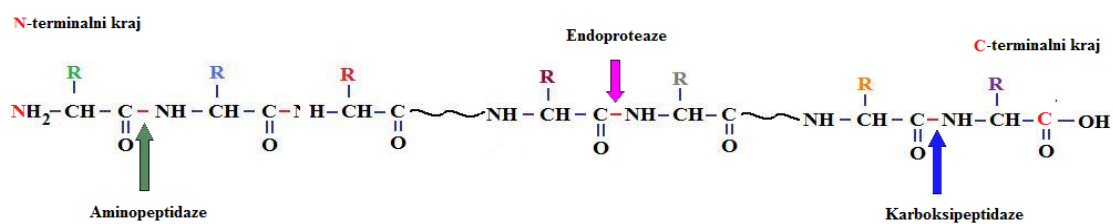
Daleko najveću industrijsku primenu imaju mikrobne proteaze, pri čemu se po značaju ističu neutralni i alkalni proteolitički enzimi koje produkuju različite bakterijske

vrste. Najveći broj komercijalnih proteolitičkih preparata proizvedeni su pomoću različitih *Bacillus* spp. Pored navedenih, pojedini kvasci i plesni su takođe producenti proteaza koje imaju svoju ulogu u industriji, a čija primena se pre svega zasniva na specifičnim fazama u tehnološkim postupcima proizvodnje sireva.

Poznato je i da su mnogi virusi producenti proteaza, međutim ove proteaze nemaju aplikativnu vrednost i predmet su opsežnih ispitivanja isključivo sa aspekta razvoja antiviralnih lekova koji bi delovali kao inhibitori ovih enzima.

Klasifikacija proteolitičkih enzima se može izvršiti na osnovu više kriterijuma kao što su pozicija peptidne veze u molekulu proteina na koju deluju, struktura aktivnog centra i mehanizam delovanja, kao i pH vrednost pri kojoj deluju.

Na osnovu pozicije peptidne veze u molekulu proteina koju hidrolizuju, proteaze se dele na egzopeptidaze i endopeptidaze. Egzopeptidaze deluju na krajevima peptidnih lanaca odvajajući postepeno pojedinačne aminokiseline i na taj način skraćuju lance. One to mogu specifično činiti sa N-terminalnog kraja (aminopeptidaze) ili C-terminalnog kraja (karboksipeptidaze) otcepljujući pojedinačne aminokiseline, di- i tripeptide. Aminopeptidaze su uglavnom intracelularni enzimi, i do sada je zabeležen samo jedan primer ekstracelularne produkcije proteaze ovog tipa pomoću *A. oryzae*.⁹¹ Karboksipeptidaze se uglavnom sekretuju ekstracelularno, a po strukturi aktivnog centra mogu pripadati podgrupi serinskih, metalo ili cisteinskih proteaza. Endopeptidaze dejstvuju u unutrašnjosti molekula proteina i razlažu proteine na peptide manje molekulske mase.



Slika 4.1. Podela prema mestu raskidanja peptidne veze u peptidnom lancu

Na osnovu mehanizma delovanja proteolitički enzimi se mogu podeliti u četiri grupe: serinske proteaze, cisteinske proteaze, aspartatne proteaze i metalo-proteaze. Tip enzima se može prepoznati na osnovu osetljivosti na određene inhibitore.

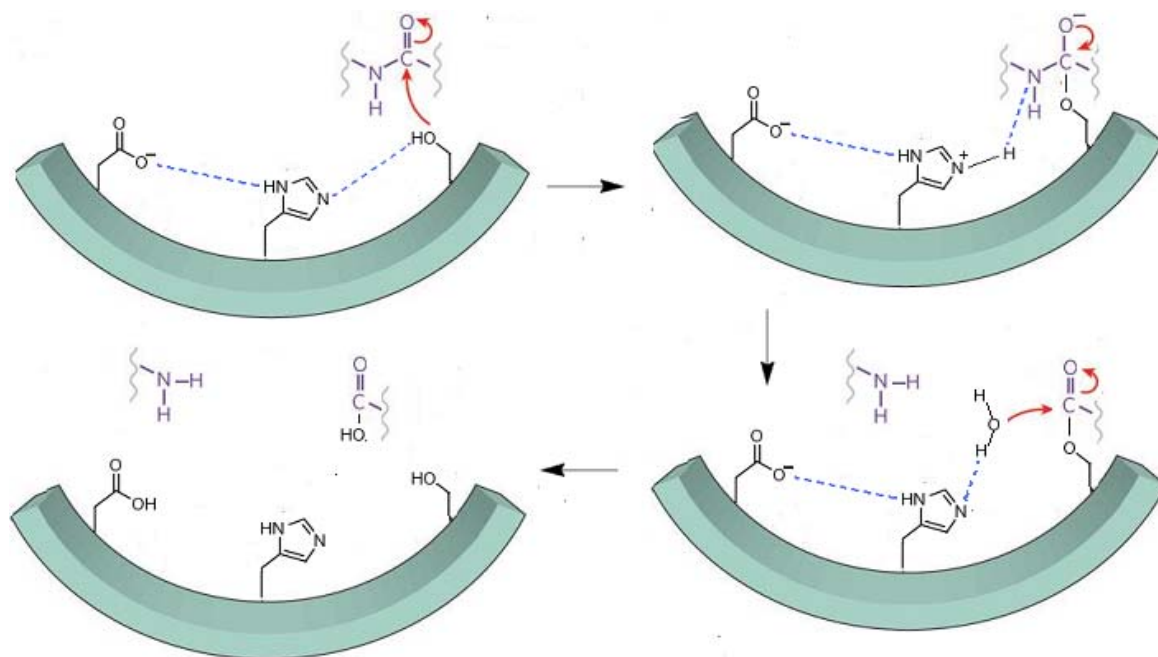
4.1. Serinske proteaze

Serinske proteaze produkuje veliki broj mikroorganizama i njih karakteriše prisustvo serina u aktivnom centru. Strukturalne razlike u proteazama ovog tipa dovele su do podele ovih proteaza na 20 podgrupa koje su međusobno razlikuju po nativnoj konformaciji enzima, kao i mehanizmu katalize sugerišući potpuno različit evolutivni nastanak. Najveći broj serinskih proteaza karakteriše katalitička trijada Serin-Histidin-Asparaginska kiselina (Ser-Hys-Asp) iako se same primarne strukture enzima mogu bitno razlikovati. Naime konformacija aktivnog centra je ista iako se ove aminokiseline mogu nalaziti u drugačijem redosledu u peptidnom lancu. Serinske proteaze su aktivne u neutralnim i alkalnim sredinama, najčešće između pH 7 i 11. Veličine njihovih molekula su relativno male (18 do 35 kDa), a pH izoelektrične tačke je uglavnom u opsegu od 4 do 6.⁹¹ Za industriju su najznačajnije serinske alkalne proteaze koju proizvode određene vrste bakterija, plesni i kvasaca čiji se optimum dejstva nalazi oko pH 10. Među njima se po značaju posebno ističu subtilizinske proteaze koje proizvode *Bacillus* spp.

Serinske proteaze se među sobom mogu razlikovati i po primarnom mestu dejstva na proteine. Oblik i hemijska priroda ostatka u aktivnom centru dozvoljava interakcije samo sa određenim aminokiselinskim ostacima supstrata, pa prema tome samo odgovarajuća peptidna veza dolazi u položaj pogodan za njenu hidrolizu.

Tako će proteaze nalik tripsinu hidrolizovati peptide na mestima iza pozitivno naelektrisanih aminokiselina poput arginina ili lizina budući da se u vezivnom delu supstrata nalaze negativno naelektrisani ostaci glutaminske ili aspartatne kiseline. Himotripsin i njemu slični enzimi raskidaju veze iza aromatičnih aminokiselina fenilalanina, triptofana i tirozina, čiji se veliki hidrofobni ostaci mogu smestiti u duboki hidrofobni džep proteaze. Serinske proteaze nalik elastazi dejstvuju iza aminokiselina sa malim bočnim lancima kao što su alanin, glicin i serin, koji mogu ući u uski procep enzima.⁹¹

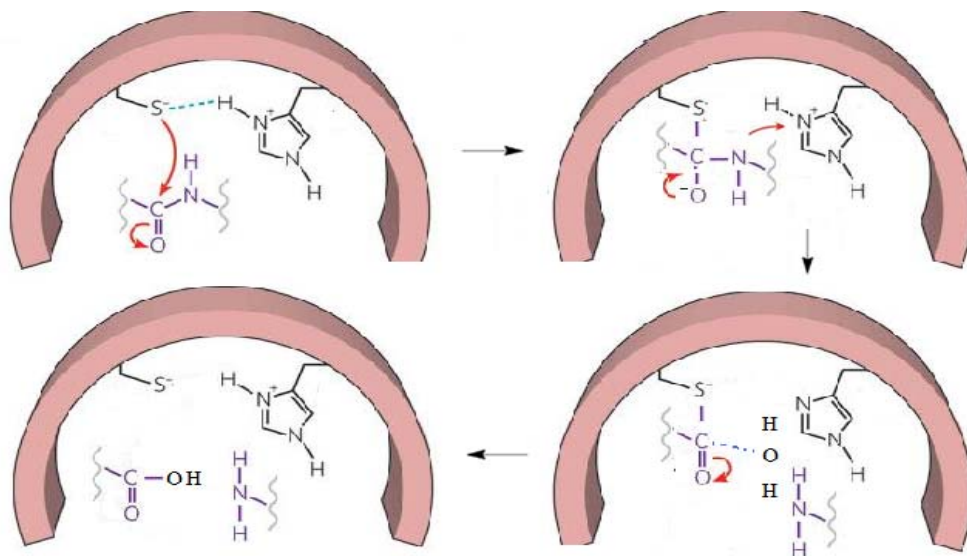
Sam mehanizam se odvija preko stvaranja nekoliko intermedijera. Prvi kovalentni intermedijer nastaje nukleofilnim napadom hidroksilne grupe serina pri čemu elektronski par na azotu histidina ima ulogu usmeravanja reakcije na taj način što prihvata vodonik iz hidroksilne grupe serina. Ovo dovodi do gubitka aminokiseline ili peptidnog fragmenta supstrata stvarajući uslove za dalji nukleofilni napad vode kojim dolazi do deacilovanja enzim-supstrat kompleksa, što rezultuje hidrolizom peptida.



Slika 4.2. Mehanizam delovanja serinskih proteaza⁹²

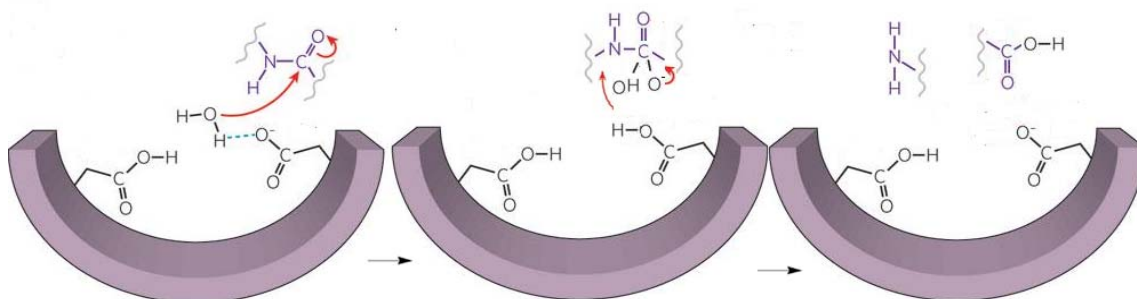
4.2. Cisteinske proteaze

Ova grupa enzima obuhvata biljne proteaze papain, ficin i bromelin iako ih proizvode i mnogi mikroorganizmi, a mogu biti i životinjskog porekla. Ovo su proteaze aktivne u neutralnoj i blago kiselj sredini, i veličine su od 20 do 50 kDa. Njih karakteriše prisustvo cisteina i histidina u aktivnom centru, a sam mehanizam katalize se takođe odvija preko kovalentnih intermedijera. Nukleofilni napad se odvija preko deprotonovane tiol grupe cisteina, a zatim se uz oslobađanje aminokiselina ili peptida, zaostaje tioestar koji hidrolizuje do nativnog enzima i preostalog fragmenta peptida.⁹¹

Slika 4.3. Mehanizam delovanja cisteinskih proteaza⁹²

4.3. Aspartatne proteaze

Aktivni centar aspartatnih proteaza sadrži ostatke asparaginske kiseline. Ovi enzimi pokazuju maksimalnu aktivnost u kiselj sredini pri pH vrednosti 3,00 do 4,50 i nazivaju se kisele proteaze. Najvažniji predstavnici su pepsin i renin, a mogu da ih proizvode i različite vrste plesni poput *Aspergillus*, *Penicillium* i *Rhizopus*. Pored navedenih, okarakterisane su i aspartatne proteaze koje proizvode retrovirusi, dok su u novijoj literaturi zabeleženi i neki primeri bakterijskih proteaza i one koje proizvode izvesne archaea-e.

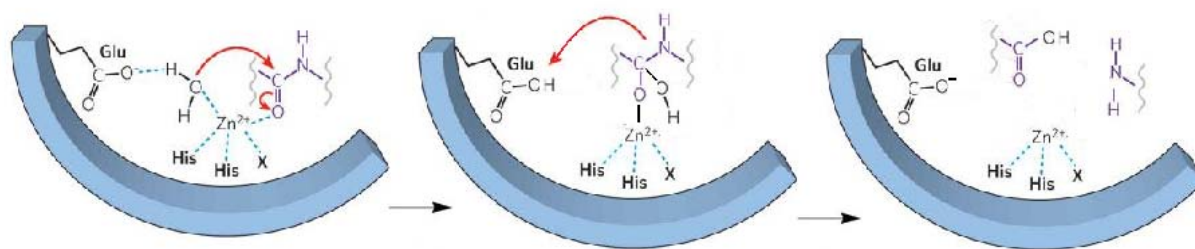
Slika 4.5. Mehanizam delovanja aspartatnih proteaza⁹²

Na osnovu kristalografskih studija različitih vrsta aspartatnih proteaza, uočeno je da aktivni centar enzima čine dva ostatka aspartata koji se nalaze na homolognim delovima enzimskog lanca nastalog kao posledica duplikacije gena. Na optimalnoj pH između 2 i 3, jedna od ovih grupa je u jonizovanom obliku, dok druga nije. Za aktivnost proteaza u čijoj primarnoj strukturi nisu dva homologna niza, poput proteaza koju proizvode virusi (retropepsini), neophodno je obrazovanje homolognih dimera.⁹¹ Pretpostavljeni mehanizam na osnovu strukture ovih enzima dat je na slici 4.5.

Za razliku od serinskih i cisteinskih proteaza, u katalizi aspartatnih proteaza ne dolazi do obrazovanja kovalentne veze prilikom stvaranja intermedijera. Reč je o kiselo-baznoj reakciji u kojoj se nukleofilni napad odigrava posredstvom dve simultane razmene protona; prva se dešava između molekula vode i karboksilnih grupa aspartata, a druga između karboksilne grupe aspartama i karboksilatnog anjona supstrata uz posledično raskidanje peptidne veze.

4.5. Metaloproteaze

Ova grupa enzima obuhvata proteaze koje se prilično razlikuju po svojoj strukturi a koje proizvode različiti mikrobi, ali i viši organizmi. Za njihovu katalitičku aktivnost u najvećem broju slučajeva je od esencijalne važnosti prisustvo cinka, iako se u nekim slučajevima on može zameniti nekim drugim dvovalentnim jonom metala bez gubitka aktivnosti, poput magnezijuma, mangana, kobalta, nikla i dr. Kristalografske studije mnogih, ali ne i svih, metaloproteaza pokazale su da je metalni jon vezan za aktivni centar pomoću dva histidina i jednog ostatka glutamiske kiseline/histidina (najčešća sekvenca aktivnog centra je His-Glu-Xaa-Xaa-His, gde je Xaa metalni jon).⁹³ Termolizin, neutralna metaloproteaza koju proizvodi *Bacillus thermoproteolyticus*, je jedan od najviše proučenih enzima ove grupe. Predloženi mehanizam reakcije katalize podrazumeva nukleofilni napad vode, koji je potpomognut glutaminskom kiselinom, na peptidnu vezu koja je polarizovana usled prisustva jona cinka.



Slika 4.6. Mehanizam delovanja metaloproteaza

Metaloproteaze su najčešće aktivne u rasponu pH 7-8, i lako podležu autolizi na pH višim od 9 i nižim od 6. Metaloproteaze mogu pripadati i egzoproteazama i endoproteazama, a na osnovu ove karakteristike, kao i na osnovu preostalih aminokiselina u aktivnom centru koje imaju ulogu liganada za metalni jon, razlikujemo 30 familija ovih enzima.

4.6. Primena proteaza u industriji

Proteaze imaju široku primenu u industriji i to pre svega u proizvodnji hrane i industriji detergenata. S obzirom na nove trendove razvoja ekološki prihvatljivih tehnologija, očekuje se njihova šira primena u kožarskoj industriji kao i u postupcima bioremedijacije. Pored toga, proteaze se intenzivno koriste u farmaceutskoj industriji za proizvodnju lekova kao što su keratolitički preparati za uklanjanje mrtvih ćelija sa ožiljaka i debridman rana.

4.6.1. Kožarska industrija

Obrada kože podrazumeva nekoliko koraka poput kvašenja, uklanjanja dlaka, šavljenja itd. Tradicionalan tretman kože podrazumeva upotrebu agresivnih zagađujućih supstanci čija upotreba nameće preuzimanje odgovornosti za njeno bezbedno uklanjanje. Sami procesi se uz upotrebu enzima mogu voditi pri znatno povoljnijim energetskim uslovima što je takođe bitan aspekt očuvanja životne sredine. Proteaze se mogu koristiti u više faza obrade kože, pa tako se dejstvom ovih enzima poboljšava i ubrzava proces kvašenja. Kvašenjem koža bubri što ima za cilj da olakša

dalje korake kojima se uvođenjem sumpora u alkalnim uslovima rastvaraju proteini korena dlake čime dolazi do njenog opadanja. Upotrebom enzima za uklanjanje nekolagenih proteinskih vlakana, poput nefibrilarnih proteina kao što su albumini i globulini, značajno se smanjuje negativni uticaj na životnu sredinu, ali i na radnike koji su bili izloženi udisanju otrovnog vodonik-sulfida koji se oslobađa tom prilikom. Savremenim pristupom, za ovu svrhu se dodaju alkalne proteaze u kombinaciji sa gašenim krečom i kuhinjskom soli.

Proteaze se koriste i za omekšavanje kože, i u tu svrhu se dodaju tripsin, *Bacillus* i *Aspergillus* proteaze. U zavisnosti od specifičnosti upotrebljenih enzima ili njihovih smeša, kao i samog postupka obrade mogu se dobiti proizvodi željene mekoće.

Novozymes proizvodi nekoliko proteaza namenjenih ovoj svrsi poput različitih formi NovoCor, NUE, Pyrase i NovoBate.

4.6.2. Proteaze u industriji hrane

Mlečna industrija

Proteaze se u mlečnoj industriji najviše primenjuju u proizvodnji sira, gde se dodaju sa ciljem da izazovu koagulaciju mleka. Enzimi koji se dodaju su uglavnom renin ili mikrobne proteaze koje uglavnom pripadaju klasi aspartatnih proteaza. Porast proizvodnje sira na svetskom nivou, uslovio je potražnju za novim enzimima mikrobnog porekla koji bi mogli da zamene renin izolovan iz digestivnih organa teladi (koji sadrži više himozina u odnosu na pepsin) uz neizmenjena svojstva tako dobijenih mlečnih proizvoda. Naime, osnovna funkcija proteaza u proizvodnji sireva je da hidrolizuju specifičnu peptidnu vezu κ -kazeina (između Phe105 i Met106) što dovodi do stvaranja para- κ -kazeina i makropeptida. Himozin pokazuje upravo takvu specifičnost, dok većina mikrobnih proteaza nespecifično hidrolizuje peptidnu vezu što dovodi do razvoja gorčine prilikom zrenja sireva. Dalje, nepoželjno je da proteaze koje bi se koristile u ove svrhe budu izrazito termostabilne zbog lakše kontrole proizvodnje. Uz to producenti ovih proteaza moraju biti potpuno nepatogeni mikroorganizmi čiju su upotrebu u proizvodnji hrane odobrile relevantne institucije. Tako su proteaze iz *Mucor*

miehei i *Bacillus subtilis* ocenjene kao podesne za ovu aplikaciju. Razvojem genetskog inženjeringa, omogućeno je dobijanje himozina i njemu sličnih mikrobnih proteaza u visokom prinosu rekombinacijom i ekspresijom gena za proizvodnju ove proteaze u različitim domaćinima.^{94,95} Tako je ekspresijom gena iz *R. miehei* u *A. niger* dobijen preparat Marzyme[®] koji proizvodi Danisco-DuPont (nekadašnji Genencore). Hannilase[®] i Chy-Max[®] (Chr. Hansen) su takođe enzimi iz *R. miehei* dobijen tehnikom rekombinacije gena. DSM proizvodi više mikrobnih renina namenjenih ovoj svrsi, kao što su Fromase[®] (iz *R. miehei*), Suparen/Surecure[®] (iz *Cryphonectria parasitica*) i Maxiren[®] (iz *K. lactis*). Ipak, određeni preparati su dobijeni i ekspresijom životinjskih gena u mikrobnim domaćinima. Tako je Pfizer proizveo tri preparata pomoću *Aspergillus niger* var. *awamori*, *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* i *Escherichia coli*, i njihovu upotrebu u ljudskoj ishrani je odobrena od strane FDA.⁹⁶

Određene proteaze (tripsin) se takođe koriste i u mlečnoj industriji, za tretman surutke radi dobijanja funkcionalnih napitaka, poput specijalnih mleka za bebe čiji digestivni trakt nije dovoljno razvijen da bi vario velike molekule proteina.

Proizvodnja hleba i peciva

Mnogi enzimi poput amilaza, ksilanaza i proteaza su našli svoju primenu u pekarskoj industriji kako bi poboljšali organoleptička svojstva ovih proizvoda i skratili vreme fermentacije. Proteaze se primenjuju u proizvodnji hleba i peciva kako bi delimično hidrolizovale gluten-nerastvorni protein prisutan u pšeničnom i drugim vrstama brašna. Parcijalnom hidrolizom glutena, menjaju se fizička svojstva testa pa ono postaje mekše i lakše za manipulaciju. Za ove svrhe se najčešće koriste kisele proteaze poreklom iz kvasaca i plesni, poput *Aspergillus oryzae*.⁹¹

Mesna industrija

Zrenje mesa ili postmortalne promene obuhvataju veliki broj biohemijskih transformacija mesa pod dejstvom endogenih enzima, koja za posledicu imaju promenu konzistencije, mirisa, ukusa i tehnoloških svojstava mesa. U prvom postmortalnom periodu, dolazi do razlaganja glikogena, usled čega se stvara mlečna kiselina koja snižava pH u mesu. Tada nastupa proteolitička faza, u kojoj nativno prisutni enzimi vrše hidrolizu proteina čime dolazi do popuštanja mrtvačke ukočenosti, meso postaje mekše

i dobija karakterističnu aromu od zrelog mesa. Meso se može tretirati kiselim proteazama (čiji je pH optimum ispod 6) sa ciljem da se ubrza i poboljša zrenje mesa. U te svrhe se tradicionalno koriste biljne proteaze papain, bromelin ili ficin, a poslednjih godina postoji i veliki broj mikrobnih enzima čija je upotreba u te svrhe odobrena, poput proteaze iz *B. subtilis* ili *A. oryzae*.⁹¹

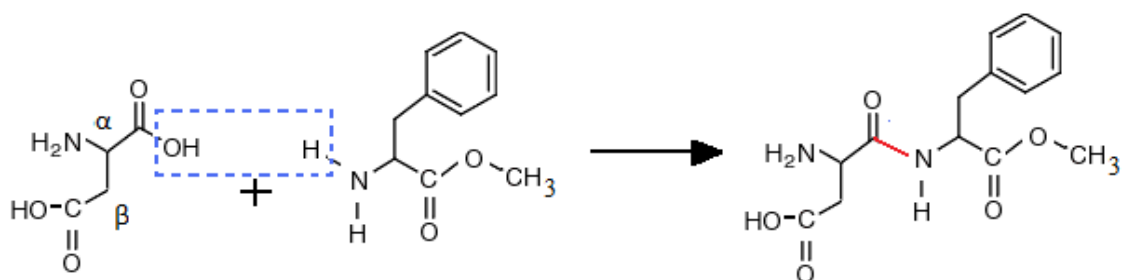
Proizvodnja specijalizovanih namirnica

Hidrolizati proteina imaju značajnu poziciju u specijalizovanim formulama za ishranu i različitim nutritivnim suplementima, poput specijalnih formula za bebe ili proizvoda od soje. Strogo specifične proteaze se koriste kako bi se dobili proizvodi poželjnih organoleptičkih svojstava. Naime, gorak ukus je česta nuspojava hidrolize proteina, a posledica je prisustva hidrofobnih aminokiselina na krajevima novonastalih peptida, kao i ostataka prolina u sredini peptidnih lanaca. Proizvodi željenih karakteristika se mogu dobiti pažljivim izborom endopeptidaza čiji je cilj primarna hidroliza proteina, sa aminopeptidazama i/ili karboksipeptidazama specifičnim prema hidrofobnim aminokiselinama kako bi se redukovala gorčina.

Proizvodnja aspartama

Aspartam je veštački zaslađivač čija primena je odobrena od strane FDA. Hemijski gledano, to je metilestar dipeptida L-asparaginske kiseline i L-fenilalanina. Komercijalno se dobija hemijskim ili enzimskim postupkom, pri čemu enzimski postupak ima prednost nad hemijskim jer je stereospecifičan i ne dovodi do stvaranja gorkog nusproizvoda koji nastaje usled reakcije metilovanog fenilalanina sa neželjenom karboksilnom grupom asparaginske kiseline (β -forma).

Enzimska reakcija stvaranja peptidne veze između hemijski modifikovanih aminokiselina se odvija uz Termolizin (iz *Bacillus thermoproteolyticus*).



Slika 4.7. Sinteza veštačkog zaslađivača aspartam uz proteazu iz *B. thermoproteolyticus*

4.6.3. Farmaceutska industrija

Proteaze se intenzivno koriste u farmaceutskoj industriji za razvoj efikasnih terapijskih preparata zahvaljujući širokom opsegu reakcija koje katalizuju uz uglavnom visoku specifičnost prema supstratima.

Proteaze su sastavni deo preparata namenjenih poboljšanju varenja kod osoba koje pate od insuficijencije egzokrinog pankreasa. U te svrhe se najčešće koriste smeše pankreasnih enzima svinja i goveda, ali i pojedine mikrobne proteaze (poput proteaze iz *A. oryzae*).

Pojedine proteaze, poput kolagenaze iz *Clostridium* sp. ili subtilizina se koriste kao aktivna materija u preparatima namenjenih tretmanu izrazito oštećene kože.

Takođe, pojedine visokospecifične proteaze se koriste kao sastavni deo lekova namenjenih za eliminaciju viška pojedinih peptida i aminokiselina koje nastaju kao posledica nekih teških oboljenja.

4.6.4. Proteaze u detergentima

Proteaze čine komercijalno najviše primenjenu klasu enzima sa preko 40% udela u tržištu enzima, zahvaljujući pre svega njihovoj upotrebi u detergentima. Svi komercijalizovani proteolitički preparati ove namene su serinske proteaze dobijene pomoću *Bacillus* spp. koje karakteriše katalitička trijada Asp-32, His-64, i u samom aktivnom centru Ser-221. Ovakav enzim je prvobitno izolovan iz *Bacillus subtilis*, pa je čitava klasa proteaza koji joj nalikuju dobila naziv-subtilizinske proteaze. Subtilizinske proteaze su ekstracelularni alkalni enzimi veličine 15-20 kDa koje proizvode različiti mikroorganizmi, a danas je poznata struktura velikog broja ovih enzima kao i odgovarajući genetski kodovi kojima je kodirana njihova sinteza.⁹⁷

Pokazalo se da drugi tipovi proteaza nisu pogodni za primenu u detergentima. Tako na primer metaloproteaze nisu kompatibilne sa helatorskim agensima koji se dodaju detergentima sa ciljem omekšavanja vode, a koji bi neselektivno vezivali metalni jon u aktivnom centru enzima izazivajući gubljenje njegove aktivnosti.

Iako postoji veliki broj publikacija u kojima se opisane nove proteaze pogodne za primenu u detergentima, izolovane iz različitih mikrobnih sojeva ili dobijene metodama proteinskog i genetičkog inženjerstva, danas je u komercijalnoj upotrebi oko 20 proteolitičkih preparata namenjeno ovoj svrsi čiji je pregled dat u sledećoj tabeli:

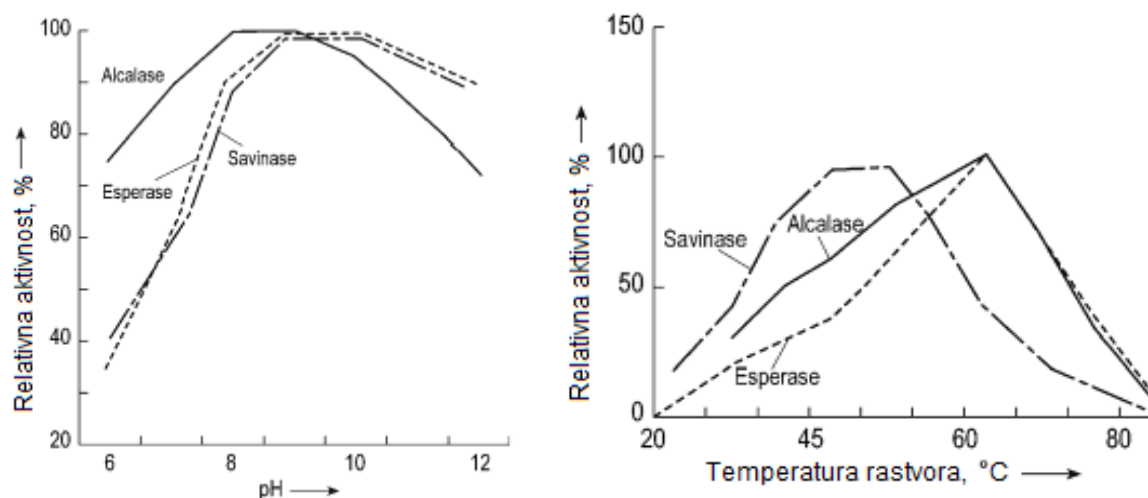
Tabela 4.1. Komercijalne proteaze za primenu u detergentima^{98,99}

Komercijalni naziv	Proizvođač	Poreklo	nativni/modifikovan	Producent
Alcalase/Subtilisin Carlsberg	Novozymes	<i>B. licheniformis</i>	nat	<i>B. licheniformis</i>
Savinase/Subtilisin 309	Novozymes	<i>B. clausii</i>	nat	
Esperase/Subtilisin 147	Novozymes	<i>B. halodurans</i>	nat	
Purafect	Genencor	<i>B. lentus</i>		<i>B. subtilis</i>
Everlase	Novozymes	<i>B. clausii</i>	mod	<i>B. clausii</i>
Kannase	Novozymes	<i>B. clausii</i>	mod	<i>B. clausii</i>
Durazym	Novozymes	<i>Bacillus sp.</i>		
Purafect OxP	Genencor	<i>B. lentus</i>	mod	<i>B. subtilis</i>
Properase	Genencor	<i>B. alcalophilus</i> PB92	mod	<i>B. alcaliphilus</i>
FNA	Genencor	<i>B. amyloliquefaciens</i>	mod	<i>B. subtilis</i>
FN4	Genencor	<i>B. lentus</i>	mod	<i>B. subtilis</i>
BLAP S	Henkel	<i>B. lentus</i>	mod	<i>B. licheniformis</i>
BLAP X	Henkel	<i>B. lentus</i>	mod	<i>B. licheniformis</i>
Subtilisin	Gist-Brocades	<i>B. alcalophilus</i>		
Maxacal	Gist-Brocades	<i>B. alcalophilus</i>		
Maxatase	Gist-Brocades	<i>Bacillus sp.</i>	-	-
Opticlean	Solvay Enzymes	<i>B. alcalophilus</i>		
Optimase	Solvay Enzymes	<i>B. licheniformis</i>		
Maxapem	Solvay Enzymes	<i>Bacillus sp.</i>	mod	
Biopraxe	Nagase Biochemicals	<i>B. subtilis</i>		
Godo-bap	Godo Shusei	<i>B. licheniformis</i>		
Wuxi	Wuxi Synder Bioproducts	<i>Bacillus sp.</i>		
Protosol	Advance Biochemicals	<i>Bacillus sp.</i>		
KAP	Kao	<i>B. alcalophilus</i>	mod	<i>B. alkalophilus</i>

Alkalna proteaza Alcalase je prvi preparat ovog tipa koji je inkorporiran u praškastu formulaciju detergenta pod komercijalnim nazivom Biotex koji je na tržište lansirao

Novo Industry iz Danske 1963. godine. Međutim, primena proteaza u detergentima je 1970-ih godina suočena sa stagnacijom zbog nepovoljnog publiciteta koji je nastao usled razvoja alergijskih reakcija radnika u proizvodnji koji su rukovali ovim enzimima. Ovaj problem izazvan proteinskom prašinom je kasnije rešen proizvodnjom enzima u granulisanom obliku.⁹⁸

Ubrzo su proteaze postale nezamenljivi aditiv u tadašnjim formulacijama detergenata. Od ranih 1980-ih, sa rastom ekološke svesti dolazi do promene u formulaciji detergenata pa su tako fosfatne soli koje su imale gradivnu funkciju polako menjane zeolitima i silikatima, a formulacijama počinju da se dodaju i izbeljivači. To je zahtevalo pronalaženje novih proteaza koje su stabilne pri višim pH vrednostima, a kako bi se smanjila potrošnja energije, jedan od zahteva koji se nametnuo je i taj da upotrebljeni enzim bude aktivan i pri nižim temperaturama. Ovaj zahtev je bio i u skladu sa sve većom upotrebom sintetičkih tkanina koje ne trpe pranje na povišenim temperaturama. Tada se na tržištu javljaju preparati poput Savinase (iz *B. clausii*, ranije *B. subtilis*), Esperase (iz *B. halodurans*, ranije *B. lentus*) i Maxacal (*B. alcalophilus*).¹⁰⁰



Slika 4.8. Optimalna pH i temperatura komercijalnih proteaza za detergente¹⁴

Ove proteaze, iako pokazuju veliko podudaranje u primarnoj strukturi enzima, pokazuju različite temperaturne i pH profile. Ova različita svojstva omogućavaju da se za konkretne uslove pranja i namenu detergenta odabere enzim koji će pokazati maksimalan učinak. Tako se pokazalo da je za primenu proteaza u detergentima, veoma bitna vrednost izoelektrične tačke enzima (pI), jer proteaze pokazuju najbolje dejstvo

kada pH detergenta odgovara ovoj vrednosti. Pregled svojstava komercijalnih proteaza dat je u sledećoj tabeli:

Tabela 4.2. Osobine komercijalnih proteaza za detergente¹⁰¹

Komercijalni naziv	Proizvođač	pH stabilnost (optimum)	Temperaturna stabinost (optimum), °C	Komentar
Alcalase	Novozymes	6-10 (9)	10-80 (60)	Alkalna proteaza
Savinase	Novozymes	8-11	15-75 (50)	Izrazito alkalna
Esperase	Novozymes	7-12	10-80 (60)	Izrazito alkalna
Purafect	Genencor	(10)	(60)	Izrazito alkalna
Everlase	Novozymes	8-11	15-80	Visoka oksidativna stabilnost
Durazym	Novozymes	8-11 (10)	15-75 (45)	Visoka oksidativna stabilnost
Purafect OxP	Genencor	-	-	Visoka oksidativna stabilnost
BLAP	Henkel	-	10-60	Izrazito alkalna
Maxacal	Gist-Brocades	(11)	(60)	Izrazito alkalna
Maxatase	Gist-Brocades	7-10 (10)	(60)	Alkalna proteaza
Neutrase	Novozymes	6-8	10-65	Neutralan enzim
Maxapem	Henkel	(11)	(50)	Visoka oksidativna stabilnost

1980-ih počinju intenzivna ispitivanja DNK sekvenci kojima je kodirana sinteza subtilizinskih proteaza. Prva publikacija te vrste je objavljena 1983. godine u kojoj je opisana DNK sekvenca Subtilisin-a BPN' iz *B. amyloliquefaciens*. Nakon toga su usledile brojne studije DNK sekvenci producenata subtilizinskih proteaza što je u velikom broju slučajeva omogućilo da se na osnovu razlika u DNK i proteinskim sekvencama različitih subtilizinskih proteaza uoče različite funkcionalne regije što je popločalo put daljim modifikacijama enzima metodama usmerene mutageneze.⁹⁸

U tom smislu, veliki broj istraživanja je posvećen povećanju oksidativne stabilnosti subtilizina promenom odgovarajućih aminokiselinskih ostataka. Jedan od pionirskih pokušaja na ovom polju je postao školski primer racionalnog dizajna enzima. Naime, utvrđeno je da pod dejstvom oksidacionih agenasa dolazi do oksidacije sulfhidrilne grupe metionina na poziciji 222 (u blizini aktivnog centra) što posledično

dovodi do potpunog gubitka aktivnosti subtilizina. Zamenom ove aminokiseline drugom, značajno se povećava hemijska stabilnost enzima, kao i druge osobine značajne za primenu u detergentima. Prvi preparati povećane oksidativne stabilnosti dobijeni metodama proteinskog inženjerstva se pojavljuju na tržištu već ranih 1990-ih godina.

Do danas je istražena mogućnost mutacije većine aminokiselinskih ostataka BPN^o proteaze (*B. amyloliquefaciens*) i njihov uticaj na svojstva modifikovanog enzima. Pored svojstava značajnih za industriju detergenata, veliki broj istraživanja metodama usmerene evolucije i racionalnog dizajna, kao i hemijskim modifikacijama je bio posvećen ostvarivanju novih svojstva proteaza poput zavisnosti od Ca^{2+} , specifičnosti za supstrat, opšte proteolitičke aktivnosti i sl.¹⁰² Iako BPN^o proteaza nije našla industrijsku primenu, istraživanja na ovom polju pružila su fundamentalnu osnovu za slične biohemijske i genetičke manipulacije, kojima su menjana svojstva srodnih subtilizinskih proteaza u cilju dobijanja enzima za ovu industrijsku aplikaciju.

U patentnoj literaturi se mogu pronaći i različite varijante enzima za koje se tvrdi da poseduju bolje osobine od nativnih za primenu u detergentima. Dobijene varijante enzima su tako ispitivane sa aspekta stabilnosti u prisustvu oksidacionih materija ili smanjenja alergijskog potencijala, ali ispitivanje njihove funkcionalnosti u konkretnim uslovima pranja je ipak ostalo ograničeno, što zbog nedostatka standardizacije ovakvih testova, što zbog skromnog učinka modifikovanih enzima u odnosu na očekivani.¹⁰³

Drugi potencijalni producenti proteaza za industriju detergenata

Proizvodnja proteaza je suštinsko svojstvo svih mikroorganizama, ali nisu sve proteaze prepoznate kao enzimi od potencijalnog značaja za industriju. Pored svojstava enzima koje moraju da odgovaraju za datu aplikaciju, proizvodnja enzima mora da bude jednostavna i isplativa. Zato su enzimi koje mikroorganizmi proizvode ekstracelularno jedini od komercijalnog značaja. Zbog visoke katalitičke aktivnosti kao i visoke produktivnosti mikroorganizama koji ih sekretuju, sve komercijalne proteaze za primenu u detergentima su uglavnom poreklom iz *Bacillus* spp.

Međutim, kompleksnost zbog korišćenja patenata, kao i potraga za novim svojstvima enzima, dovela je do ponovnog skrininga mikroorganizama sa ciljem pronalaženja proteaza boljih performansi u detergentima. Potraga za takvim enzimima nije ograničena samo na subtilizinske proteaze, međutim, ni jedan novi enzim nije komercijalizovan u poslednje vreme.

Zbog tradicionalne primene *Bacillus* spp. proteaza u industriji detergenata, potraga za odgovarajućim proteazama među *Bacillus* spp. producentima je i dalje predmet opsežnih istraživanja.

Jaouadi i saradnici su tako ispitivali svojstva *Bacillus pumilus* CBS proteaze koja je pokazala visok stepen stabilnosti u prisustvu 5% Tween-80, 1% SDS i 10% H₂O₂ na osnovu čega su ukazali na potencijal primene ove proteaze u detergentima sa izbeljivačem.¹⁰⁴ Han i Damodaran su takođe proučavali stabilnost drugog soja *Bacillus pumilus* u prisustvu SDS-a, gde je ova proteaza pokazala značajno bolja svojstva od komercijalnog subtilizina Carlsberg.¹⁰⁵

Slična svojstva pokazala je i proteaza iz *Bacillus megaterium* RRM2. Naime, i ova proteaza zadržava visoku aktivnost u prisustvu Tween[®]-a 80, Triton[®]-a X-100 i SDS-a pri koncentracijama od 1% i 2% površinski aktivnih materija. Isti enzim je pokazao i relativnu oksidativnu stabilnost, kao i kompatibilnost sa velikim brojem komercijalnih detergenata poput Ariel i Henko u čijem prisustvu nakon sat vremena inkubacije zadržava 80-90 % aktivnosti.¹⁰⁶

Potruga za novim producentima proteaza obuhvatila je i mnoge *B. licheniformis* sojeve budući da ovoj vrsti pripada jedan od najčešćih proteaza za detergente- subtilizin Carlsberg. Tako je utvrđeno da veliki broj surfaktanata takođe ne narušava stabilnost *Bacillus licheniformis* RP1 proteaze, pa je i za ovaj enzim sugerisano da je potencijalno dobar izbor za primenu u detergentima. Naime, *B. licheniformis* RP1 proteaza bi se uspešno mogla inkorporirati u detergent koji bi sadržao Tween[®] 20 ili Triton[®] X 100, jer ovi surfaktanti i pri koncentraciji od 5 % w/v ne inaktiviraju ovaj enzima te on pokazuje relativnu aktivnost od 100% nakon jednočasovne inkubacije u prisustvu ovih surfaktanata. Njega u neznatnoj meri deaktiviraju SDS i H₂O₂ te u njihovom prisustvu pri koncentracijama od 0,5 i 2% redom, nakon sat vremena ovaj enzim gubi oko 30 %

aktivnosti. Takođe, Selami-Kamon (Sellami-Kamoun) i saradnici su ustanovili i visoku stabilnost *B. licheniformis* RP1 proteaze u prisustvu komercijalnih detergenata prisutnih na lokalnom tržištu. Tako je među paletom ispitanih detergenata pod uslovima relevantnim za proces pranja (koncentracija detergenta 7 mg/ml, 40 °C, nakon 1h) zadržana relativna aktivnost se kretala u rasponu od 80 do 90% u odnosu na kontrolu.¹⁰⁷

Odlična svojstva je pokazala proteaza koju proizvodi pripadnik iste vrste *Bacillus licheniformis* NH1 čija aktivnost takođe ostaje neizmenjena u prisustvu Tween®-a 20 ili Triton®-a X 100, dok je SDS i H₂O₂ deaktiviraju u manjoj meri nego *B. licheniformis* RP1 proteazu. Ova proteaza je pokazala bolja svojstva i veću kompatibilnost sa velikim brojem lokalnih detergenata u poređenju sa komercijalnim proteolitičkim preparatom Purafect®.¹⁰⁸

Proteazu nešto lošijih svojstava proizvodi *Bacillus licheniformis* MP1 izolovan iz zagađene morske vode. Ova proteaza, iako dosta stabilna u prisustvu istih nejonskih detergenata u koncentraciji od 5 % v/v (~95% aktivnosti nakon 1h na 40 °C), gubi više od 70 % aktivnosti u prisustvu H₂O₂ pod istim uslovima.¹⁰⁹

Interesantno ponašanje je pokazala i proteza koju proizvodi *Bacillus* sp. SM2014 za koji je analizom 16S sekvence potvrđeno da pokazuje najveću sličnost sa *Bacillus licheniformis*. Ovu proteazu u manjoj meri aktiviraju nejonski detergentsi Triton® X 100 i Tween® 80, dok je dodatkom SDS-a njena aktivnost povećana više od 3 puta. Nažalost, ova proteaza, sa druge strane, ne poseduje veliku oksidativnu stabilnost, jer gubi gotovo celokupnu aktivnost u prisustvu H₂O₂. Ova proteaza je pokazala različiti doprinos u pospešivanju uklanjanja proteinskih nečistoća u zavisnosti od tipa zaprljanja, temperature pranja, dužine trajanja tretmana i koncentracije enzima. Optimizacijom ovih parametara je uklanjanje nečistoća na bazi krvi, paradajz sosa i kurkume povećana u rasponu od 30 do 60% u odnosu na pranje samim detergentom.¹¹⁰

Dodapaneni (Doddapaneni) i saradnici su izolovali *Bacillus cereus* u otpadu klanice koji proizvodi proteazu koju takođe aktiviraju pojedine površinski aktivne materije poput SDS-a, Triton®-a X 100 i Tween®-a 80 (od 2 do 120%), ali nedostaju opsežnija ispitivanja koja bi obuhvatila utvrđivanje oksidativne stabilnosti ovog enzima,

kao i učinkovitost uklanjanja proteinskih nečistoća kojim bi se potvrdio potencijal primene ove proteaze u industriji detergenata.¹¹¹

Uvidom u literaturu može se videti i da novootkriveni soj *Bacillus cereus* SIU1 pokazuje isti obrazac ponašanja u prisustvu SDS-a, Triton®-a X 100 i Tween®-a 80. Naime, ovi surfaktanti pri koncentraciji od 1 % w/v povećavaju proteolitičku aktivnost i nakon 30 minuta inkubacije na 40 °C. Kuriozitet *B. cereus* SIU1 proteaze je oksidativna stabilnost koju pokazuje. Naime, pri nižim koncentracijama H₂O₂ i natrijum-perborata (0,1 i 1% v/) pod istim uslovima dolazi do povećanja aktivnosti ove proteaze u odnosu na kontrolu i do preko 20%. Čak i pri višim koncentracijama ovih oksidansa (5 i 10%) aktivnost *B. cereus* SIU1 proteaze ostaje visoka (>80%, izuzev u prisustvu 10% natrijum-perborata ~65%). Ipak, ispitivanje kompatibilnosti ove proteaze sa komercijalnim detergentima pokazalo je ograničeni uspeh pri koncentracijama detergenta koje odgovaraju realnim u procesu pranja, pri gore navedenim uslovima, ovaj enzim zadržava 50-76% aktivnosti na osnovu čega se ne može oceniti da je ovaj enzim pogodan za primenu u detergentima.¹¹²

Sa druge strane, visoko alkalna proteaza koju proizvodi drugi soj *B. cereus* je pokazala veliku stabilnost u komercijalnim detergentima zadržavajući više od 80% aktivnosti nakon sat vremena inkubacije u njihovom prisustvu na različitim temperaturama, dok je pokazano da proteaze primenjene u istim ispitivanim formulacijama zadržavaju značajno manje.¹¹³

Proteaze dobrih svojstava produkuju i druge *Bacillus* vrste. *Bacillus* sp. RKY3 izolovan iz zemlje, koji po homologiji 16S rRNK sekvenci DNK najviše odgovara *Bacillus subtilis*, proizvodi proteazu koju aktiviraju nejonski detergentsi, a specifično je to da je ista proteaza i do 20 % aktivnija u prisustvu oksidujućeg H₂O₂.¹¹⁴

Proteaza *Bacillus subtilis* DM-04 pokazala je izvesnu kompatibilnost sa komercijalnim detergentima, kao i sposobnost da delujući sama ukloni oko 30% nečistoća u vidu krvi. Kako se među ispitivanim detergentima nalaze i formulacije koje aktiviraju enzim, sigurno je da bi se on mogao uspešno primeniti kao aditiv istih formulacija.¹¹⁵

Proteazu iz *Bacillus circulans* aktiviraju nejonski detergentsi i H_2O_2 , a čak i nakon dvočasovne inkubacije sa paletom različitih komercijalnih detergenata ona zadržava >80 % aktivnosti.¹¹⁶ Ponekad se proteaze koju proizvode različiti sojevi mikroorganizama iste vrste mogu razlikovati u pogledu uticaja različitih faktora na njenu stabilnost i aktivnost. Visoku oksidativnu aktivnost pokazala je i proteaza drugog soja *Bacillus circulans* BM15, međutim ova proteaza pokazuje znatno lošija svojstva u pogledu stabilnosti u prisustvu istih detergenata gubeći ~30% aktivnosti već nakon 15 minuta inkubacije.¹¹⁷

Bacillus spp. kao obilni producenti alkalnih proteaza koje se tradicionalno koriste u detergentima su i najispitivaniji mikroorganizmi sa stanovišta pronalaska novih enzima za ovu namenu. U istraživačkoj literaturi se mogu pronaći i mnogi drugi primeri proteaza koju proizvode pripadnici ove vrste čija svojstva manje ili više odgovaraju za datu aplikaciju.¹¹⁸ Međutim, proteaze koje mogu naći primenu u ovoj oblasti mogu se pronaći i eksploatacijom drugih mikroorganizama.

Ekstremofilni mikroorganizmi su potencijalno dobri producenti enzima poboljšanih svojstava, koji mogu da odgovore teškim uslovima industrijske eksploatacije. Tako novootkriveni haloalkalofilni mikroorganizam, izolovan iz izrazito alkalnog i slanog zemljišta, proizvodi enzim koji je stabilan i diskretno aktiviran u prisustvu niskih koncentracija detergenata poput Triton[®]-a X 100, Tween[®]-a 80 i SDS-a. Ono što je specifično za ovaj enzim je da je on pokazao izuzetnu stabilnost u većini testiranih komercijalnih detergenata i nakon duže inkubacije. Tako je u velikom broju ispitanih detergenata, i nakon 24h, enzim zadržao preko 75% aktivnosti.¹¹⁹

Bakterija *Vibrio fluvialis* VM10 izolovana iz sedimenata nakupljenih u korenskom sistemu močvarnih biljaka u Indiji, proizvodi alkalnu proteazu stabilnu i aktivnu u širokom opsegu temperatura i pH, koja je pokazala visok stepen oksidativne stabilnosti. Naime i pri koncentracijama od 4 % H_2O_2 , aktivnost ove proteaze biva uvećana i do 35%.¹²⁰

Novootkriveni soj *Paecilomyces lilacinus* je takođe dobar izvor alkalne proteaze koja ostaje stabilna gotovo u svim ispitivanim formulacijama koje uključuju različite surfaktante, H_2O_2 i komercijalne detergente.¹²¹

Chen i Wang su izolovali bakteriju *Prevotella ruminicola* iz rumena teladi. Ovaj mikroorganizam je pokazao umerenu stabilnost u prisustvu različitih surfaktanata. Ipak, primena ovog enzima u detergentima je pokazala interesantan aspekt, budući da je najveći doprinos u uklanjanju proteinskih mrlja postignut u formulaciji na bazi Tween[®]-a 80 iako ovaj surfaktant nije povoljno uticao na stabilnost ispitivane proteaze.¹²²

Pored opisanih, za ovu namenu su ispitana i svojstva nekoliko *Aspergillus* spp. proteaza. Među ispitivanim vrstama, ističe se proteaza iz *A. parasiticus* koja je aktivna i stabilna (~100%) u toku jednočasovne inkubacije u prisustvu 2% Tween[®]-a 80, Triton[®]-a X-100 i SDS-a.¹²³ Dobra svojstva pokazuje i proteaza iz *A. clavatus* koju karakteriše solidna stabilnost u prisustvu 5% Tween[®]-a 80 i Triton[®]-a X-100.¹²⁴

Pseudomonas spp. su takođe prepoznati kao producenti proteaza dobrih svojstava za industriju. Primenljivost nekoliko *P. aeruginosa* sojeva za produkciju proteaza u detergentima je potvrđena na osnovu sposobnosti ovih enzima u uklanjanju mrlja na bazi krvi sa pamučnih tkanina.^{125,126}

Imajući u vidu aktuelnost problematike u svetu, kao i potencijalnu aplikativnu vrednost ovih enzima ne čudi činjenica da interesovanje za ovu oblast ne jenjava i gotovo neprekidno se objavljuju nove studije koje opisuju nove enzime poboljšanih svojstava za ovu namenu koje proizvode različiti mikroorganizmi.

5. Proizvodnja enzima

Enzimi (fermenti) su makromolekulska jedinjenja biološkog porekla, koloidne prirode, po hemijskoj građi prosti ili složeni proteini, koji omogućavaju odigravanje biohemijskih reakcija u organizmima. Kada ne bi bilo enzima, većina hemijskih reakcija u organizmima odvijala bi se veoma sporo, što je razumljivo jer se ove reakcije odigravaju na relativno niskim temperaturama i pri gotovo neutralnim pH vrednostima. Upravo zbog njihove uloge u različitim metaboličkim procesima, njihova proizvodnja je svojstvo različitih životnih formi-od virusa i mikroorganizama do biljaka, životinja i čoveka.

Ekspanzija industrijske primene enzima uslovila je potrebu za proizvodnjom velikih količina enzima tačno određenih svojstava što je rezultovalo rastom mikrobne proizvodnje enzima. Prednost mikrobnih enzima nad biljnim i životinjskim se pre svega ogleda u kratkom vremenu produkcije, jeftinim sirovinama za proizvodnju i visokim prinosima enzima. Za razliku od izolacije biljnih ili životinjskih enzima, mikrobna proizvodnja se odvija u strogo kontrolisanim uslovima, što omogućava dobijanje proizvoda ustaljenog kvaliteta i prinosa. Dalje, napredak u biotehnologiji omogućio je genetičke manipulacije kojima se lako i značajno povećavaju prinosi proizvedenih mikrobnih enzima, ili se menjaju strukture nativnih formi enzima što rezultuje promenom njihovih specifičnih svojstava i aktivnosti.

Sa druge strane, sirovine za dobijanje biljnih i životinjskih enzima najčešće nisu dostupne u zadovoljavajućim količinama, a pored geografskih, klimatskih ili sezonskih faktora koji ograničavaju njihovu raspoloživost, one su i predmeti nacionalnih poljoprivredno-agrarnih politika.

5.1. Mehanizam biosinteze enzima

Enzimi se sintetišu u ćelijama i njihova sinteza, kao i svih drugih proteina, genetički je određena. Aminokiseline od kojih je sastavljen enzim su povezane po tačno određenom redosledu, koji se identično ponavlja pri svakoj sledećoj sintezi. Promene u genima (mutacije) mogu da imaju za posledicu sintezu enzima različite aktivnosti ili bez aktivnosti-enzimopatije.

Enzimi su najčešće globularni proteini čiji je prostorni oblik određen intra- i intermolekulskim vezama, koji određuju njegovu trodimenzionalnu strukturu. Prostorni oblik u najvećoj meri određuje prirodu i katalitičku aktivnost enzima.

Prema mestu gde obavljaju svoju katalitičku ulogu, enzimi se dele na intracelularne i ekstracelularne. Intracelularni enzimi se mogu naći u svim ćelijskim organelama pa se prema subcelularnoj lokalizaciji nazivaju citoplazmatski, mitohondrijski, lizozomski itd. Njihov sadržaj i količina određeni su genetičkom konstitucijom ćelije, ali i uslovima sredine. Ekstracelularni enzimi su neophodni za hemijsku razmenu nutrijenata u podlozi kako bi ćelija mogla da ih koristi za sintezu sopstvenih komponenata.

Sinteza mikrobnih enzima, kao i drugih proteina vrši se u ribozomima u procesu koji se naziva transkripcija. Tokom procesa transkripcije, u jedru ćelije se vrši prepisivanje informacije o redosledu aminokiselina kodirane u DNK u molekul RNK prema principu komplementarnosti baza. Ovaj tip RNK koji nosi informaciju o redosledu aminokiselina u proteinu naziva se informaciona RNK (*messenger* RNK- mRNK). U mRNK, kao i u DNK, genetički otisak je zakodiran kao redosled nukleotida uređenih kao kodoni sačinjeni od tri baze. Svaki kodon kodira specifičnu aminokiselinu, izuzev stop kodona koji daje signal za zaustavljanje sinteze proteina. Informaciona RNK prenosi signal za proizvodnju proteina u citoplazmu do ribozoma, specifičnih katalitičkih kompleksa, gde se nastavlja sinteza proteina u procesu nazvanim translacija.¹²⁷ Enzimi se sintetišu na ribozomima koji mogu postojati u citoplazmi kao slobodne celine ili pričvršćeni za membrane endoplazmatičnog retikuluma. Slobodni

ribozomi sintetišu enzime potrebne za intracelularne funkcije, ribozomi pričvršćeni za endoplazmatične membrane sintetišu enzime koji se istiskuju u cisternalni prostor između slojeva retikuluma i odavde se eksportuju dalje.¹³

U procesu translacije, na osnovu redosleda nukleotida informacione RNK vrši se prevođenje u određenu sekvencu proteina. Poseban tip RNK, transportna RNK, vrši prenošenje aminokiselina do ribozoma. Ugradnja aminokiselina u ribozomu se vrši sve dok ribozom ne naiđe na stop kodon. Na ovaj način nastaje sirovi pre-proenzim koji je obično neaktivan ili slabo aktivan. Da bi ovako nastao polipeptidni lanac stekao katalitičku aktivnost, često su neophodne određene modifikacije. Ove post-translacione modifikacije najčešće podrazumevaju vezivanje kofaktora i/ili proteolitičku hidrolizu pojedinih sekvenci pre-proenzima.

Na nivou transkripcije, sinteza enzima se može pospešiti indukcijom enzima, na taj način što se u podlogu za gajenje mikroorganizma dodaje određena vrsta supstrata ili analoga supstrata. U prisustvu ovih supstanci mikrobne ćelije počinju da sintetišu enzime koji su potrebni za asimilaciju tih jedinjenja i/ili njihovu razgradnju. Najčešći induktori enzima su njihovi supstrati, ali ponekad i proizvodi ili intermedijari mogu indukovati sintezu enzima.

Sa druge strane, prisustvo lako iskoristivih izvora ugljenika i azota često inhibira sintezu enzima jer će mikrobne ćelije radi uštede energije sintetisati samo enzime neophodne za metabolizam najlakše iskoristivih nutrijenata.^{13,128} Ova pojava isključenja strukturnog gena enzima u prisustvu lako iskoristivih izvora ugljenika naziva se katabolička represija, a njen najbolji primer je katabolička represija glukozom.^{129,130} Drugi regulatorni mehanizmi proizvodnje enzima su represija konačnim proizvodom i represija povratnom spregom.¹³¹

Takođe, na sintezu enzima u početnom stadijumu može negativno da utiče prisustvo nekih RNAaza koje hidrolizuju mRNK ili njeni inhibitori. U post-translacionim modifikacijama, smanjenje prinosa enzima izazvaće nedostatak ili nedovoljna koncentracija kofaktora u hranljivoj podlozi.

Lipaze su uglavnom ekstracelularni enzimi što zahteva njihovu translokaciju kroz citoplazmatičnu membranu kod Gram-pozitivnih, i kroz periplazmu i spoljnu

membranu kod Gram-negativnih bakterija. Za ovaj transport neophodni su određeni protein transportni sistemi koji će usmeriti dati enzim u određenom pravcu. Do danas je poznato tri glavna puta sekrecije proteina, označenih kao tip I, II i III, pri čemu bakterijske lipaze koriste uglavnom dva puta. U nekim slučajevima, prinos aktivnih enzima zavisiće i od prisustva posebne vrste proteina koja se nazivaju čaperoni, koji učestvuju u postavljanju novosintetisanog enzima u nativnu konformaciju sprečavajući agregaciju enzima.

Tako, lipaze dobijene pomoću *P. aeruginosa* se izlučuju drugim tipom transporta koji uključuje i do 14 proteina pozicioniranih i na unutrašnjoj i na spoljnoj membrani. Važan aspekt sekrecije aktivnog enzima i ostvarene produkcije lipaza kod *Pseudomonas aeruginosa* je pravilan prostorni raspored u periplazmi kao preduslov efikasnog prelaza kroz spoljnu membranu.¹³² Da bi se ostvario takav prostorni raspored neophodno je prisustvo sternih čaperona označenih kao Lif proteini („lipase-specific foldases“).⁶⁶ Lif protein je periplazmatični protein vezan za unutrašnju membranu hidrofobnim N-terminalnim krajem i koji katalizuje promenu prostorne konformacije još uvek neaktivne lipaze. Međutim, još uvek nije poznato u kojoj fazi sazrevanja enzima ovaj protein deluje na srodnu lipazu. Nova istraživanja pokazuju da Lif proteini snižavaju energetska barijeru potrebnu za postavljanje konjugovanih enzima u nativni položaj pružajući suštinski potrebnu informaciju o sternom položaju aktivnog enzima igrajući ključnu ulogu i u ciljanju enzima do sekretornih aparata.¹³³

Ovo nije jedini tip specifičnog dejstva periplazmatičnih enzima kojom se izmenjuje nativna konformacija prvobitno sintetisanog enzima. Lipaze često sadrže disulfidne mostove koji se formiraju u periplazmi. U formaciji ovih veza posreduje kompleks enzima među kojima su tiol:disulfid oksidoreduktaza DsbA koja oksiduje Cys-SH ostatke pri stvaranju disulfidnih mostova i tiol:disulfid izomeraza DsbC koja izomerizuje pogrešno oksidovane disulfidne mostove.¹³⁴ U periplazmi se takođe javljaju i periplazmatične proteaze koje alternativno reaguju sa nepravilno formiranim enzimima. Tako, do smanjenja prinosa enzima može doći i usled dejstva intracelularnih, periplazmatičnih ili ekstracelularnih proteaza koji dovode do neželjene hidrolize sintetisanih enzima. Finalno, sekrecija enzima se vrši pomoću specifičnih prenosnih kompleksa koji grade pore na spoljnoj ćelijskoj membrani.

Sumirajući navedeno, jasno je da će na nivo produkovanih enzima uticati pre svega genetička konstitucija samog mikroorganizma-producenta, njegove fiziološke i metaboličke karakteristike, a oplemenjivanjem soja klasičnim postupcima selekcije ili primenom genetičkog inženjerstva, moguće je uticati na pojedine regulacijske mehanizme i time značajno povećati prinose enzima.

5.2. Mikrobna proizvodnja enzima

Industrijska proizvodnja mikrobnih enzima započela je otkrićem japanskog naučnika Jōkichi Takamine koji je na bazi drevne upotrebe plesni „koji“ u proizvodnji određenih prehrambenih proizvoda i aromatičnih aditiva baziranih na soji, proizveo prvi mikrobni enzimski preparat „Takadiastaza“ krajem 19. veka. Sam proces proizvodnje ovog enzimskog preparata amilaze je podrazumevao uzgajanje *Aspergillus niger* na vlažnim pirinčanim ili pšeničnim mekinjama, a ovaj preparat se i danas koristi kao digestivno sredstvo. Dvadeset godina kasnije, Boidin i Effront su razvili prvi proces proizvodnje enzima zasnovan na primeni bakterijske kulture (amilaza iz *Bacillus mesentericus*).¹³⁵

Od tada tehnološki progres na polju proizvodnje i primene mikrobnih enzima neprestano raste. Sve veći broj enzima nalazi svoju komercijalnu primenu, a razvoj metoda genetskog i proteinskog inženjerstva poslednjih dekada otvara još veće perspektive novim enzimskim postupcima jer omogućava dobijanje zadovoljavajućih prinosa biokatalizatora i modifikaciju nekih njegovih esencijalnih svojstava neophodnih za njegovu efikasnu industrijsku eksploataciju. Veliki podsticaj primeni enzima u industriji je predstavljen i osvajanjem tehnika imobilizacije enzima koji su omogućile kontinualnu i višekratnu upotrebu biokatalizatora. Do danas je razvijen veliki broj metoda i nosača za imobilizaciju enzima što je donelo niz prednosti u tehničkom smislu primene enzima i sveukupno smanjujući cenu enzimski baziranih tehnologija.

5.2.1. Odabir proizvodnog soja

Kako je proizvodnja enzima neophodna za normalno odvijanje metaboličkih procesa svih živih ćelija, pa tako i mikroorganizama, svaka pojedinačna mikrobna vrsta produkuje veliki broj različitih enzima. Međutim, u okvirima istih vrsta postoji veliki broj sojeva koji su se adaptirali na različite uslove života, pa se tako međusobno razlikuju po količinama produkovanih enzima kao i njihovim svojstvima.

Osnovni kriterijum za komercijalnu proizvodnju enzima je selekcija sojeva koji imaju kapacitet za proizvodnju najveće količine enzima željenih svojstava. Tako je pri odabiru mikrobnih producenata potrebno ispitati veliki broj mikroorganizama iz različitih izvora i sa različitih staništa. U tom smislu, ekstremofilni mikroorganizmi su potencijalno dobri producenti enzima poboljšanih svojstava koji mogu da odgovore teškim uslovima industrijske eksploatacije budući da ovi mikroorganizmi proizvode enzime visoke termalne i pH stabilnosti koji odgovaraju njihovim prirodnim staništima. Primenom selektivnih medijuma je moguće istovremeno ispitati veliki broj potencijalnih producenata enzima sa stanovišta produkcije, kao i aktivnosti željenih enzima. Prilikom selekcije enzima za konkretnu namenu, najbolje je svojstva selektivnog medijuma prilagoditi uslovima zadate aplikacije (pH, temperatura, prisustvo određenih hemikalija). Tako se testiranje (tzv. *skrining*) mikroorganizama sa stanovišta potencijalne produkcije hidrolitičkih enzima, kao i očitavanje ostvarenih aktivnosti može izvršiti uzgajanjem potencijalnih mikrobnih producenata na posebnim tipovima agara koji sadrže prirodne supstrate tih enzima. Sposobnost mikroorganizama da sintetiše željeni enzim se lako uočava na osnovu formiranih zona oko izraslih kolonija, a prečnik hidrolizovanih zona bi trebalo da odgovara nađenoj aktivnosti enzima. Tako se nivo produkcije lipaza/proteaza može utvrditi zasejavanjem potencijalnih producenata na tributirin/kazein agaru koji će pod dejstvom traženih enzima formirati manje ili veće zone.

Pored visoke produktivnosti i odgovarajućih svojstava enzima, mikrobni producent mora da zadovolji i druge kriterijume kao što su sposobnost rasta na jeftinim sirovinama, brz i obilan rast, sposobnost rasta u adaptiranim uslovima i sl. U zavisnosti od primene, mikrobni producent treba da zadovolji i određene zahteve koji se tiču bezbednosti upotrebe. Ovo svojstvo je od posebnog značaja za proizvodnju enzima koji su namenjeni prehrambenoj industriji. Takvi mikrobni producenti moraju biti

registrovani od strane FAD (American Food and Drug Administration) kao nepatogeni, netoksični mikroorganizmi koji generalno nemaju antibiotsku aktivnost, što podrazmeva njihov GRAS status (Generally Recognized as Safe). Danas se svega oko 50 mikrobnih vrsta nalazi na GRAS listi. Osim proizvodnog soja producenta, da bi enzimski preparat bio primenjen u proizvodnji hrane mora da zadovolji i niz strogih zahteva koji su definisani u nacionalnim pravilnicima o kvalitetu i drugim zahtevima za enzimske preparate za prehrambene proizvode.

5.2.2. Optimizacija sastava hranljive podloge

Ispitivanjem sastava fermentacionih podloga za biosintezu mikrobnih enzima, kao i uslova kultivacije mikroorganizama može značajno doprineti racionalizaciji proizvodnje industrijski važnih enzima. Optimalna hranljiva podloga treba da sadrži sve nutrijente koji će obezbediti dobar rast mikroorganizma i visok prinos enzima.

Kako uticaj procesnih parametara i sastava hranljive podloge zavise od proizvodnog mikroorganizma, kao i vrste enzima, oni se moraju odrediti i optimizovati za svaki pojedinačan slučaj.

Uopšteno, najvažniji parametri proizvodnje enzima su vrsta i koncentracija ugljenih hidrata, proteina, neorganskih soli, induktora, vitamina i faktora rasta u hranljivoj podlozi, kao i njihovi međusobni odnosi. Pored toga, modifikovanje regulatornih puteva biosinteze enzima sa ciljem povećanja prinosa može biti i posledica manipulacije procesnim parametrima produkcije, pa tako pH sredine, temperatura, mešanje, koncentracija rastvorenog kiseonika, kao i niz drugih faktora figurišu u ukupnoj postignutoj produktivnosti mikroorganizma. Treba imati u vidu da se uslovi koji obezbeđuju optimalan rast mikroorganizama često ne poklapaju sa onim u kojim se postižu optimalni prinosi enzima. Ovo je posebno izraženo kod sinteze nekonstitutivnih enzima čija je uloga da potpomognu asimilaciju hranljivih materija hidrolizujući krupne molekule do njihovih sastavnih činioca koje ćelije mogu da absorbuju. S obzirom na to da mikrobne ćelije ne poseduju mehanizme brze adaptacije u uslovima izmenjene pH, rast, a konsekvntno i proizvodnja enzima su značajno uslovljeni pH sredinom u mikrookolini ćelije.

U zavisnosti od tehnike gajenja mikroorganizma, hranljive podloge za rast mogu biti čvrste ili tečne. Tehnika gajenja na čvrstim podlogama ima uporište u dugoj tradiciji fermentativnih procesa sa Dalekog istoka, a danas se još uvek često koristi za kultivaciju nekih tipova plesni. Danas je ovaj tip produkcije enzima potisnut submerznim načinom proizvodnje koji omogućava niz prednosti poput lake kontrole procesnih parametara, efikasnog mešanja i prenosa kiseonika i malog rizika od kontaminacije. Samim tim i podloge za rast mikroorganizama mogu biti tečne (sadržaj suve materije do 10%) ili čvrste (navlažene čvrste materije sa visokim sadržajem suve materije).

Budući da su razlike između ovih tehnoloških postupaka evidentne, jasno je da način proizvodnje nosi izvesne osobenosti koje figurišu u ostvarivanju ukupne enzimske aktivnosti. Tako, efikasan prenos toplote i kiseonika u površinskom postupku zavisi prvenstveno od veličina čestica i vlažnosti početnog materijala, što je jedan od faktora prilikom optimizacije podloge za ovaj tip fermentacije.

Prilikom spravljanja hranljivih podloga za produkciju enzima, kao izvori nutrijenata mogu poslužiti različite komponente hemijski određenog ili neodređenog sastava, od kojih neke materije mogu predstavljati i agro-industrijski otpadni materijal ili nusproizvode. Pod prirodnim podlogama neodređenog sastava se podrazumevaju proizvodi životinjskog ili biljnog porekla koji imaju složen neodređen hemijski sastav. U sastavu ovih podloga se najčešće nalaze svi potrebni nutrijenti za rast i razviće mikroorganizama. Takođe, ovaj materijal je najčešće jeftin i široko dostupan. Sintetske podloge su takve podloge u čiji sastav ulaze određena hemijski čista jedinjenja uzeta u tačno određenim koncentracijama.

Hranljiva podloga treba da zadovolji određene kvalitativne zahteve u pogledu sadržaja i tipa ugljenih hidrata, izvora azota, mikroelemenata, vitamina i drugih faktora rasta. Kao izvori ugljenika mogu se iskoristiti monosaharidi, disaharidi ili polisaharidi, ali i različita ulja.

Kao izvori azota mogu se koristiti različita organska i neorganska jedinjenja koje mikroorganizam može da asimiluje, najčešće su to amonijumove soli, aminokiseline i

različiti proteinski preparati. Treba imati u vidu da lako iskoristivi izvori azota, kao i lako iskoristivi ugljeni hidrati, mogu izazvati represiju gena za sintezu željenog enzima.

Ako se kao izvor ugljenika koriste ulja, od presudnog značaja za većinu mikroorganizama ima stepen disperznosti ulja u bujonu. Konkretno, brojne studije fokusirane na optimizaciju postupka produkcije lipaza su utvrdile da se sa povećanjem disperznosti lipida povećava i lipolitička aktivnost. Odgovarajuća disperziona sredstva ne bi smela da budu toksična za procesni mikroorganizam, ni da deluju inhibitorno na sam enzim. U tu svrhu mogu se upotrebljavati različiti monogliceridi, lecitin, alifatični alkoholi i dr.²²

Budući da se navedeni čionoci odnose na definisanje nutritivnih zahteva mikroorganizama, koji obezbeđuju optimalnu produkciju enzima uopšteno, jasno je da oni široko variraju u zavisnosti od pojedinačnih zahteva selekcionisanog soja.

Veliki broj fermentacionih procesa za dobijanje lipaza i proteaza pomoću različitih mikroorganizama su poznati i opisani u opštoj i patentnoj literaturi. Lipaze od potencijalnog komercijalnog značaja produkuju veliki broj bakterija (poput *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* spp.) kao i veliki broj plesni i kvasaca (poput *Candida*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Mucor* spp.). Generalno, sumirajući literaturne rezultate koji se tiču optimizacije fermentacionih medijuma sa ciljem pospešivanja sinteze mikrobnih lipaza, uočava se njihova inducibilna priroda koja ukazuje na to da su geni neophodni za proizvodnju ovog enzima nalaze u okviru jednog operona sa pozitivnom regulacijom.¹³⁶

Sam mehanizam indukcije nije do sada u potpunosti razjašnjen, budući da se tip induktora razlikuje u zavisnosti od proizvodnog mikroorganizma. Kao induktori mogu poslužiti različita ulja ili slobodne masne kiseline. Iako u pojedinim slučajevima postoji nedvosmislena veza između uticaja tipa masne kiseline (slobodne ili estarski vezane u trigliceridu) koja bi sugerisala strogu specifičnost ćelijskih receptora koji pokreću biološki odgovor prema masnokiselinskom profilu induktora, ovo ne mora biti pravilo. Tako primera radi, literaturni podaci pokazuju da su pojedini mikroorganizmi snažno stimulisani sa aspekta produkcije lipaza u podlogama koje sadrže oleinsku kiselinu ili maslinovo ulje koje je u najvećoj meri sadrži.¹³⁷⁻¹³⁹ Ovaj podatak upotpunjuje činjenica

da sličan efekat mogu pokazivati i određene površinski aktivne materije koje predstavljaju estre oleinske kiseline.

Sa druge strane, pojedine studije pokazuju da nivo sintetisanog enzima može značajno varirati ukoliko masna kiselina nije u odgovarajućem obliku. Ovaj podatak najbolje ilustruje primer biosinteze lipaze iz *Candida rugosa*, koju stimuliše dodatak slobodne oleinske kiseline, dok je u obliku triglicerida ili ulja sa njegovim visokim sadržajem ispoljeno inhibirajuće dejstvo na produktivnost ovog mikroorganizama.¹⁴⁰ Sa druge strane, postoje i suprotni primeri, poput indukcije biosinteze lipaze iz *Yarrowia lipolytica* maslinovim uljem i inhibicije u prisustvu slobodne oleinske kiseline ili produkcije lipaze *Pseudomonas* Lip35, čiju proizvodnju pospešuju isključivo sintetski estri oleinske kiseline.^{141,142}

U najvećem broju slučajeva dodatak malih količina površinski aktivnih supstanci kao što je Tween ili SPAN značajno povećava produkciju lipaza. Budući da su ove površinski aktivne materije hemijski gledano estri oleinske kiseline, nejasno je da li ove supstance deluju poput drugih supstrata lipaza koji indukuju njenu biosintezu. Međutim, generalno se smatra da površinski aktivne materije nisu pravi induktori lipaze, već da se njihov uticaj pre svega ogleda u povećanju permeabilnosti ćelijske membrane olakšavajući transfer supstanci u i iz ćelije. Izvesni autori takođe smatraju da ove supstance blokiraju specifične signalne receptore na površini ćelije koji po zasićenju daju signal za prestanak sinteze enzima.¹³⁶

Sagledavanjem literaturnih podataka koji se tiču optimizacije procesa produkcije proteaza se takođe uočava da se u najvećem broju slučajeva biosinteza ovog enzima može okarakterisati kao inducibilna, budući da najčešće zahteva proteine ili polipeptide kao jedine izvore azota za efikasnu sintezu enzima.¹⁴³ Izbor organskog azota se mora prilagoditi u zavisnosti od proizvodnog mikroorganizma, budući da aminokiselinski sastav igra značajnu ulogu u indukciji/represiji sinteze proteaza na nivou transkripcije. Tako dejstvom produkovanih proteaza prilikom asimilacije organskih izvora azota može doći do oslobađanja aminokiselina kojima se pripisuje represivno dejstvo, poput hidrofobnog tirozina, fenilalanina ili prolina, koji umanjuju prinos ili potpuno zaustavljaju biosintezu enzima.^{144,145}

Na osnovu svega rečenog, jasno je da se pažljivim izborom sastava hranljive podloge i uslova kultivacije može uticati na regulacijske mehanizme i povećati prinos enzima. Svi parametri se moraju optimizovati u svakom pojedinačnom slučaju budući da prvenstveno zavise od samih producenata, ali i željenih enzima.

6. Materijali

U ovoj doktorskoj disertaciji kao komponente za pripremu hranljivih podloga korišćeni su: ekstrakt kvasca, pepton I, sladni bujon, hidrolizat kazeina, glukoza, maltoza, urea i agar koje proizvodi Institut za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“, Beograd. Pored navedenog, potrebni mikronutrijenti su obezbeđeni u vidu dodatka sledećih soli: KH_2PO_4 (E. Merck, Darmstadt), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Kemika, Zagreb, Hrvatska), NaCl (Lach-ner, Neratovice, Češka). Kao induktori za pospešivanje biosinteze lipaza dodavani su suncokretovo ulje (Dijamant, Srbija), maslinovo ulje (Ybarra, Španija), tributirin (Sigma-Aldrich, SAFC, Italija) i oleinska kiselina (Alfa Aesar, Karsruhe, Danska). Za vizuelizaciju ostvarivane lipolitičke aktivnosti u hranljivim podlogama korišćen je Rhodamin B koji proizvodi Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Nemačka).

Ispitivanje lipolitičke aktivnosti je vršeno spektrofotometrijski na bazi hidrolize *p*-nitrofenil-palmitata (Alfa Aesar (SAD)) rastvorenom u izopropanolu (Zorka Pharma, Šabac, Srbija). Test proteolitičke aktivnosti je vršen na osnovu hidrolize azo-kazeina (Sigma-Aldrich, Biochemika, St. Louis, SAD).

Stabilnost proizvedenih enzima je praćena u rastvorima sledećih površinski aktivnih materija: Tween 80, natrijum-dodecilsulfat (SDS), natrijum-dodecilbensensulfonat (SDBS), Triton[®] X-100, Kapanox[®], BTC[®] 50E i Lutensol[®] XP80. Strukture ovih surfaktanata, neke njihove fizičko-hemijske karakteristike i proizvođači dati su u tabeli . Oksidacioni agensi korišćeni u ovoj disertaciji, vodonik-peroksid, proizveden u fabrici Zorka Pharma (Šabac, Srbija), i natrijum-hipohlorit, proizveden u fabrici Kemika (Zagreb, Hrvatska). U radu je takođe ispitana stabilnost enzima u prisustvu komercijalnih detergenata prisutnih na tržištu Srbije, i to: Perwoll[®] i Persil[®] (Henkel Merima, Srbija) i Tide[®] i Ariel[®] (Procter & Gamble, Rumunija). Efekat odmašćivanja je utvrđivan na bazi uklanjanja trioleina (Fluka, Buch, Belgija).

Tabela 6.1. Hemijske strukture, molekulske mase i neke fizičko-hemijske karakteristike i proizvođači ispitivanih surfaktanata

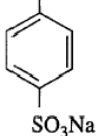
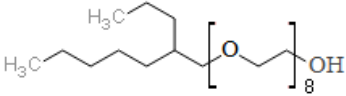
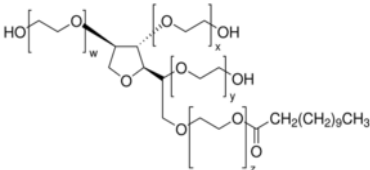
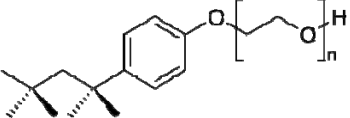
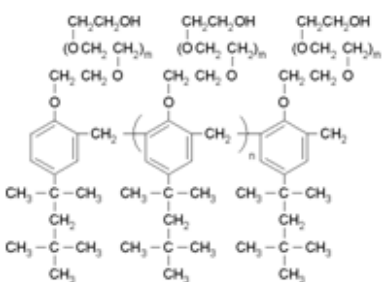
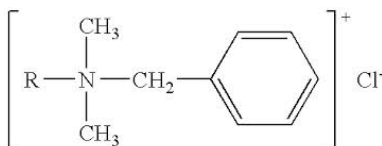
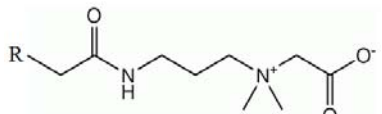
surfaktant	tip/strukturna formula	n/R	MW, g mol ⁻¹	HLB	CMC g L ⁻¹	Proizvođač
SDS	anjonski/ natrijum-dodecilsulfat 	R=12	288.4	40	2.2 g/L	Sigma-Aldrich, St Louis, SAD
SDBS	anjonski/ natrijum-dodecilbenzensulfonat CH ₃ —(CH ₂) _x —CH—(CH ₂) _y —CH ₃ 	7-10 (x+y)	348,48	-	0,1 g/L	Sigma-Aldrich, St Louis, SAD
Lutensol [®] XP 80	nejonski/etoksilovani masni alkohol 	8/10	500	14	0.95 g/L	BASF, Germany
Tween [®] 20	nejonski / Polyoxyethylene sorbitan monolaurate 	20 (x+y+z+w)	1228	16.7	77.21 mg/L	Sigma-Aldrich, St Louis, SAD
Triton [®] X-100	nejonski/ C ₁₄ H ₂₁ (OC ₂ H ₄ O) _n 	9-10	647	13.6	0.143 g/L	Fluka, Buchs, Švajcarska

Tabela 6.1. nastavak

surfaktant	tip/strukturna formula	n/R	MW, g mol ⁻¹	HLB	CMC g L ⁻¹	Proizvođač
Triton WR-1339 (Tyloxapol)		m=6-8 n<5	4500	13,2	0,038	Sigma- Aldrich, St Louis, SAD
BTC® 50	Kvaternarna so/ n-alkil dimetil amonijum hlorid	12-18	360,4	-	1,4 g/L	Stepan, Nemačka
						
Kapanox BC-30	Amfoterni/betain	12-18	350	-	-	Kapachim S.A., Grčka
						

HLB-hidrofilno-lipofilni balans; MW-molekulska masa; CMC- kritična micelarna koncentracija.

Priprema pufera koji su korišćeni u raznim fazama eksperimentalnog rada obuhvatila je sledeće soli i hemikalije: KH₂PO₄ (E. Merck, Darmstadt); Tris (Hemo-moss, Beograd, Srbija); K₂HPO₄, Na₂CO₃, NaHCO₃, (Zorka Pharma, Šabac, Srbija);

natrijum-citrat (Alkaloid, Skoplje, Makedonija); natrijum-hidroksid (Lach-ner, Neratovice, Češka) i hlorovodonična kiselina (Zorka Pharma, Šabac, Srbija).

Identifikacija mikrobnih producenata je izvršena na osnovu homologije genomskih sekvenci kojim je kodirana sinteza 16S ribozomske subjedinice. Prečišćavanje DNK i amplifikacija gena je vršena uz korišćenje gotovih paketa DNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany), GoTaq[®] qPCR, QIAquick[®] PCR Purification Kit koje proizvodi Qiagen, Holandija.

Od instrumenata, u ovom radu korišćeni su:

- termostatirani šejkeri (Kühner i IKA 4000i),
- termostatirano vodeno kupatilo sa mešanjem (Memmert),
- centrifuga (Sigma),
- UV-VIS spektrofotometar (Ultrospec 3300pro, Amersham Biosciences),
- refleksioni spektrofotometar (Datacolor SF 300),
- GeneAmp 2700 PCR Cyclor (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

7. Metode

7.1. Inicijalni skrining lipolitičkih mikroorganizama

Selekcija proizvodnog mikroorganizma izvršena je zasejavanjem velikog broja različitih vrsta mikroorganizama na tributirin agaru i agaru sa maslinovim uljem. Ovi selektivni medijumi, koji omogućavaju ispitivanje sposobnosti mikroorganizma da proizvodi ekstracelularnu lipazu, su pripremljeni tako što je u osnovne medijume (0,5% (w/v) Pepton I; 0,3% (w/v) ekstrakt kvasca; 1,5% (w/v) agar)) dodavano po 0,1% (w/v) tributirina/maslinovog ulja. Nakon homogenizacije ulja u podlogama, one su sterilisane (30 minuta, 1,2 bar, 121 °C) i razlivene u Petri šolje.

Kako je tributirin (triglicerid estar buterne kiseline) najjednostavniji triglicerid koji se javlja kao sastojak prirodnih masti i ulja, pod dejstvom lipaze dolazi do njegove hidrolize. Takođe, da bi se uvideo i afinitet proizvedenog enzima ka masnim kiselinama dužih lanaca, ispitana je aktivnost koju ovi mikroorganizmi pokazuju na agaru koji sadrži maslinovo ulje kao supstrat.

Pojava obezbojenih zona oko izraslih kolonija nakon inkubacije ($t=72\text{h}$, na 30°C) mikroorganizma je ukazala na produkciju ekstracelularne lipaze.

Potvrda da je navedena zona aktivnosti posledica dejstva lipaza, potencijalni mikroorganizmi su zatim uzgajani na hranljivom agaru obogaćenim sa 1% v/v maslinovog ulja i indikatorom Rhodamine B (0,001 % w/v). Nakon trodnevne kultivacije mikroorganizama na ovom medijumu na 30 °C, agarne ploče su osvetljavane pod UV svetlošću. Fluorescirajuće/narandžaste zone vidljive pod ovim uslovima, pokazatelj su da je ispitivani mikroorganizam pravi producent lipaze, odnosno, može se isključiti da su nastale bistre zone pokazane u prvom medijumu posledica dejstva esteraza ili drugih kiselih metabolita.

7.2. Inicijalni skrining proteolitičkih mikroorganizama

Primarni skrining proteolitičke aktivnosti je izvršen uzgajanjem mikrobnih sojeva na mlečnom kazein agaru.

Nakon trodnevne kultivacije ovih sojeva na selektivnom medijumu, petri šolje sa izraslim kolonijama su prelivene 20% rastvorom trihlorsirćetne kiseline i ostavljene 10 minuta na 37 °C. Nakon koagulacije nehidrolizovanih belančevina u medijumu, zone hidrolizovanih proteina pod dejstvom proteaza se očitavaju kao bistre zone oko izraslih kolonija.

Mlečni kazein agar

Obrano mleko	50 % v/v
kazein	5 g/l
ekstrakt kvasca	3 g/l
dekstroza	1 g/l
agar	15 g/l

7.3. Proizvodnja mikrobnih lipaza

Ispitivanje sposobnosti odabranih sojeva za sintezu lipaze/proteaze vršeno je praćenjem aktivnosti enzima i kinetike mikrobnog rasta u kompleksnim podlogama sledećih sastava:

<i>Yarrowia lipolytica</i> ¹⁴¹		<i>Candida rugosa</i> ¹⁴⁶		<i>Candida utilis</i> ¹⁴⁷	
Glukoza	20 g/l	Maltoza	10 g/l	KH ₂ PO ₄	1 g/l
Urea	2 g/l	Pepton I	5 g/l	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g/l
Maslinovo ulje	10 g/l	Urea	1 g/l	Maltoza	5 g/l
KH ₂ PO ₄	1 g/l	Ekstrakt kvasca	3 g/l	Hidrolizat kazeina	20 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g/l	Sladni bujon	3 g/l	Tween 80	1 g/l
NaCl	0,1 g/l	Maslinovo ulje	20 g/l	Oleinska kiselina	12 g/l
Tween 80	0,5 ml/l	Tween 80	0,5 ml/l		

Rhizopus oryzae

Maslinovo ulje	20 g/l
Pepton I	5 g/l
KH ₂ PO ₄	1 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g/l
Tween 80	0,5 ml/l

*Pseudomonas putida*¹⁴⁸*Pseudomonas aeruginosa*

Pepton I	10 g/l
Ekstrakt kvasca	5 g/l
NaCl	5 g/l

(Luria-Bertani podloga (LB))

Sve podloge su sterilisane na 121°C, u trajanju od 30 minuta. Za zasejavanje su korišćena 24 satna mikrobna kultura u sladnom bujonu (*C. utilis*, *C. rugosa*, *Y. lipolytica*) ili LB podlozi (*P. putida*, *P. aeruginosa*). Količina inokuluma nije varirana, i uvek je iznosila 1%.

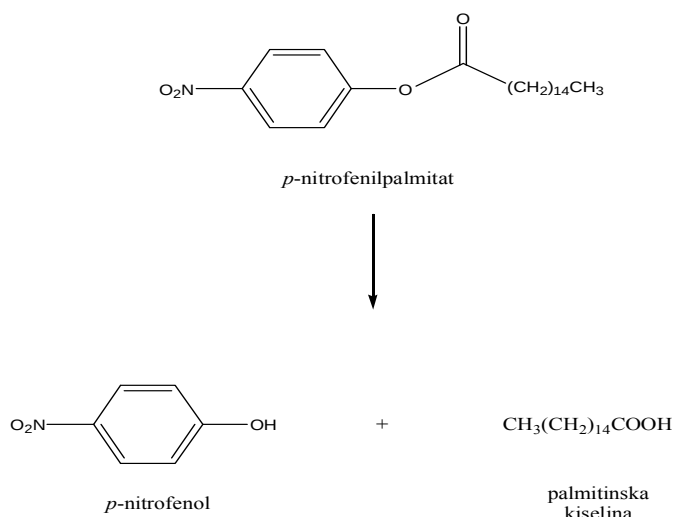
Fermentacija je izvođena u erlenmajerima zapremine 50 ml u tresilici pri brzini od 200 rpm, na temperaturi od 30 °C u trajanju od 5 dana.

Nakon fermentacije, iz erlenmajera je izvađeno po 5ml alikvota pod sterilnim uslovima za određivanje rasta mikroorganizama brojanjem ćelija odgovarajućeg razblaženja zasejavanjem na sladnom ili hranljivom agaru.

Ostatak uzorka je centrifugiran na 10 000 o min⁻¹ tokom 10 minuta. Supernatant je iskoršćen za ispitivanje lipolitičke aktivnosti spektrofotometrijskom metodom (poglavlje 7.4), proteolitičke aktivnosti (poglavlje 7.7) i količine proteina metodom po Lowry-u (poglavlje 7.8).

7.4. Ispitivanje lipolitičke aktivnosti

Za ispitivanje lipolitičke aktivnosti u svim eksperimentima korišćena je metoda koja se zasniva na spektrofotometrijskom određivanju koncentracije *p*-nitrofenola koji nastaje u reakciji hidrolize *p*-nitrofenil palmitata. Ova reakcija katalizovana je lipazom.



Supstrat je pripremljen mešanjem rastvora *p*-nitrofenil palmitata (30 mg *p*-NFP-a u 10 ml izopropanola) i 90 ml 0,05M Sorensenovog fosfatnog pufera (pH 8,00). Aktivnost je ispitana na 37 °C tako što se 100 µl uzorka mešalo sa 900 µl supstrata. Aktivnost je merena praćenjem promene apsorbancije u toku prva 3 minuta reakcije na 410 nm. Količina nastalog *p*-nitrofenola određena je na osnovu Lamber-Berovog zakona po kome je:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (\text{odnosno } \Delta A = \varepsilon \cdot \Delta c \cdot l)$$

gde je *A*- apsorbancija; ε -molarni koeficijent apsorpcije; *c*-koncentracija supstance i *l*-dužina kivete.

Jedinica enzimske aktivnosti (IU) je definisana kao količina enzima koja oslobađa 1 µmol *p*-nitrofenola po minuti ($\varepsilon=1500$ l/mol cm) pri opisanim uslovima.¹⁴⁹

7.5. Ispitivanje temperaturnog profila dobijene lipaze

Da bi se odredio temperaturni profil dobijenih enzima, primenjena je modifikacija prethodno opisane metode za određivanje lipolitičke aktivnosti. Supstrat i enzim su odvojeno preinkubirani na ispitivanim temperaturama, i to: 4, 15, 30, 37, 45, 50, 60, 65, 70, 80 i 85 °C. Reakcija je započinjana mešanjem 20 µl enzima sa 980 µl temperiranog supstrata. Količina nastalog *p*-nitrofenola je merena nakon 10-minutne inkubacije ove reakcione smeše na odgovarajućim temperaturama, a određivana je spektrofotometrijski uz slepu probu za svaku ispitivanu temperaturu posebno.

7.6. Ispitivanje pH profila proizvedene lipaze

Optimalna pH vrednost ispitivanih enzima je određivana prethodno opisanom metodom za određivanje lipolitičke aktivnosti, pri čemu su za pripremanje supstrata korišćeni sledeći puferi koncentracije 50 mmol/dm³: citratni (pH=5,00), fosfatni (pH=6,00; 6,50; 7,00), Tris-HCl (pH=8,00; 9,00) i bikarbonatni pufer (pH=8,00; 9,00).

7.7. Ispitivanje proteolitičke aktivnosti

Proteolitička aktivnost određivana je u reakciji hidrolize kazeina metodom koju su opisali Sarath i saradnici.¹⁵⁰ Kao supstrat za određivanje proteolitičke aktivnosti korišćen je azokazein- kazein hemijski modifikovan sulfanilnom kiselinom. Hidrolizom ovakvog kazeina, dolazi do otpuštanja azo boje u reakcionu smešu što se detektuje praćenjem apsorbance na 440 nm.

Reakcija je izvođena tako što je 75 µl uzorka pomešano sa 125 µl 2% (w/v) rastvora azokazeina u 50mM Tris-HCl puferu pH 9.0. Reakcione smeše su inkubirane na 37 °C u trajanju od 30 minuta. Nakon toga, reakcija je zaustavljena dodatkom 600 µl 10% (w/v) rastvora trihlorsirćetne kiseline.

Ovako pripremljene epruvete sa reakcionim smešama su ohlađene u ledenom kupatilu 10 minuta kako bi se pospešilo uklanjanje precipitata, nakon čega je njihov sadržaj centrifugiran 10 minuta pri brzini od 8000 o min^{-1} .

Ovako dobijen supernatant (600 μl) pomešan je sa 700 μl 1M NaOH i izmerena je apsorbancija na 440 nm.

Za svaki uzorak je posebno pripremljena i slepa proba na isti način kao i uzorci izuzev što je rastvor trihlorsirćetne kiseline pomešan sa uzorkom pre dodatka supstrata.

Jedinica proteolitičke aktivnosti definisana je kao količina enzima potrebna za promenu apsorbancije od 1, na 440 nm u kiveti dužine 1 cm pri gore opisanim uslovima.¹⁵¹

Utvrđivanje temperaturnog optimuma proizvedene proteaze je vršeno na isti način izuzev što su reakcione smeša inkubirane na sledećim temperaturama 4, 15, 30, 37, 45, 50, 60, 65, 70, 80 i 85 °C. Kako bi se utvrdio pH optimum, metoda je modifikovana tako što je u pripremi substrata Tris-HCl pufer zamenjen sledećim puferima (50 mM): Tris-HCl pufer (pH 7-9) i karbonatni pufer (pH 9-11).

7.8. Određivanje ukupnih proteina metodom po Lowry-u

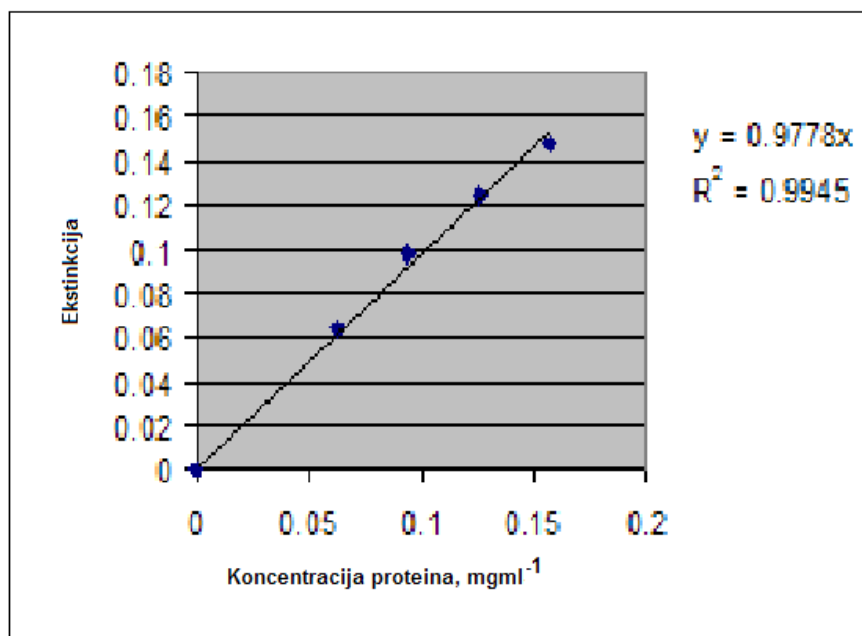
Određivanje ukupnih proteina izvršavano je metodom po Lowry-u koja se zasniva na građenju obojenih proizvoda aromatičnih amino kiselina sa Folin-Ciocalteu-ovim reagensom u kombinaciji sa biuretskom reakcijom za peptidne veze. Koncentracija nastalih obojenih proizvoda se određuje spektrofotometrijski. Sa reagensom Folin Ciocalteu-a pretežno reaguju amino kiseline koje sadrže grupu fenolnog karaktera kao što su tirozin i triptofan. Velika osetljivost metode omogućava da se odredi 10^{-5} do 10^{-4} g proteina u probi. Reakcija je jednostavna za izvođenje, ali njen nedostatak je njena specifičnost za tirozin, tako da se intezitet boje menja u zavisnosti od aminokiselinskog sastava proteina. Na razvijanje boje takođe može da utiče veliki broj supstanci. Zbog toga je potrebno imati u vidu da pri određivanju standardne krive korišćeni rastvarač treba da sadrži iste komponente kao i uzorci koji se analiziraju. Prilikom određivanja proteina, kao standardni protein korišćen je goveđi serum albumin.

*Postupak:***1. Priprema reagensa**

- Reagens A: 2% rastvor Na_2CO_3 u 0.1M NaOH,
- Reagens B: 1% rastvor $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ u destilovanoj vodi,
- Reagens C: 2% K, Na tartarat u destilovanoj vodi,
- Reagens D: Pripremljen je mešanjem 1ml reagensa B i 1ml reagensa C, a zatim se pomešani rastvori dopune reagensom A do 100ml neposredno pre upotrebe,
- Reagens F: Komercijalni Folin-Ciocalteu reagens.

2. Određivanje standardne krive za određivanje sadržaja proteina.

Standardna kriva se određivala pre svake serije eksperimentalnih merenja. Standardni rastvori u opsegu od 0,1 do 0,5 mg ml^{-1} su se dobijali razblaživanjem osnovnog vodenog rastvora goveđeg serum albumina koncentracije 1 mg ml^{-1} . U epruvete su dodavane određene zapremine osnovnog rastvora mikropipetom (0,1 – 0,5 ml) i razblaživane sa destilovanom vodom tako da je ukupna zapremina bila 1 ml. U rastvore je zatim dodavano 2 ml reagensa D i nakon mešanja rastvori su ostavljeni da stoje 10 min na sobnoj temperaturi. Posle toga, dodavano je 0,2 ml reagensa F i sadržaj epruvete je dobro promešan. Uzorci su ostavljani 45 min na sobnoj temperaturi da se razvije plava boja čija se apsorbancija merila spektrofotometrijski na 520 nm. Iz očitanih vrednosti dobijane su standardne krive.



Slika 7.1. Standardna kriva za određivanje proteina

7.9. Određivanje stabilnosti lipaze i proteaze u prisustvu površinski aktivnih materija, oksidacionih agenasa i komercijalnih detergenata

Da bi se ispitala aktivnost lipaza i proteaza u prisustvu različitih aditiva, sirovi enzimski preparat je razblažen puferom u odnosu propisanim prethodno opisanom metodom za određivanje lipolitičke aktivnosti. U pufer je prethodno dodata odgovarajuća količina površinski aktivnih materija (oksidacionih agenasa) tako da je finalna koncentracija ovih aditiva u ispitivanoj smeši sirovog enzimskog preparata, pufera i PAM-a (oksidacionog agenasa) iznosila 2% (w/v ili v/v). Natrijum-dodecilbenzolsulfonat (SDBS) i natrijum-dodecilsulfat (SDS) su korišćeni u finalnoj koncentraciji od 0,1% (w/v). Takođe, lipolitička aktivnost je ispitana i u prisustvu 2% (w/v) različitih komercijalnih detergenata. U tom slučaju, smeša pufera sa detergentom je prokuvana u trajanju od 5 minuta, kako bi se denaturisali postojeći enzimi u detergentu, a sirovi enzimski preparat je dodat nakon hlađenja ovako pripremljenog uzorka.

Istovremeno je u svim slučajevima rađen i kontrolni uzorak, pripremljen na isti način, razblaženjem sirovog enzimskog preparata puferom, ali bez dodatka aditiva. Aktivnost enzima u prisustvu ispitivanih aditiva je preračunata u odnosu na kontrolni uzorak koji je uzet kao 100%.

Eksperimenti su izvedeni u termostatisanom vodenom kupatilu sa mešanjem (120 o min^{-1}) na temperaturi od $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ u toku 2,5 sata. Na svakih pola sata uzimani su uzorci u kojima je određena lipolitička aktivnost spektrofotometrijskom metodom dodatkom rastvora *p*-nitrofenil-palmitata u izopropanolu u odgovarajućem odnosu koji je određen prethodno opisanom metodom (poglavlje 7.4). Takođe, na svakih sat vremena, u alikvotima je određivana opšta proteolitička aktivnost prema opisanoj metodi (poglavlje 7.7).

7.10. Biohemijski testovi za identifikaciju mikroorganizma

-test na oksidazu

Bakterijskoj kulturi u hranljivom bujonu (24 h) dodat je par kapi rastvora *N,N*-dimetil-*p*-fenilendiamina. Brzi razvoj plave boje se čita kao pozitivan rezultat.

-test na indol

Bakterijskoj kulturi u tripton (10 g/l) NaCl (5 g/l) medijumu nakon 24 h inkubacije dodato je par kapi Kovačevog reagensa (izoamil alkohol 150 ml; *p*-dimetilaminobenzaldehid 10g; HCl conc. 50 ml). Stvaranje crvene boje se ocenjuje kao pozitivan rezultat.

- Voges-Proskauer (VP) i metil crveno (MR) test

Za oba testa korišćena je 24-časovna kultura u VP-MR bujonu i odgovarajući indikatori (rastvor metil crvenog u apsolutnom alkoholu za VP, i Baritovi reagensi (rastvor α -naftol i KOH)) za MR test). Razvoj crvenog obojenja se čita kao pozitivan rezultat.

-Oksidativno fermentativni test

Način metabolizma glukoze je utvrđen zasejavanjem mikroorganizma u podlozi sledećeg sastava: Pepton I (2 g/l), NaCl (5 g/l), glukoza (10 g/l) i bromtimol plavo indikator (0,05 g/l). Za utvrđivanje aerobnog/anaerobnog mehanizma, dve epruvete su zasejane bakterijskom kulturom, od čega je jedna nadslojena mineralnim uljem. Inkubacija je izvršena na 30 °C. Metabolizam glukoze dovodi do stvaranja kiselih metabolita što se očitava promenom boje. Kod oksidativnih mikroorganizama promena boje je uočljiva samo u otvorenoj, a kod fermentativnih u obe epruvete.

-test na ureazu

Test je izvršen zasejavanjem Kristensenovog urea kosog agara, pripremljenog na sledeći način: Pepton I (1 g/l), dekstroza (1 g/l), NaCl (5 g/l), K₂HPO₄ (2 g/l), Urea (20 g/l) i fenol crveno (0,012 g/l) su rastvoreni u 100 ml vode i sterilisani filter sterilizacijom. Ovaj rastvor je dodat sterilisanom i prohladenom agaru pripremljenom rastvaranjem

standardne količine agara (18 g/l) u preostaloj količini vode (900 ml). Kosi agari su zasejani kulturom i inkubirani do 72 h na 37 °C. Izostanak razvoja crvene (roze) boje se ocenjuje kao negativan test.

-test na katalazu

Test je izvršen stavljanjem kapljice vodonik-peroksida na mikroskopsko staklo. Korišćenjem eze, kolonija bakterija je prenešena na kapljicu vodonik peroksida. Intenzivni razvoj mehurića ukazuje na prisustvo enzima katalaze.

7.11. Identifikacija mikroorganizama metodom sekvencioniranja 16S ribozomalne DNK

16s ribozomalna RNK je manja subjedinica ribozoma koju sačinjava 1542 nukleotida. Geni koji kodiraju njenu sintezu (16S ribozomalna DNK) se danas široko primenjuju u filogenetskim studijama budući da se sastoje od visoko konzerviranih regija koje omogućavaju primenu univerzalnih prajmera, i regija visoko varijabilnih sekvenci koje nose specifičnosti vrste prokariotskih ćelija.

Za izolaciju genetičkog materijala, bakterijske ćelije su nakon jednodnevne kultivacije sterilnom ezom prenesena sa LB agara u fiziološki rastvor, gde su u dvostepenom postupku centrifugirane 5 minuta na $10\,000\text{ o min}^{-1}$ i ponovno ispirane fiziološkim rastvorom.

Prečišćavanje genomske DNK je izvršeno korišćenjem komercijalnog paketa QIAamp[®] DNA Mini Kit prema specifikaciji proizvođača.¹⁵² Ukratko, ćelije su lizirane dodatkom lizozima i odgovarajućeg pufera tokom polučasovne reakcije na 37 °C. Uzorku je zatim dodat rastvor proteinaze K kako bi se uklonile eventualno prisutne nukleaze koje bi degradirale željeni izolat. Proteoliza je izvršena uz odgovarajući pufer inkubacijom na 56 °C u trajanju od 30 minuta, a reakcija je zaustavljena termičkom denaturacijom primenjene proteaze petnestominutnom inkubacijom na 95 °C. Taloženje DNK je izvršeno dodatkom etanola, a uzorak je dodatno prečišćen sukcesivnim

ispiranjem različitim puferima i centrifugiranjem u različitim kolonama za prečišćavanje uz finalnu eluciju željene DNK vodom.

Dobijena DNK je poslužila kao obrazac za amplifikaciju gena metodom PCR. PCR tehnika se može koristiti za amplifikovanje (umnožavanje) brojnih kopija specifičnog regiona DNK koji je određen izborom prajmera (kratkih oligonukleotida čija sekvenca odgovara krajevima regiona koji je od interesa) se odigrava tokom većeg broja ciklusa koji podrazumevaju:

1. Termalnu denaturaciju DNK koja se izvodi inkubacijom PCR reakcione smeše na 95 °C (kada dolazi do raskidanje vodoničnih veza između dva komplementarna lanca DNK kako bi moglo doći do hibridizacije prajmera);
2. Hibridizaciju prajmera sa matricom, odnosno uspostavljanje vodoničnih veza između prajmera i komplementarne sekvence na matrici. Izvodi se na temperaturi od 42 °C do 65 °C u zavisnosti od dužine i nuklotidne sekvence prajmera;
3. Elongacija (ekstenzija) prajmera, ugradnja nukleotida po principu komplementarnosti baza počev sa DNK matricom od 3' krajeva prajmera. Ova reakcija je katalizovana termostabilnom DNK polimerazom (*Taq* polimeraza) i odvija se na temperaturi od 72 °C koja je optimalna za rad ovog enzima.

PCR reakcija je izvršena korišćenjem GoTaq[®] qPCR komercijalnog paketa, u okviru kojeg se nalazi GoTaq[®] qPCR Master Mix koji sadrži sve potrebne komponente za odigravanje amplifikacije, izuzev šablonske DNK i prajmera (GoTaq[®] qPCR Master Mix sadrži smešu nukleotida, *Taq* polimerazu, neophodne jone Mg²⁺ i pufer koji obezbeđuju optimalnu aktivnost enzima). Reakcija amplifikacije je izvršena uz korišćenje prajmera UNI16SF 5'-GAG AGT TTG ATC CTG GC-3' i UNI16SR 5'-AGG AGG TGA TCC AGC CG-3'.

Reakcija amplifikacije je izvršena u GeneAmp 2700 PCR Cycler (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) termosajkleru sa preciznim, cikličnim promenama temperature koji omogućavaju odigravanje svih nabrojanih koraka. Konkretno, program po kom je vršena amplifikacija podrazumevao je petominutno zagrevanje na 96 °C, nakon čega je usledilo 30 ciklusa inkubacije na 96 °C u trajanju od

30 s, koje je pratila inkubacija na 55 °C (30 s) i zatim na 72 °C (30 s), sa finalnim korakom elongacije u trajanju od 5 minuta na 72 °C.

Nakon 30 ciklusa amplifikacije, uzorci su prečišćeni sa aspekta uklanjanja viška nukleotida, enzima i drugih sastojaka smeše, sa ciljem dobijanja čistih željenih segmenata DNK. Prečišćavanje je izvršeno na bazi absorpcije DNK na specijalno dizajnirani silika gel molekularni filter u prisustvu povišene koncentracije soli i pH<7.5 korišćenjem gotovog paketa QIAquick® PCR Purification Kit.¹⁵³

Rezultati PCR-a su detektovani elektroforezom na agaroznom gelu (1%) u Tris/Borat/EDTA puferu i bojenjem etidijum-bromidom. Umnožena DNK je vizualizovana nakon osvetljavanja u UV transiluminatoru i njena veličina je određena upoređivanjem sa markerima standardne molekulske težine.

Amplifikovana DNK je sekvencionirana u Macrogen Europe Inc. (Amsterdam, Holandija) automatizovanim DNA analyzer 3730xl (Applied Biosystems, Foster City, USA) uz korišćenje BigDye™ cycle sequencing kit (Applied Biosystems, FosterCity, CA). Dobijena sekvenca je podvrgnuta BLAST analizi u okviru NCBI baze podataka.

7.12. Ispitivanje efikasnosti odmašćivanja

Da bi se ispitala efikasnost pranja različitih formulacija detergenata koji sadrže proizvedene lipaze, pamučne tkanine (5 x 5 cm) prethodno zaprljane trioleinom obojenim Sudan crvenom bojom (0,02% w/w), su prane u detergentima različitih sastava (50 ml) u trajanju od 30 minuta uz mešanje pri brzini od 150 rpm na 30 °C. Po završetku pranja, tkanine su ispirane dva puta po 30 minuta uz mešanje sa po 50 ml destilovane vode. Tkanine su zatim ostavljene da se osuše tokom noći da se osuše, a uspešnost uklanjanja masnih fleka je određivana na osnovu promene inteziteta boje i svetline tkanine. Ova promena je detektovana refleksionim spektrofotometrom, a kao slepa proba je korišćena tkanina oprana u destilovanoj vodi kako bi bilo uzeto u obzir i mehaničko uklanjanje nečistoća pod dejstvom mešanja. Za određivanje boje korišćen je Datacolor SF 300 spektrofotometar (D₆₅ izvor svetlosti) pri uglu posmatrača od 10 °. Na

osnovu izmerenih vrednosti koordinata boje određena je razlika u obojenju (ΔE^*) u skladu sa jednačinom:

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L^*)^2}$$

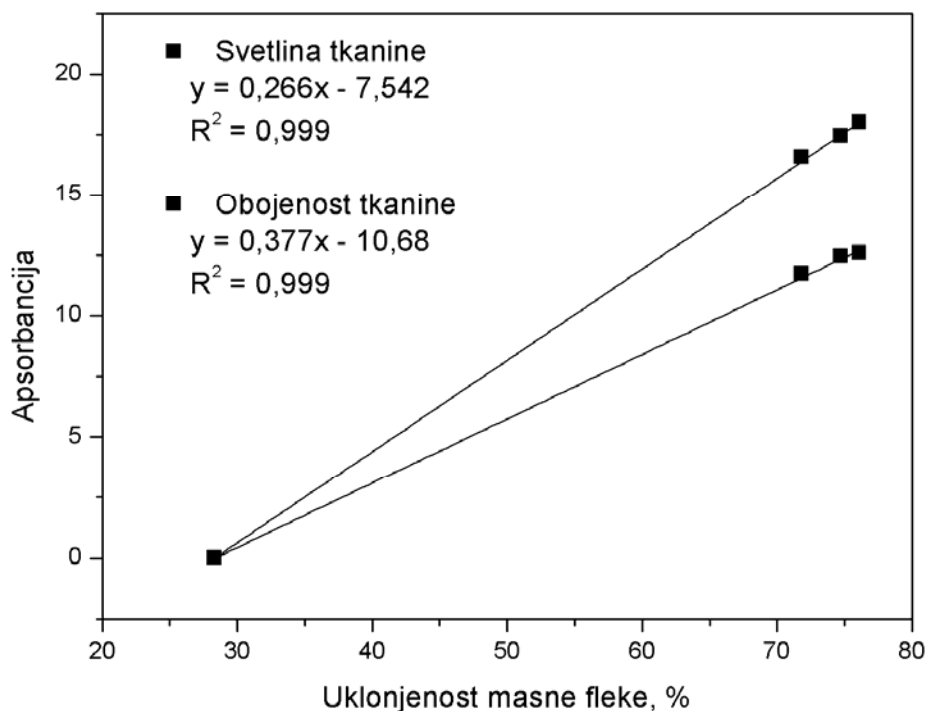
gde je: ΔL^* - razlika u svetlini između obrađenog i kontrolnog uzorka; Δa^* - razlika u vrednosti crveno/zeleno koordinate boje između obrađenog i kontrolnog uzorka; Δb^* - razlika u vrednosti žuto/plavo koordinate boje između obrađenog i kontrolnog uzorka.

Procenat uklanjanja masti je utvrđivan na osnovu prethodno određenih standardnih krivih. Standardne krive su konstruisane tako što je pripremljena serija eksperimenata po kojoj su tkanine oprane u detergentima različitih sastava. Masnoća uklonjena pranjem je određivana na osnovu razlike u masama tkanina pre i posle pranja, a zaostala količina trioleina na tkanini je određivana metodom ekstrakcije *n*-heksanom po Soksletu. Ekstrakcija je vršena u Soksletovoj aparaturi na 60 °C u trajanju od 2h, nakon čega je rastvarač uklonjen uparavanjem na rotacionom vakuum uparivaču na 40 °C, a sadržaj ekstahovanog ulja određivan je gravimetrijski. Procenat uklonjene masnoće je određen kao:

$$w = \frac{m_{\text{ukupno}} - m_i}{m_{\text{ukupno}}} \cdot 100(\%)$$

gde je m_{ukupno} -ukupna naneta masa ulja, m_i -količina ulja zaostala na tkanini posle tretmana.

Na osnovu ove serije eksperimenata dobijene su standardne krive koje prikazuju odnos uklonjenosti masne fleke i razlike u obojenju tj svetlini tkanine.



Slika 7.2. Standardna kriva za utvrđivanja stepena odmaščivanja na osnovu promene u boji/svetlini tkanine

7.13. Optimizacija sastava enzimske formulacije detergenta

Formulisanje novog preparata za uklanjanje nečistoća izvršeno je metodom statistički planiranog eksperimenta po kome su varirane koncentracije proizvedenog enzima, kao i površinski aktivnih materija koje su u prethodnim ispitivanjima pokazale pozitivan uticaj na aktivnost i stabilnost ispitivane lipaze. Takođe, ispitan je i uticaj pH ispitivanih formulacija na uklanjanje masnih fleka. Ispitivanje pH je vršeno u opsegu 7-11 i za to su korišćeni sledeći puferi (50 mM): Tris-HCl pufer (pH 7-9) i karbonatni pufer (pH 9-11).

Tabela 7.1. Kodirane i stvarne vrednosti ispitivanih parametara

Varijable	Kodirane vrednosti varijabli				
	-1,682	-1	0	1	1,682
Lutensol koncentracija (% w/v), X_1	0	0,41	1	1,59	2
Triton X 100 koncentracija (% w/v), X_2	0	0,41	1	1,59	2
pH, X_3	7	7,81	9	10,19	11
Enzim (ml) , X_4	2	3,62	6	8,38	10

Tabela 7.2. Eksperimentalni plan za centralni kompozitni rotabilni dizajn sa četiri parametara variranih na pet nivoa-kodirane i stvarne vrednosti (u zagradama) .

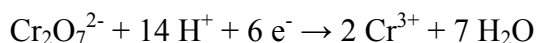
Run no.	Lutensol koncentracija, %	Triton koncentracija, %	pH	Enzim, ml
	X_1	X_2	X_3	X_4
1	1(1,59)	1(1,59)	1(10,19)	1(8,38)
2	-1(0,41)	1(1,59)	1(10,19)	-1(3,62)
3	1(1,59)	-1(0,41)	1(10,19)	-1(3,62)
4	-1(0,41)	-1(0,41)	1(10,19)	1(8,38)
5	1(1,59)	1(1,59)	-1(7,81)	-1(3,62)
6	-1(0,41)	1(1,59)	-1(7,81)	1(8,38)
7	1(1,59)	-1(0,41)	-1(7,81)	1(8,38)
8	-1(0,41)	-1(0,41)	-1(7,81)	-1(3,62)
9	1,682(2)	0(1)	0(9)	0(6)
10	-1,682(0)	0(1)	0(9)	0(6)
11	0(1)	1,682(2)	0(9)	0(6)
12	0(1)	-1,682(0)	0(9)	0(6)
13	0(1)	0(1)	1,682(11)	0(6)
14	0(1)	0(1)	-1,682(7)	0(6)
15	0(1)	0(1)	0(9)	1,682(10)
16	0(1)	0(1)	0(9)	-1,682(2)
17	0(1)	0(1)	0(9)	0(6)
18	0(1)	0(1)	0(9)	0(6)
19	0(1)	0(1)	0(9)	0(6)
20	0(1)	0(1)	0(9)	0(6)

7.14. Određivanje parametara otpadnih voda

Parametri otpadnih voda su ispitivani standardnim metodama iz literature.¹⁵⁴

- Hemijska potrošnja kiseonika (HPK)

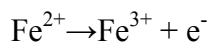
Hemijska potrošnja kiseonika (HPK) je određivana na osnovu standarde metode koja se zasniva na oksidaciji dihromatom u višku u prisustvu H_2SO_4 i Ag_2SO_4 kao katalizatorom. Tokom oksidacije organske materije u uzorku zagrevanjem sa poznatom količinom dihromata dolazi do njenog prevođenja do CO_2 i vode, prilikom čega se dihromat redukuje do Cr^{3+} prema jednačini:



Proreagovala količina dihromata je određivana titracijom viška dihromata feroamonijum-sulfatom.

Postupak :

20 ml uzorka odgovarajućeg razblaženja mešano je sa 10 ml rastvora kalijum-dihromata (41,67 mM) i 30 ml srebro-sulfat/sumporne kiseline (10 g Ag_2SO_4 se rastvori u 35 ml vode se doda u 965 ml koncentrovane H_2SO_4) u reakcionom balonu od 250 ml, koji je potom odmah povezan sa povratnim hladnjakom. Reakciona smeša je zatim zagrevana 2h na 148 °C. Uzorak je potom razblažen destilovanom vodom do 75 ml i ohlađen na sobnu temperaturu. Višak dihromata je titrisan feroamonijum-sulfatom ($c=0,25 \text{ mol/L}$) u feroin kao indikator.



Za svaki uzorak je urađena slepa proba sa ekvivalentnom količinom destilovane vode umesto uzorka. Jedan mol utrošenog dihromata ekvivalentan je 1,5 molu kiseonika.

HPK je računat prema sledećoj jednačini:

$$\text{HPK (mgO}_2\text{/L)} = \frac{(a - b)M * 8000}{v}$$

gde su:

a,b- količine utrošenih zapremina feroamonijum-sulfata za titraciju slepe probe i uzorka, redom (mL)

M-molaritet feroamonijum-sulfata

v-zapremina uzorka u probi, mL

- Sadržaj suve materije, organske suve materije i pepela

Sadržaj suve materije je određivan sušenjem poznatih količina uzoraka do konstantne mase u pećnici na 105 °C. Sadržaj neisparljivih mineralnih materija (pepela) je određivan nakon žarenja poznate količine suve materije uzoraka na 850 °C. Organska suva materija određivana je kao razlika sadržaja suve materije i pepela.

- Ukupni azot

Ukupni azot određivan je mikro-Kjeldhal methodom. Postupak je podrazumevao digestiju i spaljivanje odmerene količine uzoraka sa 10 ml koncentrovane H₂SO₄ zagrevanjem smeše u Kjeldalovoj kiveti na plameniku do njenog izbistravanja. Ohlađen sadržaj je zatim razblažen sa 75 mL destilovane vode i prenet u balon za destilaciju. Destilacija je vršena u specijalnoj aparaturi čiji je hladnjak bio uronjen u 25 mL 4% borne kiseline sa indikatorom. Ovaj reagens je pripremljen na sledeći način: 40g borne kiseline (H₃BO₃) rastvoren je u 1 L tople vode, ohlađen nakon čega mu je dodato 3ml rastvora indikatora. Indikator je pripremljen mešanjem rastvora A (0,2 % (w/v) metil-crvenog u 95% etanolu) i B (0,1% (w/v) bromkrezol- zelenog u 95% etanolu) u odnosu 1:5.

Po završetku destilacije, rastvor borne kiseline je titrisan 0,1M H₂SO₄ do obezbojavanja smeše. Sadržaj azota je određivan na osnovu razlike utrošaka rastvora sumporne kiseline za titraciju uzoraka i slepe probe pripremljene sa vodom.

8. Rezultati i diskusija

8.1. Primarna selekcija mikrobnih producenata lipaze na selektivnim medijumima

U radu je ispitan veliki broj mikroorganizama sa aspekta proizvodnje hidrolitičkih enzima za primenu u detergentima. Primarni cilj je bio da se iz kolekcije kultura Tehnološko-metalurškog i Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu identifikuju mikroorganizmi koji proizvode lipaze dobrih svojstava i u dobrom prinosu. Primarna selekcija je izvršena na osnovu pokazanih aktivnosti na tributirin agar i agar koji sadrži maslinovo ulje kao selektivnim medijumima. Rastom kolonija na ovim podlogama, produkovane ekstracelularne lipaze se mogu uočiti po pojavi bistrih zona oko izraslih kolonija nastalih hidrolizom tributirina/maslinovog ulja u medijumu. Ispitan je veliki broj mikroorganizama poput različitih *Pseudomonas* spp., plesni *Rhizopus oryzae*, *Aspegillus niger*, *Candida* spp. i ostalih brojnih vrsta kvasaca. Nakon trodnevne kultivacije sojeva na selektivnim medijumima, oko sojeva prikazanih u tabeli 8.1 su uočene bistre zone i oni su izabrani kao potencijalni proizvodni mikroorganizmi.

Tabela 8.1. Poluprečnici zona pokazane hidrolitičke aktivnosti na selektivnim agarima

Mikroorganizam	Poluprečnik zone oko kolonija, mm	
	Tributirin agar (TBA)	Agar sa maslinovim uljem
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> san-ai	5	5,5
<i>Candida rugosa</i> NRRL Y-95	2,5	2,5
<i>Pseudomonas putida</i> NRRL B-21	2	3
<i>Yarrowia lipolytica</i> NRRL Y-1095	5,5	7
<i>Candida utilis</i> TMF	2	3,5
<i>Torulopsis</i> sp. TMF	2	-
<i>Kluyveromyces lactis</i> NRRL	1,5	2
<i>Bacillus thuringiensis</i> TMF	2,5	-
<i>Rhodotorula</i> sp. TMF	-	1,5
<i>Micrococcus</i> sp. TMF	4	-

Drugi ispitivani mikroorganizmi *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera* sp. TMF, *Torula utilis*, *Hansenula* sp., *Pichia pastorians*, *Aspergillus niger* TMF, *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 5999 i *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 2739, nisu pokazali zone hidrolizovanog tributirina u selektivnim medijumima te su isključeni kao potencijalni producenti ekstracelularnih lipaza iz daljih ispitivanja. Pored navedenih, kao potencijalni producent lipaze je izabran i *Rhizopus oryzae* NRRL 1526 za koji se usled njegovog micelijarnog rasta, veličina zone ne može precizno odrediti iako je jasno uočljiva.



Slika 8.1. *Pseudomonas aeruginosa* san-ai na TBA



Slika 8.2. *Pseudomonas aeruginosa* san-ai na Rodamin B medijumu



Slika 8.3. *R. oryzae* na TBA



Slika 8.4. *R. oryzae* na Rodamin B medijumu

Vizuelizovana aktivnost na ovim medijumima ocrta i specifičnost proizvedenih enzima u pogledu afiniteta prema trigliceridima različitih sastava. Budući da ispitivani sojevi *Bacillus*, *Torulopsis* i *Micrococcus* pokazuju aktivnost samo u medijumu koji sadrži tributirin, kratkolančani triglicerid delimično rastvoran u vodi, ne može se sa sigurnošću potvrditi da su pokazane zone hidrolize posledica dejstva lipaza (a ne esteraza), budući da se generalno smatra da ovi enzimi treba da pokazuju zadovoljavajuću aktivnost i ka nerastvornim trigliceridima koji sadrže estarski vezane srednje- i dugolančane masne kiseline.¹⁵⁵

Provera sposobnosti mikroorganizama da stvaraju ekstraćelijsku lipazu pri kultivaciji na agaru sa maslinovim uljem izdvojila je kao dobre producente lipaza sledeće mikroorganizme oko čijih kolonija su uočene zone poluprečnika $r \geq 2,5$ mm:

- *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-1095,
- *Pseudomonas aeruginosa* san-ai,
- *Pseudomonas putida* NRRL B-21,
- *Candida utilis* TMF,
- *Candida rugosa* NRRL Y-95 i
- *Rhizopus oryzae* NRRL 1526.

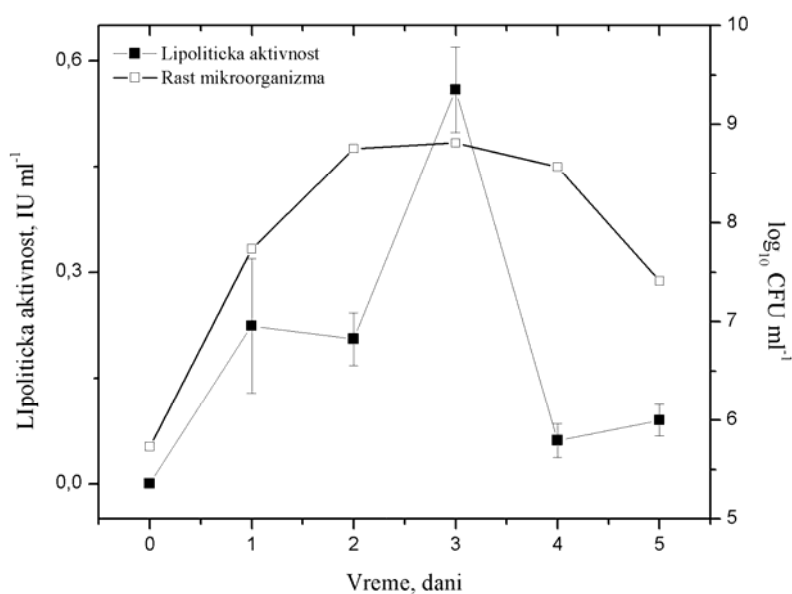
Kao slabo pozitivni producenti lipaze sa poluprečnikom zone $2,5 \geq r \geq 1$ ocenjeni su *Rhodotorula* sp. TMF i *Kluyveromyces lactis* NRRL.

Kako bi se potvrdila lipolitička priroda selektovanih potencijalno dobrih producenata, izabrani sojevi su potom uzgajani na hranljivom agaru obogaćenim sa 1% v/v maslinovim uljem i indikatorom Rhodamine B (0,001% w/v). Na osnovu pojave fluorescirajućih i narandžastih zona oko izraslih kolonija vidljivih nakon osvetljavanja pod UV svetlošću, može se potvrditi da je izabrani mikroorganizam pravi producent lipaze, odnosno, može se isključiti da su nastale bistre zone pokazane u prvom medijumu posledica dejstva esteraza ili nastanka drugih kiselih metabolita.^{156,157}

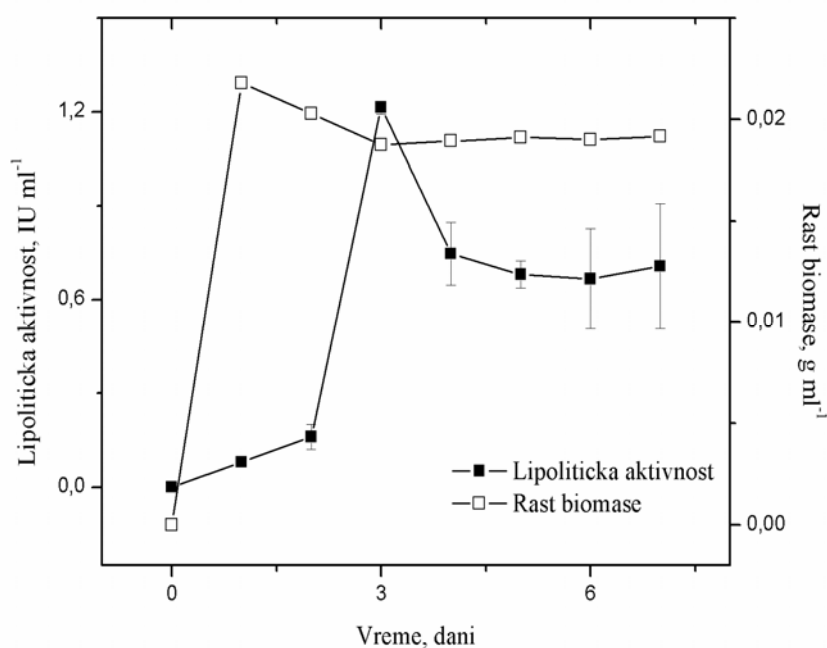
Sumirajući pokazane aktivnosti na selektivnim medijumima, kao potencijalno dobri producenti lipaza, izdvojeni su *Pseudomonas aeruginosa* san-ai, *Pseudomonas putida* B-21, *Candida utilis* TMF, *Rhizopus oryzae*, *Yarrowia lipolytica* Y-1095 i *Candida rugosa* Y-95.

8.2. Ispitivanje kinetike mikrobnog rasta i biosinteze lipaza u tečnim podlogama

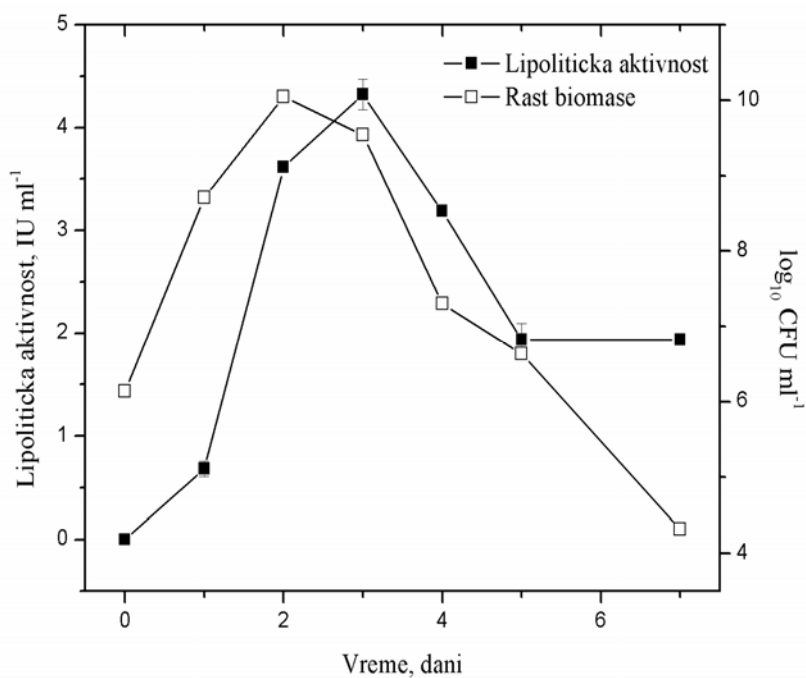
Pretpostavljeno je da će mikroorganizmi izabrani na osnovu potvrđene aktivnosti na selektivnim agarima, pokazati visoke prinose lipaza i u tečnim medijumima. Potencijalni mikrobnj proizvođači lipaza su iz tog razloga uzgajani u tečnim hranljivim podlogama, pripremljenim prema recepturama iz literature za koje je pokazano da pospešuju biosintezu lipaza za mikroorganizme istih vrsta (poglavlje 7.3). Tok fermentacije i kinetika produkcije enzima u ovim medijumima su praćeni u trajanju od 7 dana. Svi eksperimenti su vršeni na 30 °C, uz mešanje (200 rpm) uz dodatak 1% inokuluma.



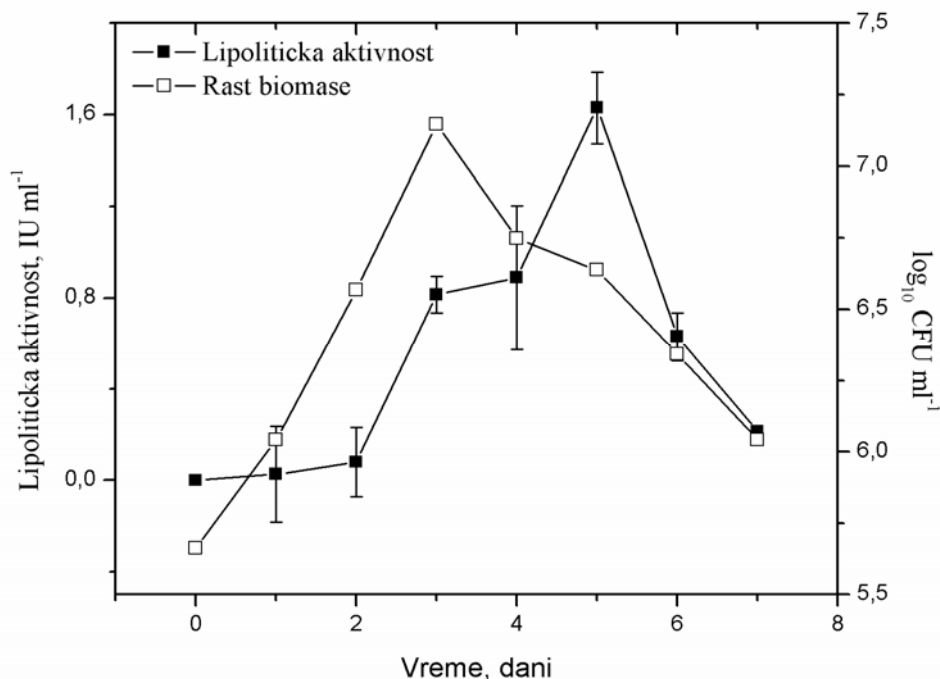
Slika 8.5. Kinetika produkcije lipaze iz *Pseudomonas putida* u tečnom medijumu sledećeg sastava: Pepton I (10 g/L), ekstrakt kvasca (5 g/L) i NaCl (5 g/L). Ostali uslovi: 30 °C, mešanje (200 rpm), dodatak 1% inokuluma.



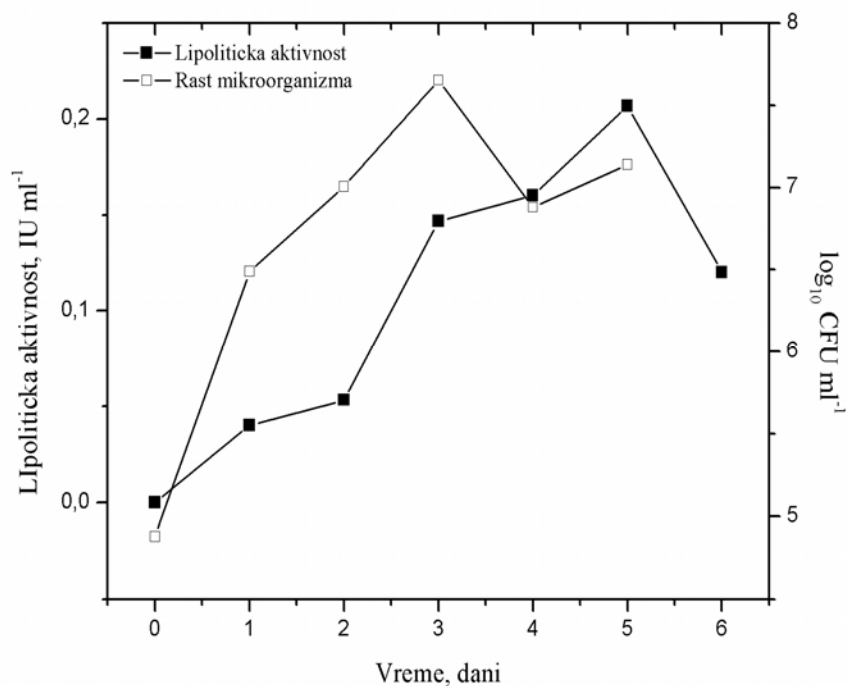
Slika 8.6. Kinetika produkcije lipaze iz *Rhizopus oryzae* u tečnom medijumu (Maslinovo ulje (20 g/L), Pepton I (5 g/L), KH₂PO₄ (1 g/L), MgSO₄·7H₂O (0,5 g/L), Tween 80 (0,5 mL/L)) pod istim uslovima kao na slici 8.5.



Slika 8.7. Kinetika produkcije lipaze iz *Pseudomonas aeruginosa* san-ai u tečnom medijumu (Pepton I (10 g/L), ekstrakt kvasca (5 g/L) i NaCl (5 g/L)) pod istim uslovima kao na slici 8.5.



Slika 8.8. Kinetika produkcije lipaze iz *Candida utilis* u tečnom medijumu (KH_2PO_4 (1 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/L), maltoza (5 g/L), hidrolizat kazeina (20 g/L), Tween 80 (1 mL/L), oleinska kiselina (12 g/L)) pod istim uslovima kao na slici 8.5.



Slika 8.9. Kinetika produkcije lipaze iz *Yarrowia lipolytica* u tečnom medijumu (Glukoza (20 g/L), Urea (2 g/L), Maslinovo ulje (10 g/L), KH_2PO_4 (1 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/L), NaCl (0,1 g/L), Tween 80 (0,5 mL/L)) pod istim uslovima kao na slici 8.5.

Na osnovu kinetike produkcije lipaza u ovim medijumima pokazano je da svi ispitivani mikroorganizmi postižu najveću produkciju enzima u kasnim stacionarnim fazama rasta ćelija, odnosno, početkom faze odumiranja mikroorganizma. Tako je maksimalna lipolitička aktivnost *Rhizopus oryzae*, *Pseudomonas putida* i *Pseudomonas aeruginosa* (Slike 8.5, 8.6 i 8.7) u profermentisanim medijumima dostignuta trećeg dana kultivacije. *Candida utilis* (Slika 8.8) i *Yarrowia lipolytica* (Slika 8.9) su dostigle maksimalni nivo produkcije lipaza petog dana, dok se *Candida rugosa* pod ispitivanim uslovima pokazala kao zanemarljivi producent ovog enzima, dostužiću maksimalni prinos od 0,08 IU ml⁻¹ četvrtog dana kultivacije.

Ovakva zavisnost mikrobnog rasta i produkcije lipaze je zabeležena u velikom broju literaturnih podataka. Naime, opšte je prihvaćeno mišljenje da je produkcija nekonstitutivnih enzima indukovana smanjenjem hranljivih materija u podlozi. Ipak, izvesni autori povećan prinos enzima u ovoj fazi mikrobnog rasta pripisuju lizi ćelija i oslobađanju intracelularnih enzima.¹⁵⁸ Takav obrazac rasta i produkcije lipaza zabeležen je kod velikog broja mikrobnih producenata ovog enzima iz roda *Pseudomonas* spp.,^{148,159-161} *Rhizopus* spp.,^{158,162} *Candida* spp.,^{140,163,164} i *Yarrowia* spp.¹⁴¹ Međutim, prinosi enzima, kao i vreme potrebno za postizavanje odgovarajućeg prinosa značajno variraju u zavisnosti od ispitivanih sojeva i uslova kultivacije. Literaturni podaci pokazuju da inkubacioni periodi mogu varirati od nekoliko sati (6h za biosintezu lipaze iz *Pseudomonas aeruginosa* EF2)¹⁶⁵ do nekoliko dana (6 dana za *Mucor hiemalis* lipazu).¹⁶⁶

Nakon dostignutih maksimalnih prinosa lipaza u tečnim podlogama, tokom vremena dolazi do gubitka aktivnosti koji većina autora pripisuju proteolitičkom dejstvu enzima koji se naknadno sekretuju. Ipak, poznato je i da masne kiseline mogu inhibitorno delovati na lipaze, pa je moguće i da gubitku lipolitičke aktivnosti u podlogama koje sadrže ulje doprinose i inhibitorni uticaji slobodnih masnih kiselina nastalih dejstvom lipaza.¹⁶⁷

Kvantitativnim poređenjem produktivnosti ovih mikroorganizama u neoptimizovanim uslovima, kao najbolji producenti enzima ocenjeni su *Pseudomonas aeruginosa* san-ai, *Candida utilis*, *Pseudomonas putida* i *Rhizopus oryzae* te se pristupilo njihovoj daljoj karakterizaciji kako bi se utvrdila njihova potencijalna aplikacija kao aditiva u detergentima.

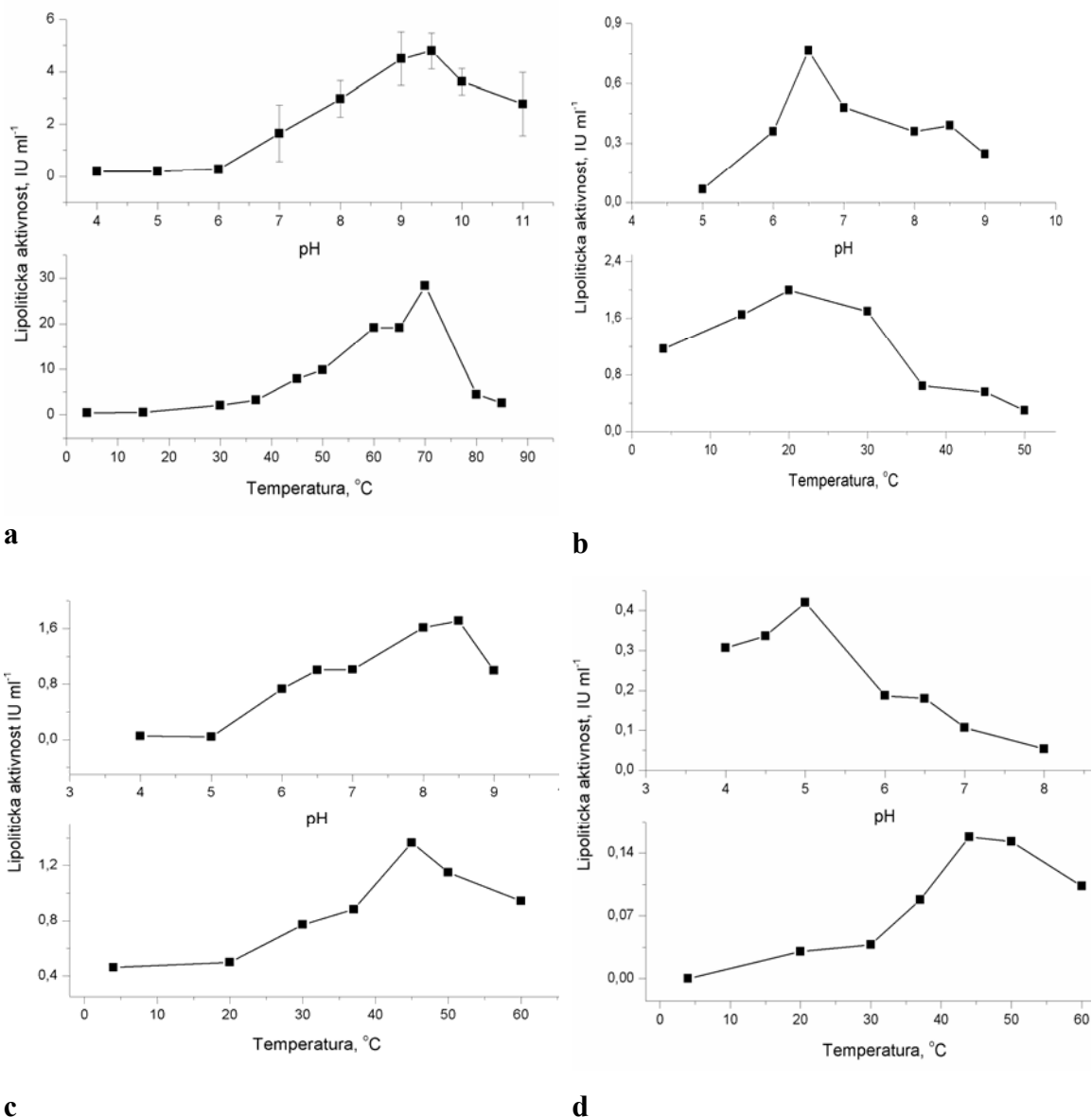
8.3. Temperaturni i pH profili proizvedenih enzima

Jedan od osnovnih zahteva za izbor enzima koji bi mogao da se upotrebi za aplikaciju u detergentima je da enzim pokazuje potrebnu funkcionalnost u alkalnim uslovima i u širokom spektru temperatura na kojima se najčešće izvodi postupak pranja.

Optimalne temperaturne i pH vrednosti enzima variraju u širokim intervalima u zavisnosti od porekla enzima. Krive temperaturnih i pH profila predstavljaju sumarne efekte više faktora koje treba imati u vidu kada se ispituje mogućnost industrijske eksploatacije enzima. Generalno gledajući, temperatura utiče na brzinu razlaganja enzim-supstrat kompleksa na slobodan enzim i proizvode reakcija (u ovom slučaju hidrolize), na afinitet enzima prema supstratu, a samim tim i na specifičnost enzima. Dalje, temperatura utiče na stepen disocijacije svih komponenata u reakcionoj smeši. Sa druge strane, sa povećanjem temperature molekuli enzima dobijaju dovoljno kinetičke energije za raskidanje veza koje čine više nivoa strukture enzima (sekundarne, tercijarne i kvaternarne) čime se razara njegova nativna konformacija što kao posledicu ima gubitak njegove aktivnosti.¹³

Uticaj pH na aktivnost enzima ima takođe složeni karakter budući da pH utiče na stanje jonizacije svih učesnika u reakciji (enzima, supstrata, ES kompleksa, aktivatora, inhibitora i sl.). Kako obrazovanje i razlaganje ES kompleksa zahteva postojanje odgovarajućih jonskih oblika enzima i supstrata, jasno je da će pH reakcione smeše imati veliki uticaj na afinitet enzima prema supstratu, a samim tim i na brzinu reakcije. Posebno, u pojedinim reakcijama joni vodonika/hidroksilni joni neposredno utiču u enzimskoj reakciji, pa tako pH utiče i na ravnotežni sastav reakcione smeše. Pri graničnim pH vrednostima, u molekulu enzima dolazi do protonovanja/deprotonovanja određenih jonizujućih grupa koje su od esencijalne važnosti za obrazovanje intramolekulskih veza koje čine više nivoa strukture enzima, što posledično dovodi do potpunog gubitka aktivnosti.

Kako je prikazano na slici 8.10, od ispitanih enzima kriterijume za zadatu aplikaciju zadovoljile su samo lipaze poreklom iz *Pseudomonas* spp.



Slika 8.10. Temperaturni i pH profili proizvedenih lipaza: a) *Pseudomonas aeruginosa* san-ai b) *Rhizopus oryzae* NRRL 1526 c) *Pseudomonas putida* B-21 d) *Candida utilis*

R. oryzae i *C. utilis* lipaze pokazuju optimalno dejstvo u kiseljoj sredini pa tako nisu podesne za aplikaciju u detergentima. Iako lipaza iz *R. oryzae* pokazuje optimalnu aktivnost pri temperaturi od 20 °C, što je atraktivno svojstvo sa aspekta primene u detergentima koji bi se koristili na nižim temperaturama, njeno optimalno dejstvo je na pH 6,5 što je čini nekompatibilnom sa standardnim alkalnim formulacijama za čišćenje. Interesantno je to da ispitivana lipaza pokazuje dosta visoku aktivnost na niskim temperaturama, tako da je na 4 °C aktivnost sirovog enzimskog preparata iznosila ~60%

u odnosu na maksimalnu aktivnost. Sa druge strane, ova lipaza je znatno inaktivirana na temperaturama višim od 35 °C. Ova lipaza pokazuje drugačija svojstva od drugih *R. oryzae* lipaza. Naime, iako je pH optimum ovih lipaza uglavnom u opsegu 6-8, temperaturni profili se mogu bitno razlikovati. Većina *R. oryzae* lipaza pokazuje optimalno dejstvo pri temperaturama oko 35 °C.^{158,168,169}

Optimalno dejstvo *C. utilis* lipaze je u još kiselijim uslovima, pri pH 5, te je ovaj enzim isključen iz daljih ispitivanja sa aspekta eventualne primene u detergentima. Budući da je optimalna temperatura za dejstvo ovog enzima 45 °C, on pokazuje sličnosti sa drugim *Candida* spp. lipazama koje uglavnom pokazuju optimalno dejstvo u pH opsegu 5-7, i temperaturama oko 40 °C, pa eventualnu aplikaciju ovog enzima treba potražiti u sintezi/hidrolizi industrijski bitnih estara.⁴⁰

Lipaza iz *Pseudomonas putida* B-21 pokazuje aktivnost u pH opsegu od 6-9, pri čemu je optimum dejstva ove lipaze 8,5. Ova lipaza je najaktivnija na povišenim temperaturama (optimum na 45 °C). Ovim svojstvima *P. putida* B-21 lipaza zadovoljila je osnovne kriterijume za zadatau aplikaciju pa je ovaj enzim dalje ispitan sa aspekta potencijalne primene u detergentima. Slična svojstva *P. putida* lipaza zabeležena su i u drugim istraživanjima. Tako lipaza koju produkuje soj *P. putida* 3SK takođe pokazuje optimum dejstva u pH opsegu 8-9 i 37 °C.¹⁴⁸

Lipaza iz *Pseudomonas aeruginosa* san-ai je pokazala još bolja svojstva za potencijalnu primenu u detergentima. Ovaj enzim je najaktivniji u izrazito alkalnoj sredini, pri čemu optimalna pH vrednost njegove aktivnosti iznosi 9,5. Ovaj enzim je najaktivniji na povišenim temperaturama, sa optimalnim dejstvom na 70 °C. Iako literaturni podaci pokazuju da se optimumi lipaza iz različitih sojeva *P. aeruginosa* uglavnom nalaze oko pH 8 i na 40 °C, ovakav rezultat je očekivan, budući da je soj producent ovog enzima izolovan upravo iz izrazito alkalne sredine i na povišenim temperaturama, pa ne čudi i da su enzimi koje proizvodi evolutivno prilagođeni da funkcionišu u ekstremnim uslovima.^{170,171}

Sa stanovišta upotrebe ove lipaze u formulacijama detergenata, ovaj enzim bi se mogao inkorporirati u formulacije namenjene uklanjanju teških tvrdokornih onečišćenja (tzv. „heavy-duty“ detergente).

8.4. Ispitivanje sposobnosti mikroorganizama za produkciju ekstracelularnih proteaza, kinetika produkcije enzima i njegova osnovna svojstva

Mikroorganizmi koji su inicijalno izabrani kao potencijalni producenti lipaza su ispitani i sa aspekta proizvodnje ekstracelularnih proteaza, budući da ovi enzimi predstavljaju komercijalno najviše korišćenu grupu enzima u detergentima. Primarni skrining proteolitičke aktivnosti je izvršen uzgajanjem ovih sojeva na mlečnom kazein agru. Nakon trodnevne kultivacije ovih sojeva na selektivnom medijumu, petri šolje sa izraslim kolonijama su prelivene 20% rastvorom trihlorsirćetne kiseline i ostavljene 10 minuta na 37 °C. Nakon koagulacije nehidrolizovanih belančevina u medijumu, zone hidrolizovanih proteina pod dejstvom proteaza se očitavaju kao bistre zone oko izraslih kolonija (Slika 8.11). Karakterističnu reakciju, pokazali su sledeći sojevi (Tabela 8.2):

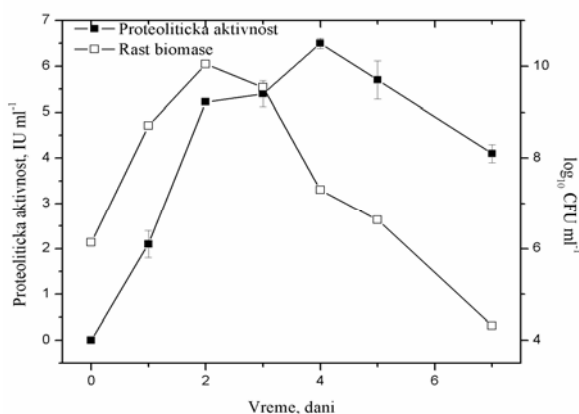


Slika 8.11. *Pseudomonas aeruginosa* san-ai na mlečnom-kazein agru

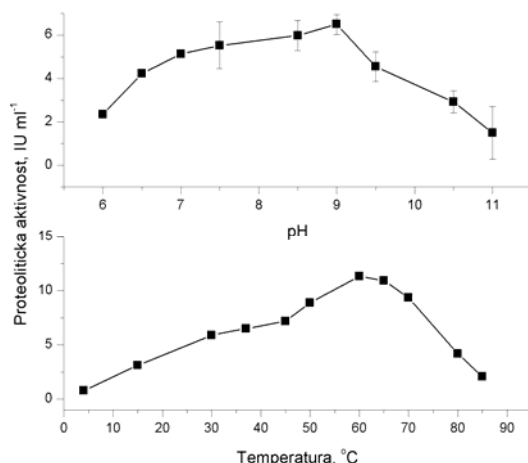
Tabela 8.2. Veličina zone proteolitičke aktivnosti oko potencijalnih producenata

Vrsta	r zone, mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> san-ai	8
<i>Yarrowia lipolytica</i> Y-1095	3,5
<i>Candida utilis</i>	1

Mikroorganizmi koji su ocenjeni kao potencijalni producenti proteaza su ispitani sa aspekta kinetike biosinteze ovih enzima u tečnim medijumima kako bi se utvrdila mogućnost simultanog postupka produkcije dva osnovna sastojka u enzimskim formulacijama detergentata. Pri ispitivanim uslovima, kao najbolji producent enzima ocenjen je *Pseudomonas aeruginosa* san-ai, koji 4. dana fermentacije dostiže prinos od 6,5 IU ml⁻¹ (Slika 8.12). Drugi ispitivani mikroorganizmi, nisu pokazali zadovoljavajuću produktivnost pa su isključeni iz daljih ispitivanja sa ciljem utvrđivanja potencijalne primene u detergentima (rezultati nisu prikazani).



Slika 8.12. Kinetika produkcije proteaza iz *P.aeruginosa* san-ai u LB medijumu (30 °C, 150 rpm)



Slika 8.13. Temperaturni i pH profil proteaze iz *P.aeruginosa* san-ai

Da bi se utvrdila primenljivost ovog enzima kao aditiva u formulacijama detergenata, ocenjena je funkcionalnost proizvedene proteaze u pH i temperaturnim opsezima relevantnim za postupak pranja. Optimalni radni pH ovog enzima je pri vrednosti 9, dok je najveća aktivnost ostvarena pri temperaturi od 60 °C, što proizvedenu proteazu svrstava u potencijalne aditive u formulacijama detergenata (Slika 8.13).

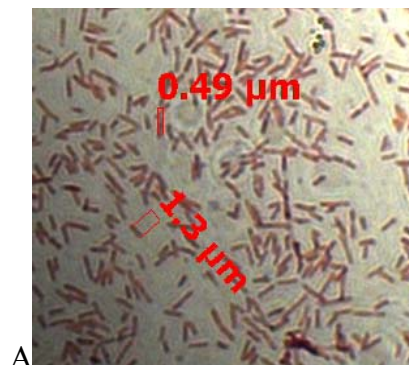
Dosadašnji enzimi namenjeni primeni u detergentima su uglavnom izabrani među *Bacillus* spp. budući da su ovi sojevi obilni producenti alkalinih proteaza koje su stabilne u prisustvu različitih surfaktanata. U poslednje vreme istraživačka literatura sve više prepoznaje i *Pseudomonas* vrste kao producente proteaza superiornih karakteristika za različite industrijske aplikacije.^{126,172,173}

Ko-produkcija različitih vrsta enzima za istu namenu bitno utiče na ekonomičnost krajnjeg proizvoda budući da je većina komercijalnih formulacija detergenata dobijena mešanjem enzima različitog mikrobnog porekla.² Simultana proizvodnja lipaza i proteaza u istom medijumu čini *P. aeruginosa* san-ai atraktivnim sa aspekta primene u detergentima pre svega imajući u vidu da su literaturni primeri ovakve koprodukcije enzima prilično oskudne.¹⁷⁴⁻¹⁷⁷

8.5. Identifikacija mikrobnih producenata lipaza za detergente

Kao producenti potencijalno odgovarajućih lipaza za primenu u detergentima izdvojena su dva mikroorganizma. *Pseudomonas putida* B-21 je komercijalno dostupan soj iz Agricultural Research Service (ARS) te nije bilo potrebe za njegovom daljom karakterizacijom i identifikacijom.

Drugi ispitivani soj, *Pseudomonas aeruginosa* san-ai je izolat iz otpadnog mašinskog fluida koje se koristi kao komponenta za podmazivanje pri mašinskoj obradi i seči metala (San-ai Oil, Tokyo). U pitanju je visokoalkalna tečnost (pH 10) koja u svom sastavu sadrži veliki udeo mineralnih ulja i površinski aktivnih materija.^{149,178}



Primarna identifikacija ovog mikroorganizma je izvršena prema njegovim biohemijskim i taksonomskim karakteristikama.¹⁷⁹ Mikroskopska analiza nativnog i obojenog preparata je potvrdila da je u pitanju Gram-negativna, štapićasta bakterija približne veličine ~0,5x1,3 μm (Slika 8.14a), bez flagela, koja pokazuje karakteristične reakcije prikazane u Tabeli 8.3.

Prisustvo zelenog pigmenta pioverdina koji nastaje uzgajanjem ovog mikroorganizma na LB agaru na 30 °C nakon 4 dana kultivacije predstavlja parametar na osnovu kojeg se uz prethodno opisane rezultate biohemijskih testova ovaj izolat može sa velikom pouzdanošću okarakterisati kao *Pseudomonas aeruginosa* (Slika 8.14b).



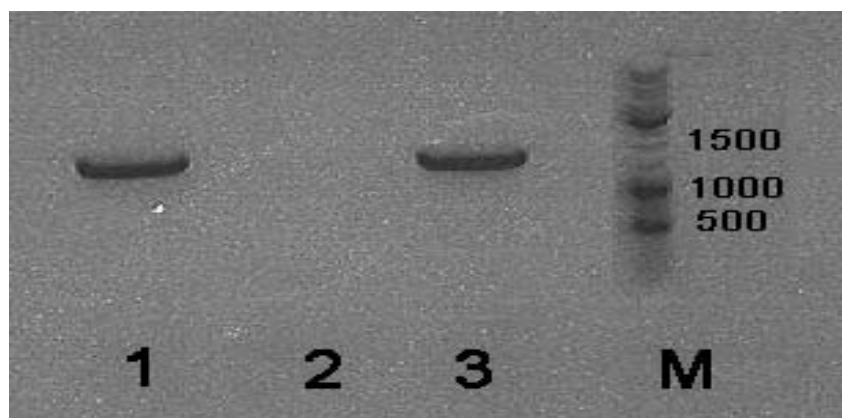
Slika 8.14. *P. aeruginosa* san-ai pod mikroskopom pod a) Zeleni pigment na LB agaru pod b)

Tabela 8.3. Taksonomske karakteristike

Biohemijski test	reakcija
Bojenje po Gramu	-
Oksidaza	+
Katalaza	+
Stvaranje spora	-
Stvaranje H ₂ S	+
Ureaza test	-
Test na indol	-
OF test	O
VP test	-
MR test	-

Ipak, neophodno je izvršiti pouzdanu identifikaciju ovog mikroorganizma savremenim genetičkim metodama kojima se utvrđuje nukleotidna sekvenca kojom je kodirana sinteza ribozomalne 16 S RNK. Prečišćavanje bakterijske DNK je izvršeno korišćenjem QIAamp DNA Mini Kit paketa (Qiagen, Holandija) prema specifikaciji proizvođača nakon čega je izvršena amplifikacija željene sekvence PCR metodom.

Vizuelizacija dobijenih genomskih sekvenci na agaroznom gelu nakon bojenja etidijum-bromidom, pokazala je da je amplifikovana sekvenca dužine ~1400 nukleotida (Slika 8.15). Utvrđivanje redosleda nukleotida u dobijenim sekvencama je izvršeno u Macrogen Europe, Inc., Holandija (dobijeni hromatografi su dati u Prilogu A).



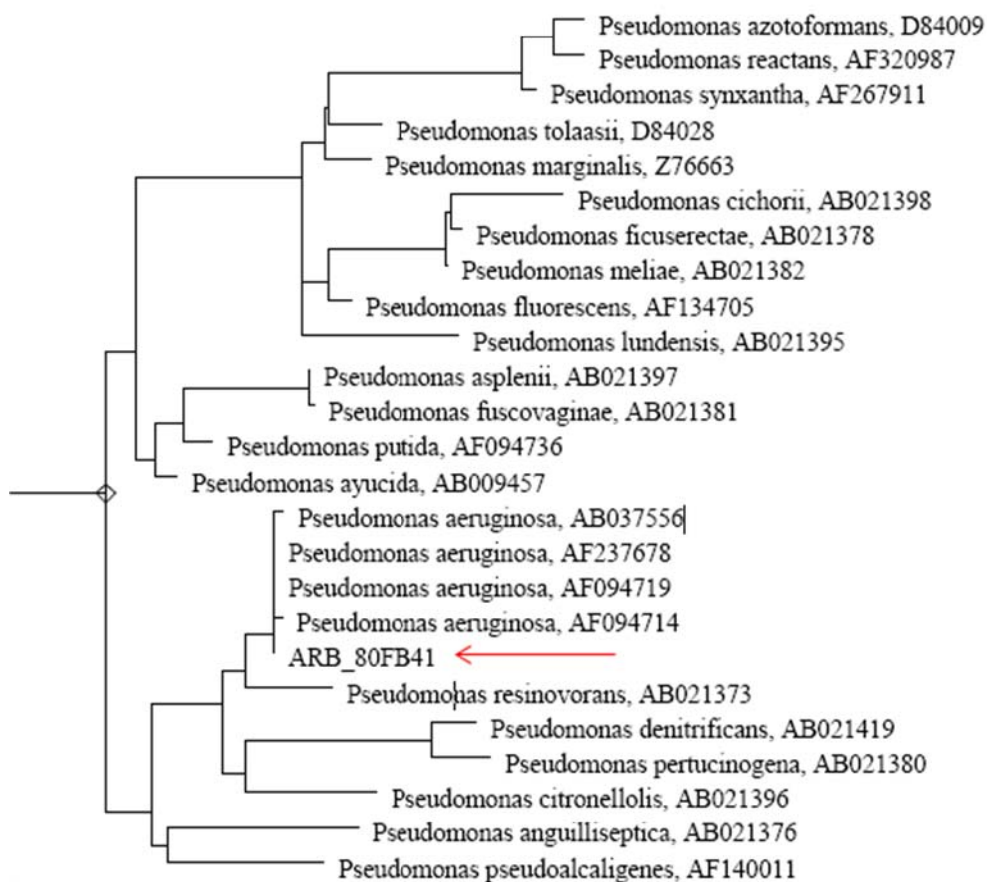
Slika 8.15. 16 S ribozomska DNK sekvenca na agaroznom gelu (1 i 3 uzorci, 2 negativna kontrola, M molekularni markeri)

Nakon sekvencioniranja, ustanovljena je sledeća nukleotidna sekvenca kojom je kodirana sinteza 16S rRNK:

```
>GGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGCTCCTGGATTACGCGGCGGAC
GGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCGAAACGGGCGCT
AATACCGCATACGTCCTGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATG
AGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAAC
TGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAG
GCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTG
AAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACC
TTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTT
CAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAATACTGAG
CTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGG
AAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCCGACTAGC
CGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAG
TACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCAACAAGCGGTGGAGCAT
GTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTC
CAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCT
CGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCA
GCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG
ACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGTACA
AAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGC
AGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACG
GTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCC
AGAAGTAGCTAGTCTAACCGCAAGGGGGACGGTTACCACGGAGT<
```

Analizom homolognih sekvenci u NCBI Blast potvrđeno je da je zaista reč o *Pseudomonas aeruginosa* vrsti budući da je komparativna analiza genomskih sekvenci 16S DNK pokazala 100% poklapanje sekvenci u odnosu na sojeve: *Pseudomonas aeruginosa* MTB-1, *P. aeruginosa* PA1, , *P. aeruginosa* NRRL B-59992, *P. aeruginosa* RP73, *P. aeruginosa* SBTPa-092, *P. aeruginosa* CS_182 i druge.

Položaj identifikovanog mikroorganizma u filogenetskom drvetu dat je na sledećoj slici:



Slika 8.16. Položaj selektovanog producenta u filogenetskom drvetu određen na osnovu homologije 16S genomske sekvence

Ovaj mikrobnii soj je deponovan u National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Budimpešta, Mađarska kao NCAIM (P) B 001380 soj, a 16S rRNA kodirajuća sekvencija je deponovana pod JQ012798 registracionom oznakom u GenBank.¹⁸⁰

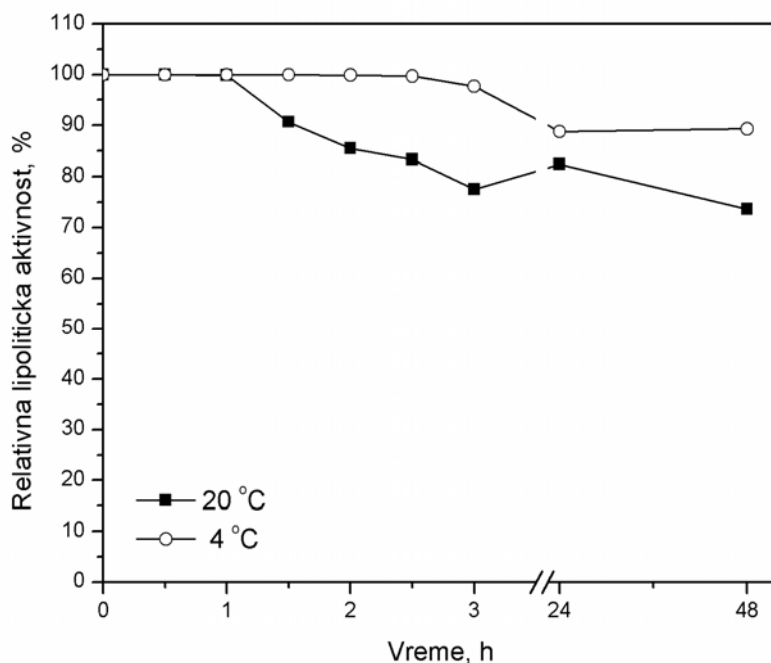
8.6. Enzimi iz *Pseudomonas aeruginosa* san-ai kao aditivi u detergentima

8.6.1. Stabilnost lipaze iz *Pseudomonas aeruginosa* san-ai u prisustvu surfaktanata, oksidacionih agenasa i komercijalnih detergenata

Kako bi se utvrdila potencijalna primenljivost enzima dobijenog fermentacijom tečne LB hranljive podloge, ispitan je uticaj nekoliko anjonskih i nejonskih površinski aktivnih materija na lipolitičku aktivnost sirovog enzimskog preparata. Među ispitivanim surfaktantima su i natrijum-dodecilbenzolsulfonat (SDBS) i natrijum-dodecilsulfat (SDS) koji se smatraju najagresivnijim agensima u formulacijama detergenata i koji pokazuju snažno deaktivirajuće dejstvo na enzime. Takođe, ispitane su i različite komercijalne nejonske površinski aktivne materije na bazi estara polialkohola koje se koriste u modernim formulacijama detergenata.

U početnim ispitivanjima je utvrđena visoka enzimska aktivnost dobijene fermentacione tečnosti. Naime, početna lipolitička aktivnost iznosila je oko $2,5 \text{ IU ml}^{-1}$.

Kako je inaktivacija lipaza proteazama jedan od osnovnih problema lagerovanja detergenata koji sadrže enzime, prvi eksperimenti su se odnosili na utvrđivanje gubitka aktivnosti lipaze usled proteolize nativno koegzistirajućim proteazama.



Slika 8.17. Stabilnost lipaze u prisustvu koegzistirajućih proteaza tokom 48h na 4 i 20 °C. Početna aktivnost enzima iznosila je $2,5 \text{ IU ml}^{-1}$.

Utvrđeno je da čuvanjem na sobnoj temperaturi u toku 24 (48) časa, sirovi enzimski preparat zadržava više od 80% (75%) početne lipolitičke aktivnosti ukazujući na mogućnost korišćenja oba dobijena enzima u formulacijama detergenata. Na sniženoj temperaturi (4 °C) očuvana aktivnost lipaze nakon 2-dnevne inkubacije iznosi $\geq 90\%$ (Slika 8.17). Ovo je bitno svojstvo naročito sa aspekta primene u tečnim formulacijama u kojima nije lako ostvariva fizička izolacija i odvajanje enzima. Za razliku od praškastih formulacija koje prevazilaze problem neželjene proteolize dozvoljavajući upotrebu različitih enzima u granuliranoj formi, formulacija tečnih detergenata sa enzimima najčešće podrazumeva dodatak izvesnih stabilizatora (poput sistema borne kiseline/poliola), koji u osnovi deluju kao reverzibilni inhibitori inkorporiranih proteaza.^{181,182} Izborom stabilnih enzima se tako značajno može uticati na proizvodnu cenu i proširiti mogućnosti formulisanja proizvoda.

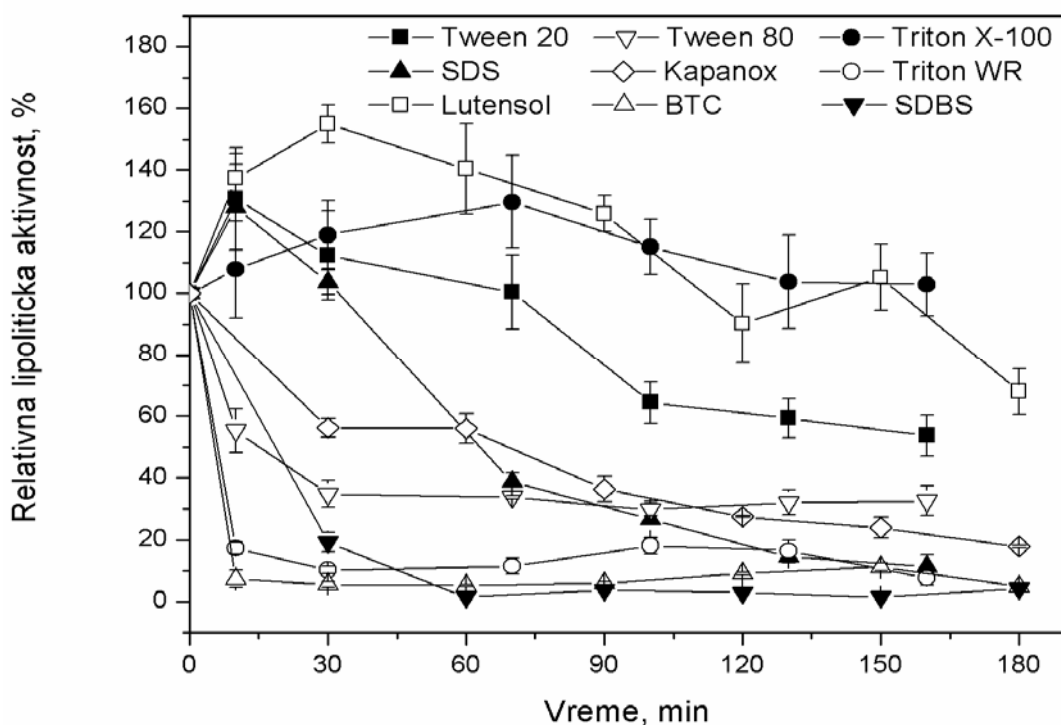
Drugi set eksperimenata obuhvatio je ispitivanje aktivnosti lipaza i proteaza u prisustvu anjonskih i nejonskih površinski aktivnih materija, kao i različitih oksidujućih agenasa.

Na slici 8.18 prikazan je uticaj različitih površinski aktivnih materija na aktivnost lipaze dobijene iz *Pseudomonas aeruginosa*.

Kao što se vidi sa slike 8.18, jonske površinski aktivne materije već u malim koncentracijama snažno deaktivirajuće deluju na aktivnost lipaza. Tako, u prisustvu SDBS enzim već u prvih pola sata gubi oko 80% aktivnosti u odnosu na kontrolni uzorak.

S druge strane, dodatak SDS-a je imao drugačije dejstvo na aktivnost lipaze iz *P. aeruginosa*, u odnosu na SDBS, pa je u početnoj fazi primećeno i povećanje aktivnosti (~104% nakon pola sata) u prisustvu ovog surfaktanta. Međutim, nakon povećanja aktivnosti lipaze u prisustvu ovog surfaktanta, dolazi do njenog naglog pada (nakon jednočasovne inkubacije zadržana je aktivnost lipaze od oko 40%).

Sumirajući literaturne podatke o uticaju SDS-a na konformaciju proteina, ovaj surfaktant se može smatrati nespecifičnim denaturišućim agensom pa se upravo zbog ovog svojstva on najčešće koristi u gel elektroforezi. Ipak, ovo svojstvo u mnogome zavisi od strukture samog enzima kao i uslova sredine.



Slika 8.18. Stabilnost lipaze iz *P. aeruginosa* san-ai u prisustvu površinski aktivnih materija (2 % w/v, odnosno 0,1 % w/v za SDS i SDBS) na 30 °C. Početna aktivnost je iznosila 2,5 IU ml⁻¹. Aktivnost uzorka bez dodatih surfaktanata uzeta je kao 100%.

Gubitak nativne konformacije enzima kao posledica interakcije između enzima i surfaktanta najviše je određen hemijskom prirodom polarne glave površinski aktivne materije. Polarna glava molekula surfaktanta prvenstveno počinje da stvara jake jonske veze sa specifičnim naelektrisanim grupama na površini enzima. Tako anjonski surfaktanti reaguju sa pozitivno naelektrisanim aminokiselinskim grupama, posebno lizinom, argininom i histidinom. Ova interakcija posledično omogućava prodiranje hidrofobnog repa surfaktanta u zaronjene hidrofobne regije proteina, čime se narušavaju tercijarne veze i izaziva odmotavanje proteina. pH sredine ima veliki uticaj na stanje jonizujućih grupa na molekulu enzima, pa tako i na podložnost denaturaciji molekulima anjonskih surfaktanata. Generalno, manji broj katjonskih ostataka, a veći broj kiselih aminokiselina značajno smanjuje mogućnost interakcija anjonskih surfaktanata i enzima.

Uvidom u literaturu se može uočiti da je u alkalnim uslovima, stabilnost enzima u prisustvu SDS-a povećana usled povećanog neto negativnog naelektrisanja proteina, pri čemu se pH vrednost izelektrične tačke enzima (pI) može smatrati grubim pokazateljem stabilnosti enzima. Tako primera radi, visoko negativno naelektrisanje pepsina ($pI < 1$) sprečava vezivanje SDS-a, dok pepsinogen ($pI = 3,5$) pri istim uslovima mnogo lakše stvara interakcije sa ovim surfaktantom.¹⁸³

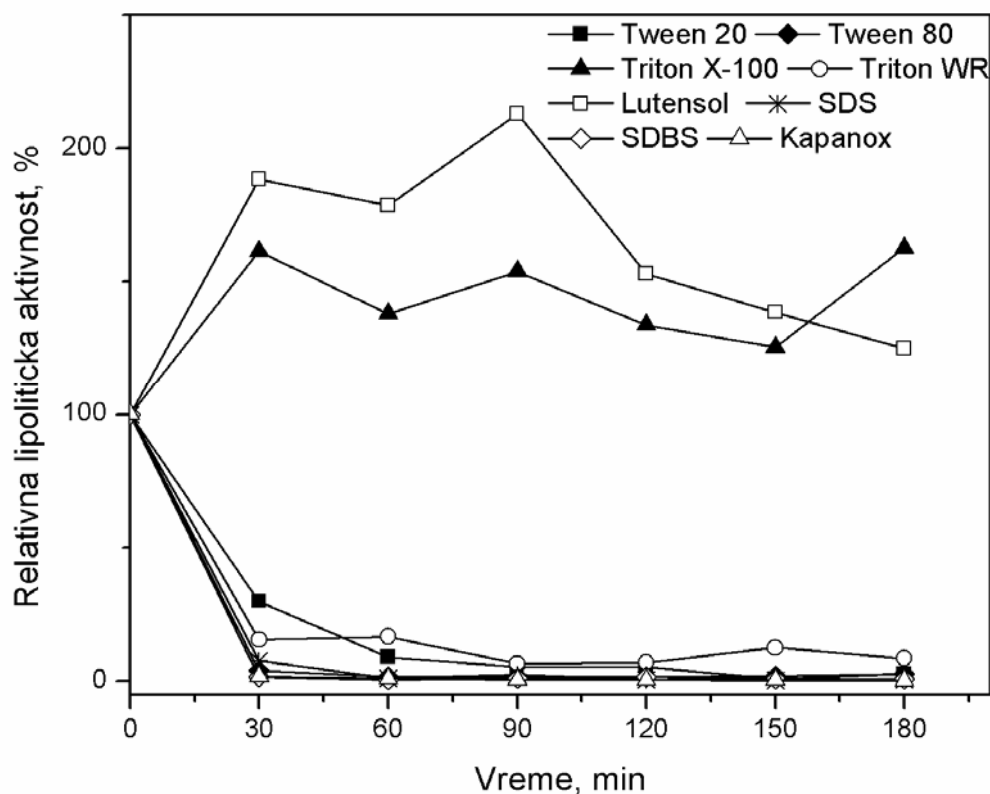
Početna aktivacija *Pseudomonas aeruginosa* san-ai lipaze može se objasniti specifičnom strukturom i mehanizmom delovanja lipaza. Naime, najveći broj enzima koji pripadaju ovoj grupi poseduje peptidni lanac koji u vodenom rastvoru zaklanja aktivni centar poput poklopca čineći ga nedostupnim za molekule supstrata. Ovaj peptidni lanac ima amfifilne osobine i u vodenoj sredini polarne grupe su okrenute ka medijumu dok su nepolarne grupe okrenute ka unutrašnjosti enzima i stvaraju interakcije sa nepolarnim grupama aktivnog centra. U prisustvu nepolarne supstance dolazi do konformacionih promena, tj. do povlačenja peptidnog lanca i otvaranja aktivnog centra, koji postaje dostupan molekulima supstrata. Tako i dodatak izvesnih površinski aktivnih materija može menjati mikrookolinu enzima, povlačeći poklopac i čineći konformaciju enzima „otvorenijom“ za interakciju sa supstratom.

Početna aktivacija ispitivane lipaze u prisustvu SDS-a se može protumačiti tako da se u toku prvih 10 min povećava fleksibilnost supstrat vezujućeg/aktivnog centra enzima, pa time i njegova aktivnost, a zatim kako enzim dejstvom SDS-a sve više gubi nativnu konformaciju, tokom vremena dolazi i do sve većeg gubitka njegove aktivnosti.

Dodatak nejonskih surfaktanata (Tween[®] 20 i Triton[®] X-100) takođe je pokazao potitivan uticaj na aktivnost lipaza u početnom periodu inkubacije enzima. Tako je nakon sat vremena, aktivnost lipaza u prisustvu Triton-a[®] X-100 iznosila čak 129,7%, dok je dodatak Tween-a[®] 20 isto, ali u manjoj meri aktivirao ovaj enzim (100,4%). Kako je nativni enzim bio stabilan u toku prvih 60 min, jasno je da pozitivan uticaj navedenih surfaktanata nije samo relativnog karaktera već dolazi do aktivacije enzima navedenim surfaktantima. Sumirajući objavljene podatke, pretpostavlja se da između lanaca etilenoksida nejonskih PAM i molekula enzima dolazi do stvaranja vodoničnih veza, što za posledicu ima povećanje konformacione fleksibilnosti u aktivnom centru enzima.^{184,185}

Ipak, izvesni autori smatraju da nejonski detergents ne utiču na značajne konformacione promene u molekulu enzima usled nedostatka jakih jonskih interakcija, kao i nemogućnosti nepolarnog repa da proдре u zaklonjene hidrofobne regije molekula enzima. Oni ovaj aktivirajući efekat pripisuju interakcijama surfaktanata sa supstratom ili proizvodima reakcije koji mogu bitno odrediti brzinu nastajanja/razlaganja enzim-substrat kompleksa, posebno u slučajevima izrazito hidrofobnih supstrata ili proizvoda reakcije.^{183,186,187}

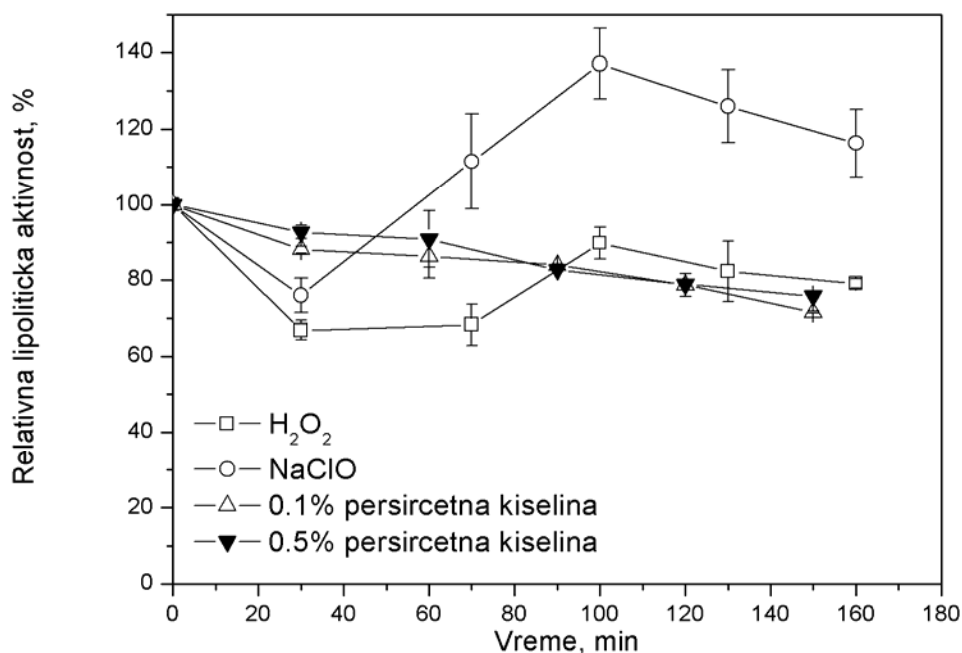
Dobijeni rezultati ukazuju na to da lipaza iz *P. aeruginosa* san-ai ima bolje karakteristike od do sada ispitanih alkalnih lipaza kao i od komercijalno korišćenog preparata Lipolase[®]. Naime, literaturni podaci pokazuju da u prisustvu 1% Triton-a[®] X-100, Tween-a[®] 20 i SDS-a, Lipolase[®] nakon sat vremena zadržava 67, 33 i 20% početne aktivnosti, redom.⁸⁹ Sa druge strane, lipaza dobijena iz našeg soja *P. aeruginosa* snažno je inhibirana dodatkom Tween-a[®] 80 i Triton-a[®] WR 1339, za koje je pokazano da stimulišu aktivnost nekih mikrobnih lipaza.¹⁸⁸



Slika 8.19. Stabilnost lipaze iz *P.aeruginosa* san-ai u prisustvu različitih površinski aktivnih materija na 50 °C.

Dejstvo surfaktanata na lipolitičku stabilnost pokazuje gotovo isti trend sa porastom temperature (Slika 8.19). U prisustvu anjonskih detergenata usled sinergijskog uticaja dolazi do izraženijeg pada aktivnosti kao posledica termičke denaturacije. Sa druge strane, relativna lipolitička aktivnost u prisustvu nejonskih detergenata, Lutensol[®] XP 80 i Triton[®]-a X-100, je povećana što sugerise na stabilizujuće dejstvo ovih detergenata na enzim. Sličnost u uticaju ovih surfaktanata na stabilnost enzima može se pripisati sličnim hemijskim strukturama ovih površinski aktivnih materija (Tabela 6.1). Za razliku od drugih ispitivanih nejonskih detergenata, oni sadrže samo po jedan hidrofilni lanac polioksietilena sastavljenog od 8 (Lutensol[®] XP80) ili 9 (Triton[®] X-100) monomera i razgranati hidrofobni deo relativno male molekulske mase. Tako je hidrofilni-lipofilni balans (HLB) koji predstavlja odnos masa hidrofilne i lipofilne regije ovih surfaktanata ~13, dok je za surfaktante tipa Tween >15, što ukazuje na hidrofobniju prirodu surfaktanata koji su stabilizovali ispitivani enzim. Međutim, kako i HLB Triton-a WR 1339 iznosi 13, treba uzeti u obzir strukturni oblik i veličine molekula surfaktanta (molekulska masa Lutensola[®] XP 80 iznosi 500, Triton[®]-a X-100 iznosi 625, dok Tween[®]-a 20 i 80 iznosi 1220 i 1310, redom, dok Triton[®]-a WR 1339 iznosi čak 4500).

Fluorimetrijske studije različitih enzima u prisustvu nejonskih detergenata pokazale su da sa porastom koncentracije surfaktanta iznad kritične micelarne koncentracije dolazi do značajnog povećanja intenziteta emisionog zračenja koji odgovara triptofanu, što sugerise da su ovi ostaci koji se u vodenom rastvoru nalaze unutar zaklonjenih hidrofobnih regija, u rastvoru nejonskih detergenata zaštićeni hidrofobnom prirodom ovih surfaktanata sa kojim stvaraju micelarnu pseudofazu.^{189,190} Ove studije nesumnjivo ukazuju da se priroda izmenjene aktivnosti enzima u prisustvu ovih PAM prvenstveno zasniva na hidrofilno/hidrofobnim interakcijama enzima i surfaktanata, a ne na interakciji surfaktanata sa supstratom ili proizvodima reakcije. Aktivacija i stabilizacija enzima nejonskim surfaktantima se tako može objasniti povećanjem koncentracije enzima i supstrata u micelarnoj pseudofazi. Imajući u vidu strukturalne razlike između ispitivanih PAM, može se pretpostaviti da veći molekuli pri tome u većoj meri narušavaju strukturu enzima penetrirajući u unutrašnjost molekula enzima što dovodi do gubitka aktivnosti ili deluju poput sternih smetnji za nesmetano odvijanje enzimskih reakcija.



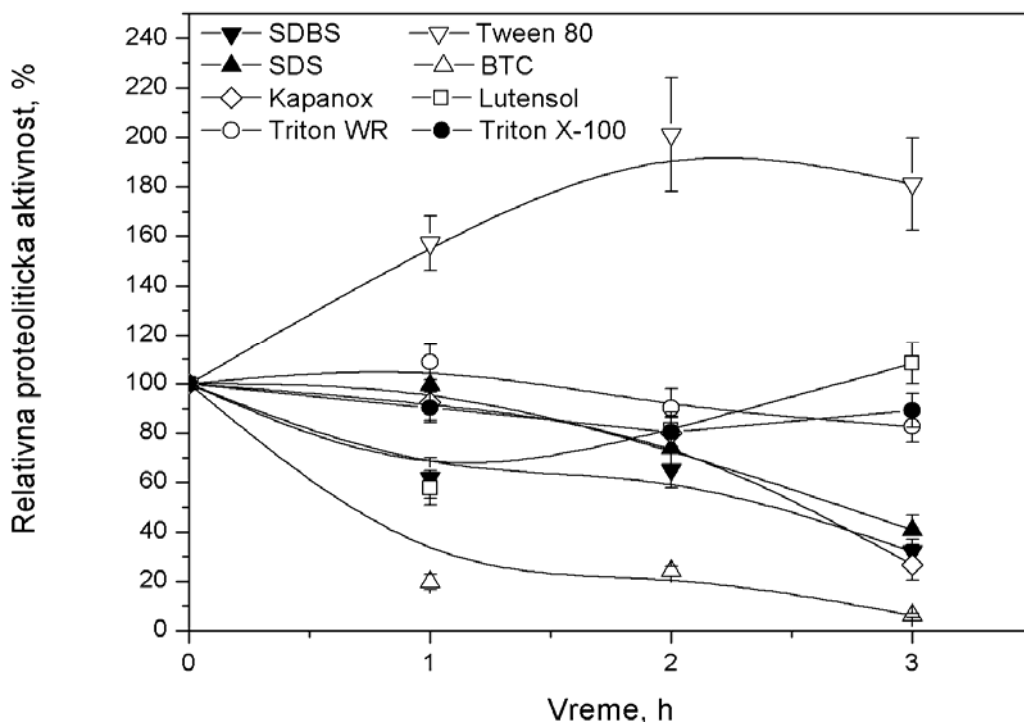
Slika 8.20. Stabilnost lipaze iz *P. aeruginosa* san-ai u prisustvu oksidacionih agenasa. Početna aktivnost je iznosila 2,5 IU ml⁻¹. Aktivnost uzorka bez dodatih oksidacionih agenasa uzeta je kao 100%.

Pseudomonas aeruginosa lipaza je pokazala i dobru aktivnost u prisustvu oksidacionih agenasa (Slika 8.20). Aktivnost u prisustvu oksidacionih agenasa je važna osobina enzima koja se ostvaruje metodama usmerene evolucije i proteinskog inženjeringa.⁸³ Ispitivana lipaza je pokazala superiorne karakteristike u poređenju sa komercijalnim lipolitičkim aditivom Lipolase®, za koji je u literaturi navedeno da zadržava samo 33% aktivnosti u prisustvu vodonik-peroksida, odnosno 43% u prisustvu natrijum-hipohlorita pri koncentracijama od 1% nakon sat vremena.⁸⁹ Naime, nakon 100 min, u prisustvu 2% H₂O₂ i NaClO, ispitivana *P. aeruginosa* lipaza zadržala je 137 i 90% aktivnosti, redom. Aktivnost lipaze u prisustvu ovih aditiva pokazuje interesantan trend: u početnoj fazi aktivnost enzima je smanjena, nakon čega dolazi do povećanja aktivnosti lipaze. Kako je povećanje aktivnosti lipaze u prisustvu vodonik-peroksida i natrijum-hipohlorita utvrđeno u periodu inkubacije kada nativna lipaza počinje da gubi aktivnost, ovaj pozitivan efekat oksidacionih sredstava može da bude posledica

stabilizacije enzima oksidacionim sredstvima. Isto tako, moguće je da je do porasta aktivnosti došlo i usled gubitka oksidacione moći H_2O_2 i NaClO , koji dalje više ne utiču na enzim. Moguće je da su ovom gubitku oksidacione moći doprinele i komponente sirovog preparata enzima koje, iako prisutne u tragovima, smanjuju oksidacionu moć H_2O_2 i NaClO od samog početka inkubiranja.

8.6.2. Stabilnost proteaze iz *Pseudomonas aeruginosa* san-ai u prisustvu surfaktanata, oksidacionih agenasa i komercijalnih detergenata

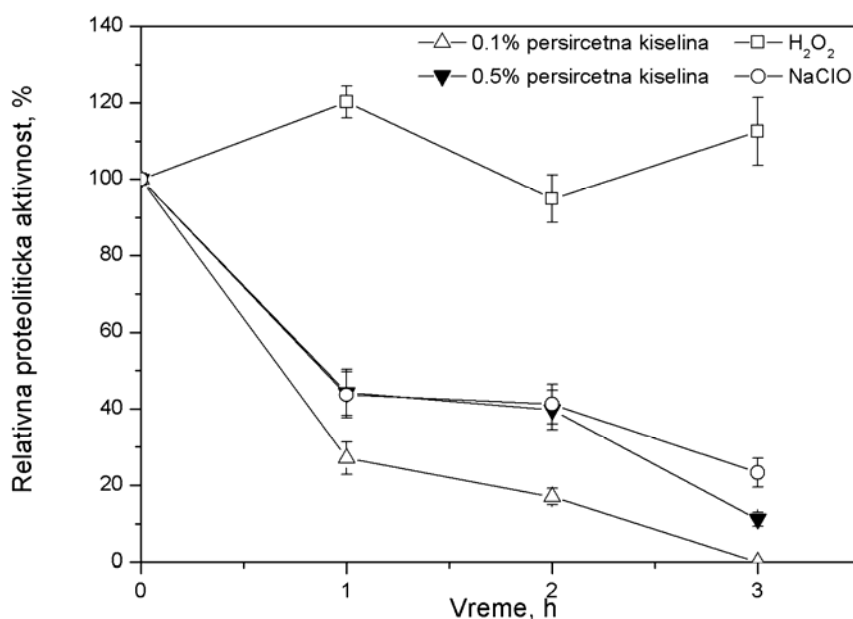
Sirovi enzimski preparat pokazao je i značajnu proteolitičku aktivnost u prisustvu surfaktanata. Kako je prikazano na slici 8.21, nejonski surfaktanti tipa Triton[®] WR 1339 i Tween[®] 80 su snažno aktivirali ispitivanu proteazu. Naime, nakon jednočasovne inkubacije ispitivanog enzimskog preparata u prisustvu Tweena[®] 80 i Tritona[®] WR 1339 zabeležena relativna proteolitička aktivnost iznosila je 157%, odnosno 108%. Poređenjem dobijenih rezultata sa prethodno ispitivanom lipolitičkom aktivnosti u prisustvu istih surfaktanata primećeno je da pri istim uslovima dolazi do gubitka lipolitičke aktivnosti. Po svoj prilici, deaktivirajuće dejstvo koje su ovi surfaktanti pokazali na *P. aeruginosa* lipazu se ne može pripisati isključivo uticaju ovih detergenata na konformaciju enzima, već delimično mogu biti i posledica značajnije proteolize ovog enzima nativno koegzistirajućim proteazama. Literaturni podaci pokazuju da je sličan uticaj ovih surfaktanata i na druge proteaze poreklom iz *Pseudomonas* spp. Primera radi, *P. aeruginosa* PseA proteaza u prisustvu 0,1% Tween[®]-a 80 nakon desetominutne inkubacije dostiže relativnu vrednost od 106%, dok je aktivirajući uticaj pri većim koncentracijama surfaktanata statistički neznačajan.¹⁹¹



Slika 8.21. Stabilnost proteaze iz *P. aeruginosa* san-ai u prisustvu površinski aktivnih materija (2 % w/v, odnosno 0,1 % w/v za SDS i SDBS) na 30 °C. Početna proteolitička aktivnost je iznosila 6,5 IU ml⁻¹. Aktivnost uzorka bez dodatih surfaktanata uzeta je kao 100%.

Istipivani enzim je stabilan i u prisustvu drugih nejonskih detergenata, poput Triton[®]-a X-100, budući da nakon 3 sata u prisustvu ovog detergenta on gubi svega 10% aktivnosti. Takođe, i dodatak jonskog detergenta SDS-a nije inhibitorno delovao na proteazu iz *P. aeruginosa*, obzirom na to da je nakon 1 časa očuvana gotovo celokupna aktivnost (99,4%) u njegovom prisustvu. Razlog ove visoke stabilnosti enzima u prisustvu anjonskih PAM može biti posledica visokog udela anjonskih aminokiselina koje prouzrokuju elektrostatičko odbijanje proteina sa molekulima surfaktanta. Naime, aminokiselinski sastav ovog enzima je utvrđen ranije i on otkriva da sadržaj asparaginske i glutaminske kiseline iznosi čak ~11 i 9%, redom, dok je sadržaj pozitivnih aminokiselina, poput histidina značajno niži (2,6 %).¹⁴⁹

Zahvaljujući pokazanim svojstvima, ispitivani enzim je ocenjen kao poželjan aditiv u formulacijama detergenata, posebno imajući u vidu da patentna i istraživačka literatura pokazuju da je proteaza iz *P. aeruginosa* stabilnija od nekoliko proteaza dobijenih iz nekih pripadnika roda *Bacillus* čije vrste se komercijalno koriste za dobijanje proteaza za upotrebu u industriji detergenata.¹⁹² Konkretno, visoko stabilne proteaze koje proizvode *Bacillus licheniformis* RP1 i NH1 sojevi, kao i proteaza iz *Bacillus circulans* u prisustvu ovog detergenta zadržavaju 91%, 96% i 75% proteolitičke aktivnosti, redom.^{107,108,116} Takođe, stabilnost ispitivanog enzima u prisustvu ovog detergenta je veća u odnosu i na druge enzime poreklom iz *Pseudomonas* spp. Tako, ovaj detergent izaziva gubitak 40% aktivnosti proteaze iz *P. aeruginosa* PseA već nakon 10 minuta inkubacije.¹⁹¹



Slika 8.22. Stabilnost proteaze iz *P. aeruginosa* san-ai u prisustvu oksidacionih agenasa.

Početna proteolitička aktivnost je iznosila 6,5 IU ml⁻¹. Aktivnost uzorka bez dodatih oksidacionih agenasa uzeta je kao 100%.

Nakon studije stabilnosti proizvedene proteaze u prisustvu različitih tipova surfaktanata, ispitan je i uticaj oksidacionih agenasa na njegovu aktivnost i stabilnost tokom vremena (slika 8.22). Kriva inaktivacije enzima tokom vremena pod dejstvom

oksidacionih agenasa je pokazala da je proteaza iz *P. aeruginosa* san-ai izuzetno stabilna u prisustvu vodonik-peroksida. Pokazano svojstvo ističe mogućnost primene ovog enzima kao aditiva u detergentima, budući da je oksidativna stabilnost proteaza izuzetno retko primećena. Komercijalne proteaze koje se koriste u detergentima u blizini katalitičkog serina u aktivnom centru sadrže aminokiselinu metionin. Tioetarska grupa metionina u aktivnom centru enzima koji je sadrže utiče na stvaranje vodoničnih veza sa molekulima supstrata doprinoseći tako katalitičkoj funkciji enzima. Oksidacijom tioetarskog sumpora metionina do sulfoksidnog derivata dolazi do rapidnog gubitka aktivnosti komercijalnih subtilizinskih proteaza u prisustvu oksidacionih agenasa.¹⁹³

Literaturni primeri pokazuju mali broj oksidativno stabilnih proteaza koje nisu dobijene metodama usmerene evolucije. Tako producenti subtilizinskih proteaza *Bacillus licheniformis* RP1 i MP1, kao i *Bacillus cereus* proizvode proteaze koji u prisustvu vodonik-peroksida zadržavaju 70 %¹⁰⁷ i 64%¹⁰⁹, odnosno 103,4%¹⁹⁴, redom. Sa druge strane, subtilizinska proteaza iz *Bacillus* sp. KSMKP43 je potpuno podložna gubitku aktivnosti u prisustvu izbeljivača na bazi kiseonika već u veoma kratkom periodu inkubacije.¹¹⁴ Isto tako i druge native *Bacillus* spp. proteaze pokazuju umerenu oksidativnu stabilnost; proteaza iz *Bacillus megaterium* RRM2 je u prisustvu ovog oksidacionog agensa zadržala 87%¹⁰⁶, slično proteazi iz *Bacillus* sp. RKY3, koja je nakon jednočasovne inkubacije u prisustvu 2% v/v ovog oksidacionog agensa, očuvala oko 90% aktivnosti.¹¹⁴ Sa druge strane, oksidacioni agensi izazivaju veći stepen inaktivacije *Bacillus* sp. RGR-14 proteaze; inkubacija ovog enzima sa 1% v/v vodonik-peroksidom dovodi do gubitka od preko 40% aktivnosti.

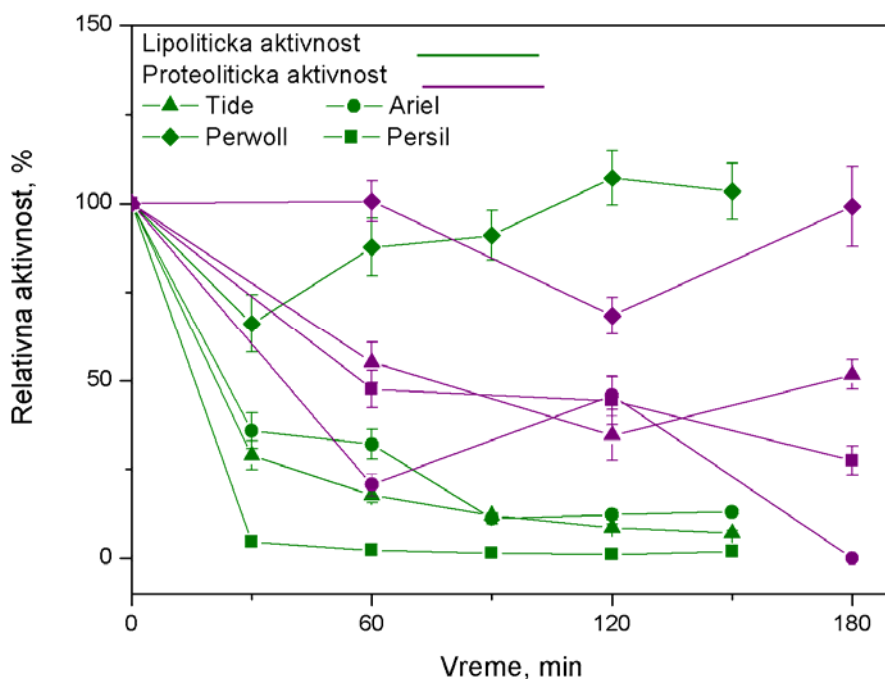
Druge proteaze iz *Pseudomonas* spp. ne pokazuju značajniju oksidativnu stabilnost; proteaza iz *Pseudomonas putida* SKG-1 gubi 20 % (pri koncentraciji 0,1%) do 30 % (u prisustvu 0,5 % H₂O₂) aktivnosti nakon polučasovne inkubacije u prisustvu H₂O₂ u zavisnosti od njegove koncentracije.¹⁹⁵

Sa druge strane, proteaza iz *P. aeruginosa* san-ai u prisustvu ovog izbeljivača dostiže relativnu aktivnost od 120%, a ovu vrednost zadržava i tokom tročasovne inkubacije. Aktivacija proteaza u prisustvu oksidacionih agenasa osobina je malog broja proteaza u literaturi.

Redak primer aktivacije enzima u prisustvu oksidacionih agenasa predstavlja enzim iz *Bacillus clausii* I-52 koji je izolovan iz zagađenog zemljišta, a produkuje proteazu čija relativna aktivnost u prisustvu ovog izbeljivača dostiže ~115% tokom produžene inkubacije (72h).¹⁹⁶

8.6.3. Kompatibilnost proizvedenih enzima sa komercijalnim detergentima

Da bi se potvrdila komercijalna primenljivost proizvedenih enzima, ispitana je stabilnost/aktivnost lipaze i proteaze iz *P.aeruginosa* u rastvorima komercijalnih formulacija detergenata, i to: Ariel, Persil, Perwoll i Tide (slika 8.23). U literaturi je zabeleženo da komercijalni detergentsi čak i pri malim koncentracijama, a usled sinergijskog inhibirajućeg ili deaktivirajućeg dejstva komponenti koje sadrže, u velikoj meri umanjuju aktivnost komercijalnog enzimskog preparata Lipolase®.¹⁹⁷



Slika 8.23. Stabilnost lipaze i proteaze iz *P.aeruginosa* san-ai u prisustvu komercijalnih detergenata na 30 °C.

Oba ispitana enzima su pokazala visoku stabilnost u prisustvu Perwolla. Takođe, primetna je i izuzetna kompatibilnost proizvedene lipaze sa komercijalnim detergentom Ariel. Ovaj rezultat bi mogao da bude od potencijalnog industrijskog značaja posebno imajući u vidu da literaturni podaci pokazuju da komercijalni lipolitički preparat Lipolase[®], koji je u širokoj upotrebi kao aditiv detergentima, gubi oko 60% aktivnosti nakon jednočasovne inkubacije pri nižim koncentracijama Ariela (1% (w/v)).⁸⁹ Uzevši u obzir sveukupnu stabilnost proizvedene lipaze u prisustvu površinski aktivnih materija, oksidacionih agenasa i komercijalnih detergenata, uočava se da proizvedeni enzim ima značajno bolja svojstva za primenu u detergentima u poređenju sa drugim lipazama iz *Pseudomonas aeruginosa*. Primera radi, lipaza iz *Pseudomonas aeruginosa* AAU2 zadržava <30% aktivnosti pri značajno nižim koncentracijama komercijalnih detergenata Tide i Ariel (0,1 % (w/v)).¹⁷¹

Pored toga, produkovana proteaza je pokazala zadovoljavajuću stabilnost i funkcionalnost u rastvorima koji sadrže komercijalne detergente Persil i Tide.

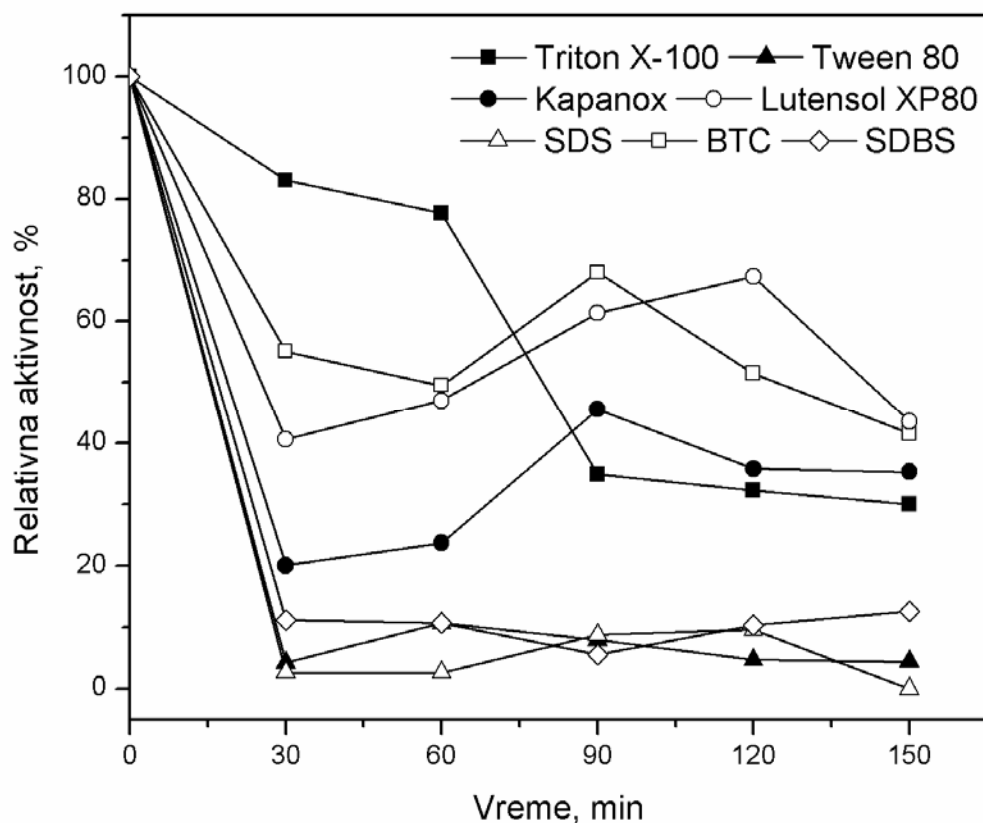
Sa druge strane, proteolitička aktivnost je značajno smanjena u prisustvu Ariela. Ipak, ohrabruje činjenica da nativno prisutne granulisane proteaze u istom detergentu, pokazuju sličnu krivu inaktivacije enzima po rastvaranju ove formulacije. Komercijalno prisutna proteaza iz ovog detergenta, nakon jednog časa zadržava tek oko 40% početne aktivnosti sa daljim rapidnim gubitkom proteolitičkih svojstava i gotovo potpunim gubitkom aktivnosti nakon jednoipočasovne inkubacije.¹¹³ Obzirom na razlike u eksperimentalnim postavkama, nije moguće izvršiti komparaciju sa velikim brojem literaturno opisanih enzima. Primera radi, proteaza iz *Bacillus cereus* SIU je pokazala izuzetnu stabilnost u formulacijama sa niskim sadržajem detergenta Ariel i Tide (1% w/v) u čijem prisustvu zadržava 70-80 % aktivnosti. Ipak, uočljiv nagli gubitak aktivnosti sa porastom koncentracije detergenata postavlja pitanje o uporedivosti dobijenih rezultata.¹¹²

Treba imati u vidu da i komercijalni enzimski proteolitički preparat namenjen detergentima Purafect, pri nižoj koncentraciji Ariela (0,7 % w/v) gubi već oko 30% aktivnosti nakon jednog časa.¹⁹⁸

8.7. Lipaza iz *Pseudomonas putida* B-21 kao aditiv u detergentima

8.7.1. Stabilnost lipaze iz *Pseudomonas putida* B-21 u prisustvu surfaktanata, oksidacionih agenasa i komercijalnih detergenata

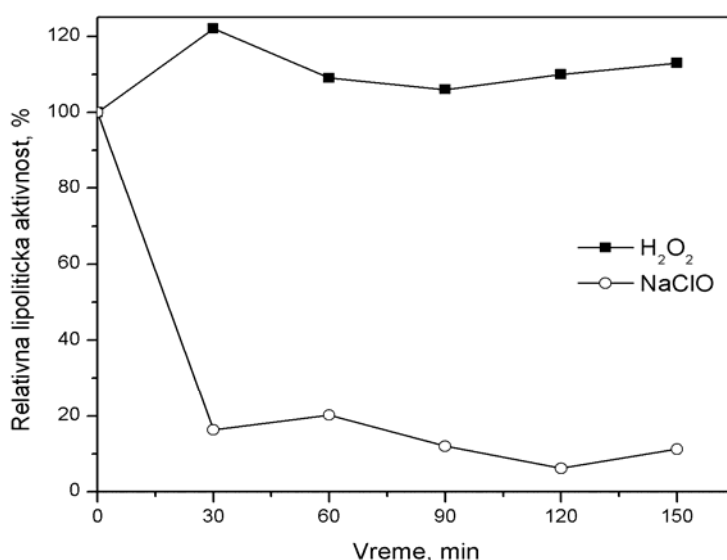
Kako je i lipaza iz *P. putida* B-21 pokazala odgovarajuće temperaturne i pH profile aktivnosti, ispitana je i njena kompatibilnost sa različitim tipovima surfaktanata u cilju utvrđivanja primenljivosti proizvedene lipaze u industriji detergenata. Kao što je na slici 8.24 prikazano, anjonski detergentsi snažno deaktiviraju lipazu iz *P. putida* B-21, pa je već nakon pola sata u prisustvu SDBS-a gubitak aktivnosti ~90%, dok SDS gotovo potpuno deaktivira proizvedeni enzim.



Slika 8.24. Stabilnost lipaze iz *P. putida* B21 u prisustvu površinski aktivnih materija (2 % w/v, odnosno 0,1 % w/v za SDS i SDBS) na 30 °C. Početna aktivnost je iznosila 0,5 IU ml⁻¹. Aktivnost uzorka bez dodatih surfaktanata uzeta je kao 100%.

Sa druge strane, nejonski detergentsi poput Tritona[®] X-100 i Lutensola[®] XP80 umereno deaktiviraju ovu lipazu. Iako je gubitak aktivnosti ispitane lipaze u prisustvu Tritona[®] X-100 nakon polučasovne inkubacije ~15%, što ispitivani enzim svrstava u red izuzetno stabilnih enzima, lipaza iz *P. putida* je lošije ocenjena od lipaze iz *P. aeruginosa* san-ai. Iako je pokazano da ispitani enzim poseduje bolja svojstva od komercijalnog preparata Lipolase[®], poređenjem apsolutnih i relativnih vrednosti aktivnosti proizvedenih lipaza iz *Pseudomonas* spp. u prisustvu različitih PAM uočava se da je izostao aktivirajući/stabilišući efekat koji su pojedini surfaktanti imali na lipazu iz *P. aeruginosa*. Naime, pod istim uslovima Triton[®] X-100, Lutensol[®] XP 80, Tween[®] 20, pa čak i SDS su aktivirali lipazu iz *P. aeruginosa* san-ai i do 55%.

Izvesne razlike u uticaju tipa surfaktanata na aktivnost lipaze, primećene su prilikom inkubacije proizvedenih enzima u prisustvu katjanskog detergenta BTC 50, koji je po strukturi smeša *N,N*-alkildimetil-*N*-benzilamonijum hlorida. Dok ovaj surfaktant gotovo trenutno deaktivira *P. aeruginosa* san-ai lipazu, *P. putida* lipaza zadržava visok stepen aktivnosti u prisustvu ovog detergenta (>50% nakon pola sata). Katjanski detergentsi su snažni inhibitori pojedinih enzima, na čemu se zasniva njihovo baktericidno dejstvo.¹⁹⁹ Sumirajući literaturne podatke o uticaju ovih surfaktanata na lipaze, može se uočiti da katjanski detergentsi skoro po pravilu izazivaju potpuni gubitak aktivnosti, i da su retki primeri lipaza stabilnih u prisustvu ovog tipa surfaktanata.²⁰⁰

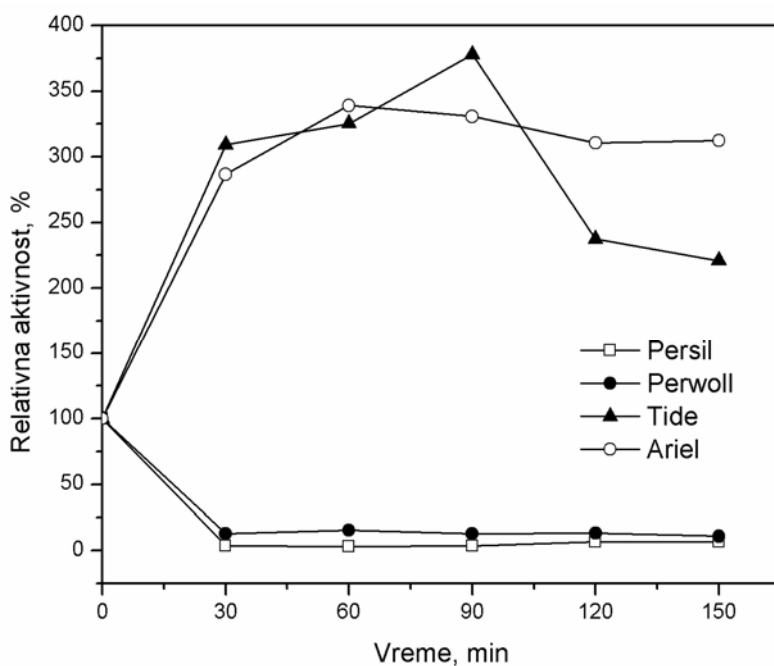


Slika 8.25. Stabilnost lipaze iz *P. putida* B21 u prisustvu oksidacionih agenasa na 30 °C.

Lipaza iz *P. putida* je pokazala i dobru kompatibilnost sa nekim tipovima izbeljivača (slika 8.25). U prisustvu natrijum-hipohlorita, enzim rapidno biva deaktiviran, dok dodatak vodonik-peroksida nema takav uticaj na ispitivani enzim. Tako, i nakon višečasovne inkubacije enzima sa ovim izbeljivačem na bazi kiseonika, njegova aktivnost je u potpunosti očuvana.

8.7.2. Kompatibilnost lipaze iz *Pseudomonas putida* B-21 sa komercijalnim detergentima

U ovom radu ispitana je takođe stabilnost lipaze u prisustvu različitih komercijalnih detergenata. Rezultati ovog eksperimenta su prikazani na slici 8.26.



Slika 8.26. Uticaj prisustva komercijalnih detergenata pri koncentraciji 2 % (w/v) na stabilnost lipaze iz *P. putida* na 30 °C tokom 2,5 h.

Kao što se sa slike 8.26 vidi, neki komercijalni detergentsi su imali inhibitoran ili denaturišući uticaj na proizvedenu lipazu, dok su drugi pokazali zadovoljavajuće rezultate značajno povećavajući aktivnost ispitivanog enzima. Tako je nakon sat vremena, aktivnost lipaze inkubirane u rastvorima komercijalnih detergenata, Ariel i

Tide, višestruko uvećana (>3 puta) u odnosu na aktivnost ovog enzimskog preparata bez dodatka detergenata. Sa druge strane, aktivnost lipaze iz *P. putida* u prisustvu druga dva ispitivana detergenta značajno opada odmah po njihovom dodavanju- tako već nakon pola sata, u prisustvu Perwoll-a ispitivani enzim zadržava tek 15,5% svoje aktivnosti, dok Persil gotovo potpuno denaturiše dobijenu lipazu.

Interesntno je to da, iako su poreklom iz iste vrste mikroorganizama, dobijeni enzim pokazuje potpuno drugačija svojstva u poređenju sa lipazom iz *Pseudomonas aeruginosa* san-ai. Naime, dok je Perwoll snažno inhibirao lipazu iz *P. putida*, ovaj komercijalni detergent je imao pozitivan uticaj na aktivnost san-ai lipaze. Sa druge strane, detergents koji su aktivirali lipazu iz *P. putida*, Ariel i Tide, su u velikoj meri deaktivirali lipazu iz *P. aeruginosa* san-ai, koja već nakon pola sata u prisustvu ovih detergenata zadržava ~35 i 29% aktivnosti, redom.

Pregledom literature, uočava se da ova svojstva ispitane lipaze svrstavaju proizvedeni enzim u red izuzetno atraktivnih potencijalnih aditiva u detergentima budući da mali broj enzima može da parira ovako visoko održanoj aktivnosti u komercijalnim detergentima.

Pregledom literature, kao visokostabilni enzim u prisustvu komercijalnih detergenata, izdvaja se *Bacillus* sp. RSJ-1 koji u većini formulacija zadržava preko 55% aktivnosti, dok je aktivnost u Arielu čak 99%. Ipak ova ispitivanja su vršena pri značajno nižim koncentracijama detergenata (~0,3%). Takođe, ovaj enzim nije pokazao visoku oksidativnu aktivnost, budući da u prisustvu 1% H₂O₂ zadržava svega 47% aktivnosti.²⁰¹

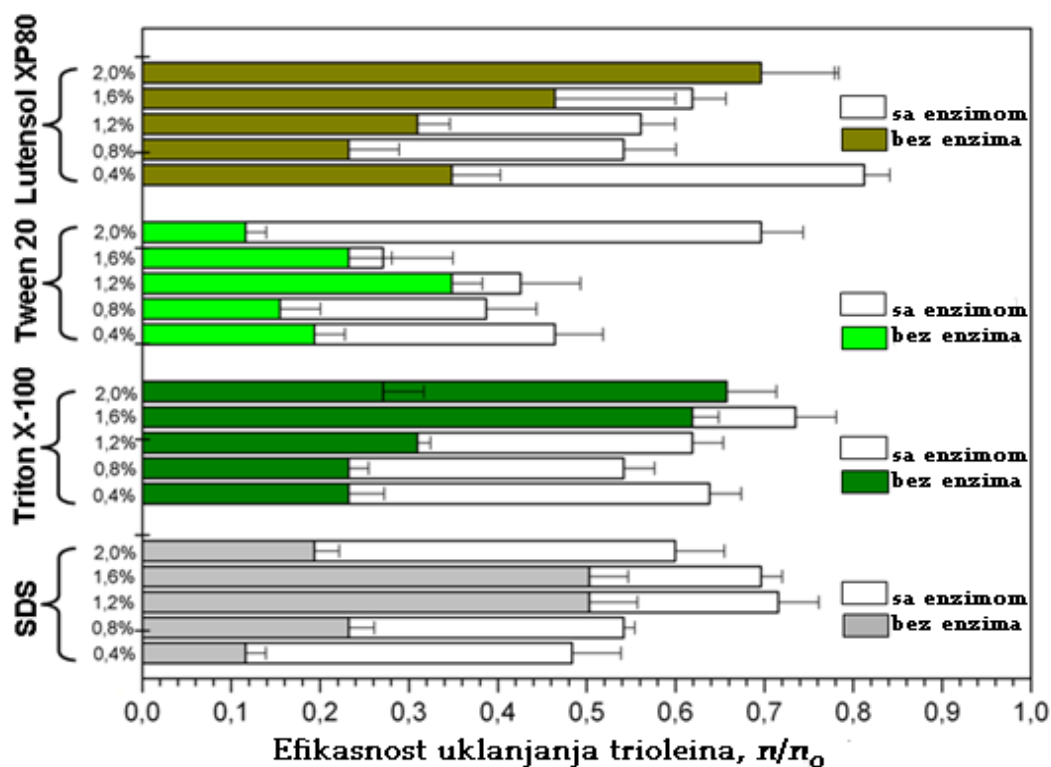
8.8. Formulacija enzimskog preparata za čišćenje

Sumirajući prethodne rezultate, imajući u vidu relativne i apsolutne vrednosti pokazanih enzimskih aktivnosti u uslovima relevantnim za primenu u detergentima, sirovi enzimski preparat iz *Pseudomonas aeruginosa* san-ai koji sadrži lipaze i proteaze je ocenjen kao atraktivniji aditiv u formulacijama detergenata. Stoga su naredna istraživanja bila posvećena ispitivanju kvaliteta sastavljenih enzimskih formulacija na bazi ovog enzima sa stanovišta efikasnosti pri čišćenju, stabilnosti pri skladištenju i sastava otpadnih voda od pranja. To je podrazumevalo da se enzimski preparati lipaza i proteaza kombinuju sa odgovarajućim PAM u različitim odnosima u cilju sastavljanja nekoliko formulacija. Efikasnost i stabilnost različitih formulacija je, zatim, testirana da bi se došlo do optimalnog sastava. U tom cilju bilo je potrebno:

- 1) ispitati aktivnosti proizvedenih lipaza pri istovremenom prisustvu različitih PAM pri različitim koncentracijama na temperaturama karakterističnim za proces pranja i u blago alkalnoj sredini;
- 2) ispitati efikasnost formulacija pri uklanjanju zamašćenja standardnim testovima pri referentnim uslovima (30 °C, 1-1,5 h);
- 3) ispitati kvalitet otpadnih voda od pranja nakon upotrebe formulacije detergenta (standardne metode za određivanje HPK otpadnih voda).

Na osnovu prethodnih rezultata aktivnosti enzima u prisustvu velikog broja PAM-a, u početnim istraživanjima je ispitana efikasnost formulacija preparata lipaze (100 IU) sa aspekta uklanjanja masnih mrlja koje se u osnovi sastoje od onih površinski aktivnih materija koja su pokazale neinhibitorno dejstvo na proizvedenu lipazu, i to: SDS-a, Tween[®] 20, Triton[®] X-100 i Lutensol[®]-a XP80. Kako bi se utvrdila efikasnost formulacija pri uklanjanju zamašćenja, praćena je sposobnost uklanjanja trioleina sa pamučnih tkanina, koje su potom prane u formulacijama koje sadrže različite tipove surfaktanata pri različitim koncentracijama. Količina masnih kiselina koje su se oslobodile u toku reakcije u rastvor detergenta određivana je standardnom

titrimetrijskom metodom, dok je preostali sadržaj ulja na tkanini određivan metodom ekstrakcije po Soksletu (Soxhlet). Efikasnost uklanjanja mrlja je izražena kao odnos uklonjene količine trioleina i početne količine trioleina. Neki od odabranih rezultata prikazani su na slici 8.27.



Slika 8.27. Efikasnost uklanjanja trioleina sa pamučne tkanine pri njenom tretiranju sa formulacijama koje sadrže različite surfaktante pri različitim koncentracijama sa enzimom (beli barovi) i bez enzima (obojeni barovi). Ukupna aktivnost lipaze je bila svuda ista i iznosila je 100 IU.

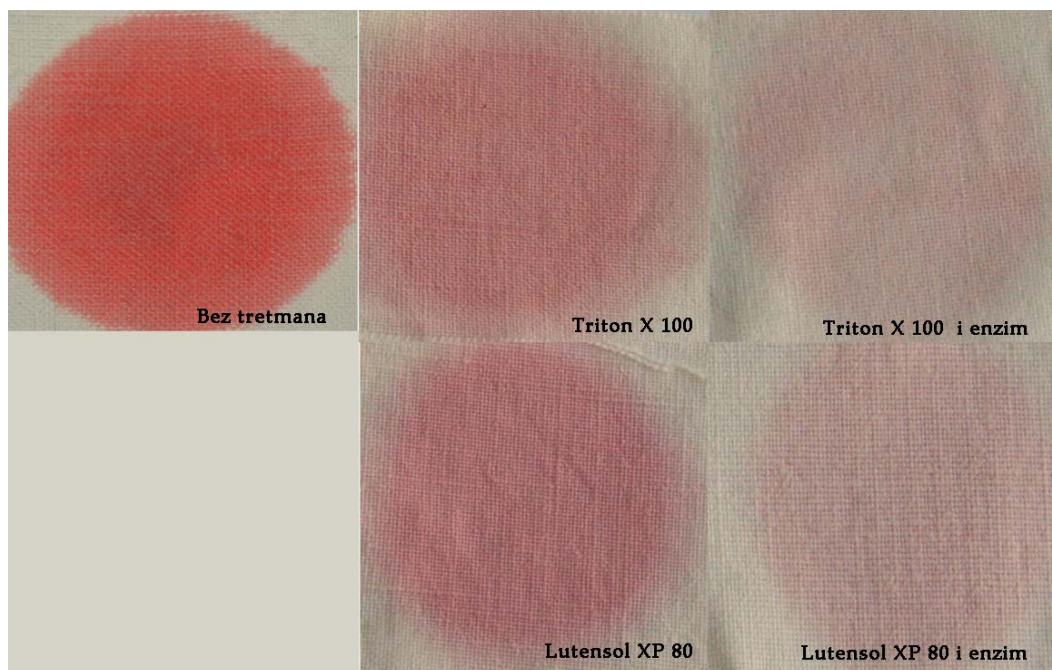
Lako se uočava da se u slučaju svih ispitanih formulacija masne mrlje efikasnije uklanjaju ukoliko je u formulaciji prisutan enzimski preparat, i to je efekat veći za manje koncentracije PAM-a. Interesantno je da je profil zavisnosti količine uklonjenih masnih kiselina od koncentracije PAM veoma sličan za formulacije sa i bez enzimskog preparata. To može da ukaže na to da ne dolazi do inaktivacije enzima PAM-om već je veća efikasnost uklanjanja za enzimске formulacije posledica sinergijskog dejstva

enzimske hidrolize trioleina i površinske aktivnosti hemijskih sredstava. Isto tako, ovi rezultati nedvosmisleno pokazuju da je dodatkom sirovog enzimskog preparata iz *P. aeruginosa* moguće smanjiti koncentraciju hemijske supstance gotovo u svim formulacijama sa 2,0 na 0,4%, a da se efikasnost uklanjanja masnih mrlja ne smanji, odnosno čak poveća.

Sličan fenomen je primećen u studiji, koja je imala za cilj da se potvrdi mogućnost primene lipaze iz *Staphylococcus* sp. kao aditiva u detergentima. Naime, dok je dodatak ove lipaze nedvosmisleno povećavao učinkovitost odmašćivanja pamučnih tkanina i do 25% u zavisnosti od koncentracije detergenta, povećanje koncentracije detergenta iznad 0,5% se pokazalo kao nesvrishodno budući da sa povećanjem koncentracije surfaktanta ne dolazi do srazmernog povećavanja efikasnosti pranja.²⁰² Ovaj krajnji efekat objedinjuje uticaj nekoliko fenomena koji se tiču uticaja enzima i surfaktanta na zamašćenje, kao i na samu tkaninu. Svakako da sama hemijska struktura surfaktanata, kao i njegova koncentracija imaju krucijalni efekat u pogledu sposobnosti kvašenja tkanine, a time neposredno i na stepen penetracije PAM i distribuciju tečne faze u unutrašnjost vlakana. Tako, sposobnost kvašenja tkanine direktno zavisi od stope difuzije surfaktanata ka površini tkanine. Treba uzeti u obzir da efikasnost i efektivnost surfaktanata sa aspekta kvašenja tkanine zavisi i od polarnosti površine tekstila, pa hemijska struktura tekstilnih vlakana i način obrade tekstila utiču na mehanizme adsorpcije surfaktanta. Dobro je poznato da je koeficijent difuzije PAM u vodenom rastvoru smanjen sa povećanjem stepena hidratisanosti molekula (solvatacije) i povećanjem dužine lanca alkil grupe. Malobrojne studije koje su fokusirane na istraživanje ovih fenomena su ukazale na to da priroda hidrofobnih delova surfaktanta u najvećoj meri određuje stepen difuzije u tkaninu.^{203,204} Pri tom je ocenjeno da surfaktanti koji sadrže razgranate hidrofobne lance značajno brže difunduju u odnosu na surfaktante sa ravnim dugolančanim alkil grupama. Shodno tome, sveukupno bolje ocenjena učinkovitost detergenata na bazi Tritona[®] X-100 i Lutensola[®] XP 80 se može očekivati budući da ovi surfaktanti imaju veću sposobnost kvašenja pamučnih tkanina. Ipak za sagledavanje doprinosa enzima u formulaciji treba imati u vidu različitu hidrofilno/hidrofobnu prirodu onečišćenja i prirode pamučnih vlakana. Kako je jasno da adsorpcija, distribucija i orijentacija molekula surfaktanata ima složenu prirodu, posebno u ovako kompleksnom dinamičkom sistemu koji pored PAM uključuje i enzime koji

simultano vrše hidrolizu masnoće, učinkovitost formulacije je neophodno utvrditi empirijskim putem. Generalno, delovanje površinski aktivnih materija uključuje tri mehanizma uklanjanja masnoće sa tretiranih površina pri čemu oni mogu delovati odvojeno, simultano ili uzastopno. Dominantni mehanizam podrazumeva smanjenje površinskog napona i povećavanja kontaktnog ugla između nečistoće i tretirane površine sve do njenog otcepljenja u vidu emulgovanih kapljica pri čemu je ovaj mehanizam potpomognut hidrodinamičkim silama nastalim usled mešanja sistema.²⁰⁵ Istovremeno, dolazi i do secesije nečistoća na molekularnom nivou u vidu malih micela.²⁰⁶ Ove promene u strukturi lipidnog filma omogućavaju preraspodelu i prodiranje nečistoće u prostore između prediva i vlakana u tkanini. Studije u kojima je ispitivan uticaj dodatka lipaze na uklanjanje nečistoća sa tkanina različite hemijske pristupačnosti su potvrdile da lipaze povećavaju efikasnost uklanjanja masnoće sa različitih tipova tkanina, kao i različitih morfoloških lokacija na tkanini, uključujući površinu tkanine, kao i kapilarnih međuprostora između vlakana i svežnjeva prediva.²⁰⁷ Kako lipaze konstantno vrše hemijsku degradaciju nečistoće, čime se konstantno menja sastav smeše za pranje, model koji bi mogao da predvidi i objasni doprinos enzima u ovim formulacijama je teško proceniti.

Kako se najveći stepen odmašćivanja pri niskom sadržaju PAM ostvaruje u formulacijama baziranim na Lutensolu[®] XP 80 i Tritonu[®] X-100, istim tretmanom su podvrgnute pamučne tkanine zaprljane prethodno obojenim trioleinom Sudan red bojom kako bi se vizuelno ispitala i demonstrirala efikasnost odmašćivanja tkanina (slika 8.28).



Slika 8.28. Efikasnost uklanjanja trioleina obojenog Sudan red bojom u formulacijama niske koncentracije detergenata (0,4% w/v) sa i bez dodatka enzima.

Za date formulacije određeni su i parametri od značaja za kvalitet otpadnih voda od pranja i to sadržaj suve materije, sadržaj pepela, sadržaj organske suve materije, hemijske potrošnje kiseonika (HPK) i sadržaj ukupnog azota. Neki od rezultata su prikazani u tabeli 8.4.

Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da povećanje koncentracije PAM u formulaciji u intervalu od 0,4 do 1,2% značajno utiče na smanjenje kvaliteta otpadnih voda, odnosno HPK vrednost detergenta povećava se oko 3 puta. Znači, od izuzetnog je značaja sa aspekta zaštite životne sredine smanjiti koncentraciju PAM-a u deterгентu, ali je sa stanovišta neophodne funkcionalnosti koju nameću zakoni tržišta potrebno da detergent nema redukovanu moć čišćenja. Treba navesti da sve ispitane formulacije sadrže 10% (v/v) sirovog enzimskog preparata (100 IU), odnosno opterećenje vode enzimom je već uzeto u obzir. Ako razmatramo uticaj vrste PAM-a na date parametre kvaliteta vode, možemo zaključiti da on nije veliki. Na primer, rezultati HPK za koncentraciju PAM od 0,4% su u intervalu od 8455 za SDS do 8930 za Lutensol® XP 80 (STD<5%).

Tabela 8.4. Sastav nekoliko formulacija detergenata sa enzimom (100 IU) sa aspekta kvaliteta otpadnih voda od pranja kao i njihove HPK vrednosti (treba imati u vidu da se ove vrednosti odnose na sam koncentrovani detergent koji će se koristiti razblažen sa vodom i da ovo nisu vrednosti otpadne vode od pranja)

	Lutensol [®] XP 80		Triton [®] X-100		SDS	
Koncentracija surfaktanta	0,4%	1,2%	0,4%	1,2%	0,4%	1,2%
Suva materija, SM (%)	0,413	0,496	0,524	0,589	0,523	0,600
Pepeo (%)	0,062	0,037	0,036	0,031	0,174	0,052
Organska suva materija (%)	0,351	0,459	0,488	0,557	0,349	0,548
Organska suva materija (% _{SM})	84,98	92,44	93,08	94,69	66,68	91,26
Hemijska potrošnja kiseonika, HPK (mgO ₂ /dm ³)	8930	25480	8645	23569	8455	18914
Ukupni azot (mg/dm ³)	139	175	131	216	124	182

Različite komponente savremenih detergenata su dokazano štetne za vodene organizme, a njihovim otpuštanjem u vodotokove se nepobitno stvara pretnja i za ljudsko zdravlje. Zagađujuće dejstvo detergenata posledica je različitih fizičkih, hemijskih i bioloških faktora i ono uključuje sinergijske efekte svih komponenata formulacije, kao i drugih supstanci iz prirode, pa ne čudi da su informacije o biodegradabilnosti i toksičnosti detergenata u prirodnim uslovima oskudne. Anjonski, nejonski surfaktanti i fosfati imaju toksičan efekat na različite vodene organizme u koncentracijama oko 0,0025-300 mg/l, 0,3-200 mg/l i 5-9 mg/l, redom. Dalje, različite komponente formulacija podležu degradaciji različitom brzinom, pri čemu i pojedini biodegradabilni sastojci, npr. kvaternarne amonijum soli, prilikom razgradnje daju toksične materije.²⁰⁸ Imajući u vidu velike količine ovih efluenata koji se svakodnevno ispuštaju u vodotokove, smanjenje količine agresivnih i toksičnih materija bi svakako smanjilo rizik od zagađenja koje prevazilazi kapacitet životne sredine.

Kako je najveća efikasnost uklanjanja zamašćenja u formulacijama sa niskim sadržajem površinski aktivnih materija (0,4%) ostvarena korišćenjem formulacija koje sadrže Lutensol[®] XP 80 (efikasnost odmašćivanja >80%) i/ili Triton[®] X-100 (efikasnost odmašćivanja >60%), napravljen je pokušaj da se optimizuje sastav enzimske

formulacije na bazi jednog ili oba surfaktanta metodom statistički planiranog eksperimenta.

Efikasnost odmašćivanja je praćena refleksionom spektrofotometrijom na bazi ukupne promene u boji i razlike u svetlini pamučnih tkanina prethodno zaprljanih obojenim trioleinom (koji je sadržao 0,2% w/v Sudan red boje). Tkanine su prane različitim formulacijama (50 ml) u kojima su varirani tip i koncentracija surfaktanata, pH formulacije, kao i količina enzima (lipolitičke aktivnosti 2,5 IU ml⁻¹). Eksperimentalni plan i rezultati dobijeni na osnovu ukupne promene u boji i razlike u svetlini tkanine dati su u sledećoj tabeli:

Tabela 8.5. Eksperimentalni plan-kodirane i realne vrednosti parametara i ostvarena efikasnost čišćenja

Redni broj	Lutensol % w/v	Triton % w/v	pH	Enzim ml	ukupna razlika u boji	razlika u svetlini tkanine
	X_1	X_2	X_3	X_4		
1	1(1.59)	1(1.59)	1(10,19)	1(8.38)	51,20	49,58
2	-1(0.41)	1(1.59)	1(10,19)	-1(3.62)	57,07	56,27
3	1(1.59)	-1(0.41)	1(10,19)	-1(3.62)	56,84	58,06
4	-1(0.41)	-1(0.41)	1(10,19)	1(8.38)	49,35	48,36
5	1(1.59)	1(1.59)	-1(7.81)	-1(3.62)	48,67	49,65
6	-1(0.41)	1(1.59)	-1(7.81)	1(8.38)	55,24	56,70
7	1(1.59)	-1(0.41)	-1(7.81)	1(8.38)	54,10	55,22
8	-1(0.41)	-1(0.41)	-1(7.81)	-1(3.62)	47,24	47,34
9	1.682(2)	0(1)	0(9)	0(6)	44,51	45,55
10	-1.682(0)	0(1)	0(9)	0(6)	38,09	39,19
11	0(1)	1.682(2)	0(9)	0(6)	42,63	43,25
12	0(1)	-1.682(0)	0(9)	0(6)	44,91	43,67
13	0(1)	0(1)	1.682(11)	0(6)	59,03	60,59
14	0(1)	0(1)	-1.682(7)	0(6)	34,83	33,44
15	0(1)	0(1)	0(9)	1.682(10)	50,33	49,90
16	0(1)	0(1)	0(9)	-1.682(2)	46,09	47,44
17	0(1)	0(1)	0(9)	0(6)	38,47	39,19
18	0(1)	0(1)	0(9)	0(6)	39,67	39,90
19	0(1)	0(1)	0(9)	0(6)	38,73	39,57
20	0(1)	0(1)	0(9)	0(6)	39,16	40,64

Rezultati dobijeni na osnovu promene obojenja i svetline tkanine pokazuju veliki stepen slaganja (stdev<3%) pa su za regresionu i disperzionu analizu uzete srednje vrednosti dobijene procentualne uklonjenosti masne mrlje na osnovu ova dva parametra.

Model je ocenjen kao adekvatan na osnovu vrednosti Fišerovog koeficijenta koji iznosi 131,58, dok teorijska vrednost za nivo značajnosti od 1% iznosi 134,58. Signifikantnost ispitivanih parametara je utvrđen na osnovu *t*-testa i *p*-vrednosti (Tabela 8.6).

Tabela 8.6. ANOVA za kvadratni model uklanjanja masnoće

	Koeficijent b	t vrednost	p vrednost
Srednja vrednost	20,2521	15,5309	1,010e-05
Lutensol koncentracija X_1 (%)	2,1194	2,8453	1,801e-02
Triton koncentracija X_2 (%) ^c	0,1355	0,1819	4,314e-01
pH X_3	8,3253	11,1765	5,000e-05
Enzim X_4 (ml)	2,2053	1,618	8,329e-02
$X_1 X_2$	-7,63	7,8393	2,710e-04
$X_1 X_3$ ^c	0,38	0,3904	3,561e-01
$X_1 X_4$ ^c	-0,14	0,1438	4,456e-01
X_1^2	4,9017	6,7194	5,530e-04
X_3^2	6,8917	9,4473	1,122e-04
X_3^2	9,4367	12,936	2,460e-05
X_4^2	10,4671	14,3484	1,480e-05

^c nesignifikantan faktor

Na osnovu dobijenih rezultata dobijen je sledeći model koji opisuje efikasnost uklanjanja različitih formulacija sa enzimom (jednačina 8.1):

$$Y = 20.2521 + 2.1194 \cdot x_1 + 8.3253 \cdot x_3 + 2.2053 \cdot x_4 - 7.63 \cdot x_1 \cdot x_2 + 4.9017 \cdot x_1^2 + 6.8917 \cdot x_2^2 + 9.4367 \cdot x_3^2 + 10.4671 \cdot x_4^2 \quad (8.1)$$

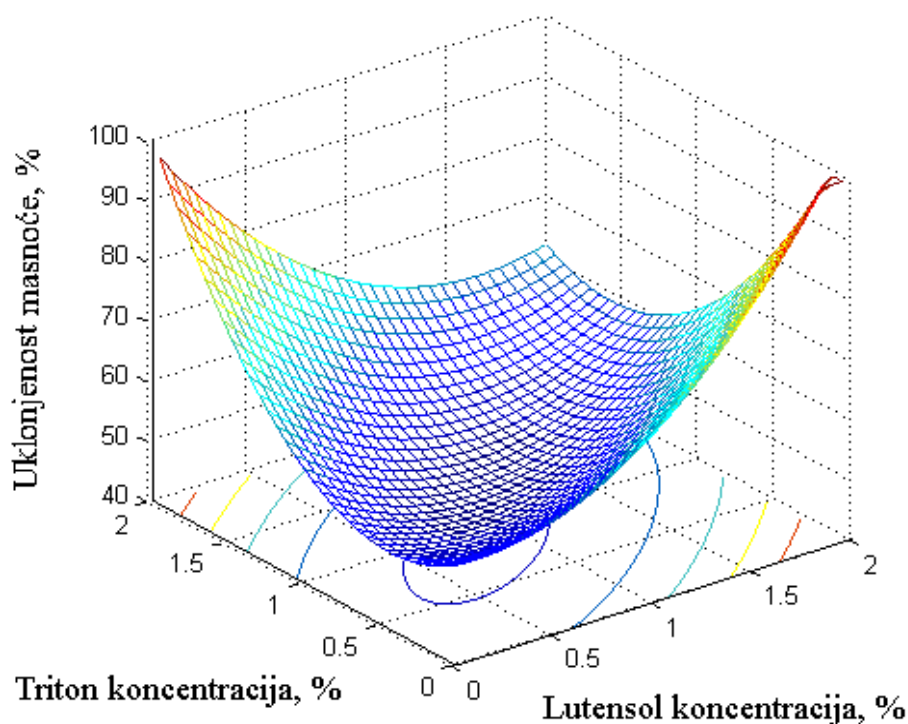
gde je *Y* očekivani procenat uklonjenosti masnoće [%], x_1 , x_2 , x_3 , x_4 kodirane vrednosti ispitivanih parametara prema tabeli 8.6.

Analizom dobijenog modela, lako se uočava da svi parametri imaju značajne koeficijente regresije drugog reda. Usled toga, uticaj sva četiri faktora opisuje kvadratna funkcija konkavnog oblika. Iz vrednosti koeficijenata možemo da zaključimo da je najveći uticaj koncentracije enzima, zatim pH i koncentracije detergenata.

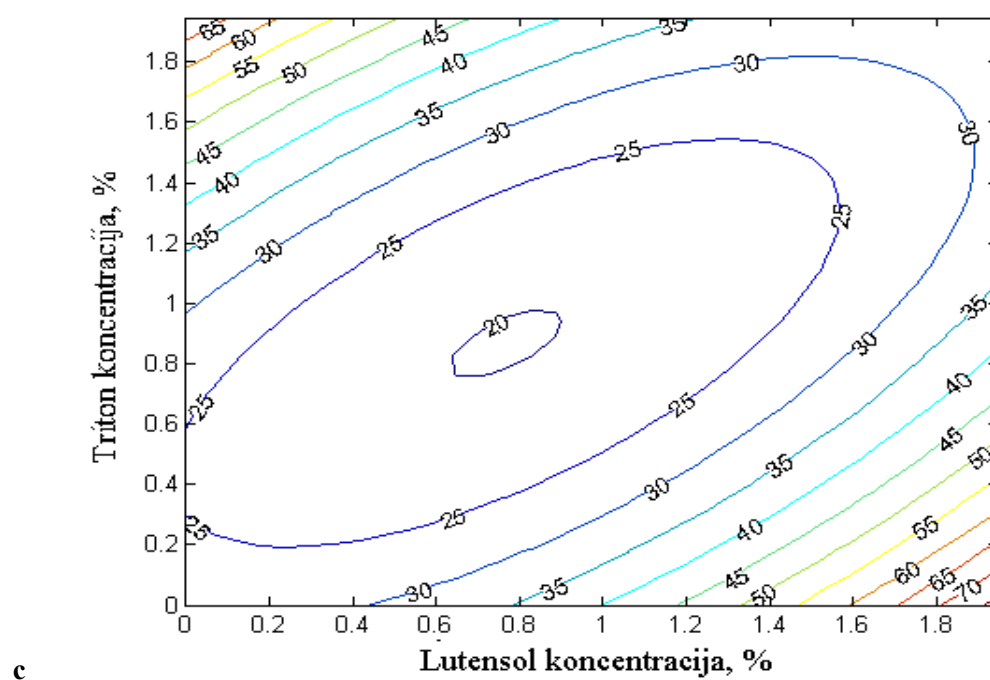
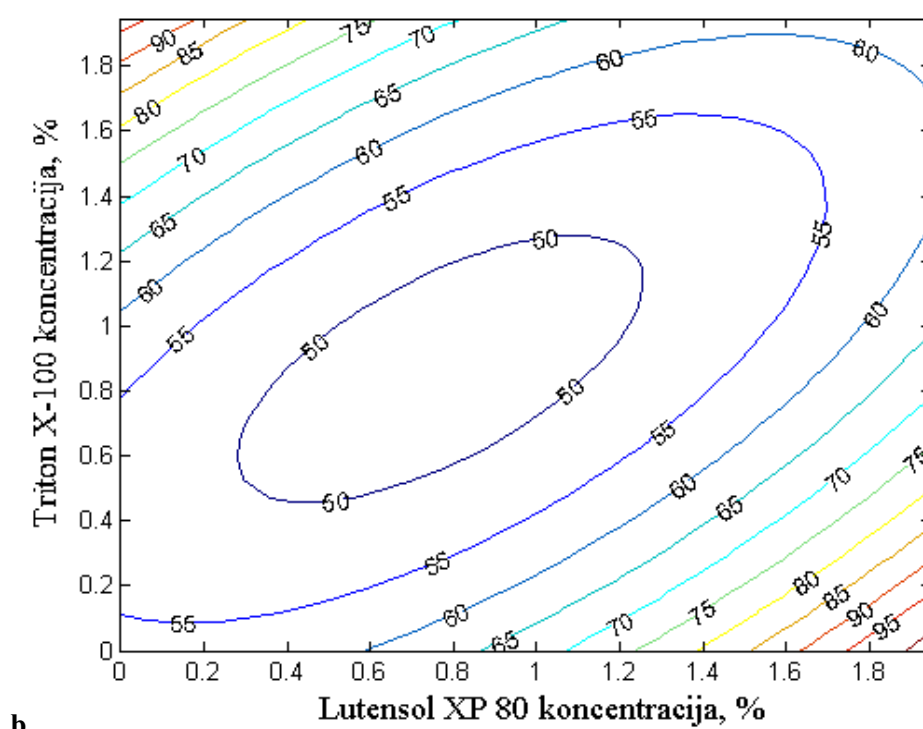
- Kompatibilnost surfaktanata i uticaj njihove koncentracije

Eksperimentalno i matematički je utvrđeno da ispitivani surfaktanti pokazuju složenu međusobnu zavisnost. Naime, dobijeni koeficijent interakcije ova dva ispitivana tenzida ima negativnu vrednost ($-7,63 X_1 \cdot X_2$), pa se visok stepen odmašćivanja može očekivati kada je koncentracija jednog surfaktanta na visokoj, a drugog na niskoj vrednosti, odnosno kombinacijom ispitivanih surfaktanata se ne ostvaruje bolja efikasnost pranja. Razlog ovog međusobnog potiranja efekata u kombinaciji ova dva surfaktanta može biti posledica njihove slične hemijske strukture, što se između ostalog može negativno odraziti na aktivnost enzima usled većih konformacionih promena.

Na slici 8.29. je prikazan uticaj različitih koncentracija površinski aktivnih materija (Triton[®] X-100 i Lutensol[®] XP 80) na efikasnost pranja



a



Slika 8.29. Uticaj različitih koncentracija Triton® -a i Lutensol® -a na efikasnost pranja

- a.) pri pH 10,1916 i količine enzima (ml)8,3832
- b.) projekcija regresione krive pod a.)
- c.) projekcija regresione krive pri pH 9 i količini enzima od 6 ml

Kao što se na slici 8.29 može videti, pri navedenim uslovima (pH 10,19) i uz dodatak enzima (~0,5 IU/ml deteredženta) moguće je skoro potpuno ukloniti nečistoću uz dodatak Lutensol®-a XP 80 ili Triton®-a X-100 (2%). Poređenjem slika 8.29b i 8.29c se takođe uočava da se efekat pranja se povećava uz povećanje pH i količine enzima.

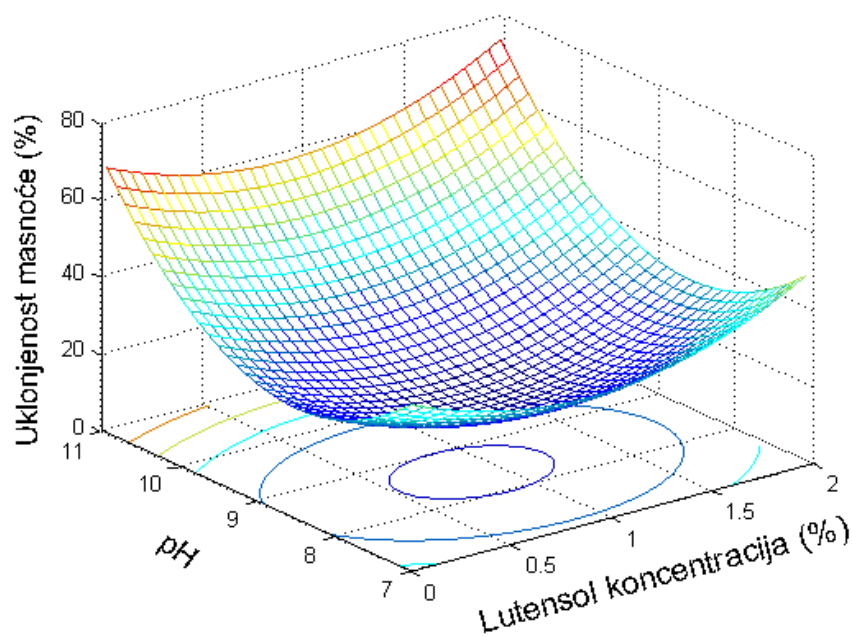
- Uticaj pH i količine enzima

Kao najuticajniji eksperimentalni parametar pokazala se pH vrednost formulacije; značajne promene efikasnosti formulacija su uočene sa variranjem pH vrednosti (slike 8.30 i 8.31). Poznato je da je efikasnost uklanjanja nečistoća u tesnoj vezi sa pH vrednosti detergenta, međutim pH formulacije zavisiće i od namene detergenta. Jako alkalni detergentsi nisu pogodni za pranje veša jer mogu da izazovu krzanje tekstilnih vlakana, a takođe nisu pogodni ni za ručno pranje različitih površina zbog mogućeg nadražujućeg i nagrizaćućeg uticaja na kožu. Jako alkalni deterženti mogu se koristiti za pranje nekorozivnih radnih ili podnih površina.

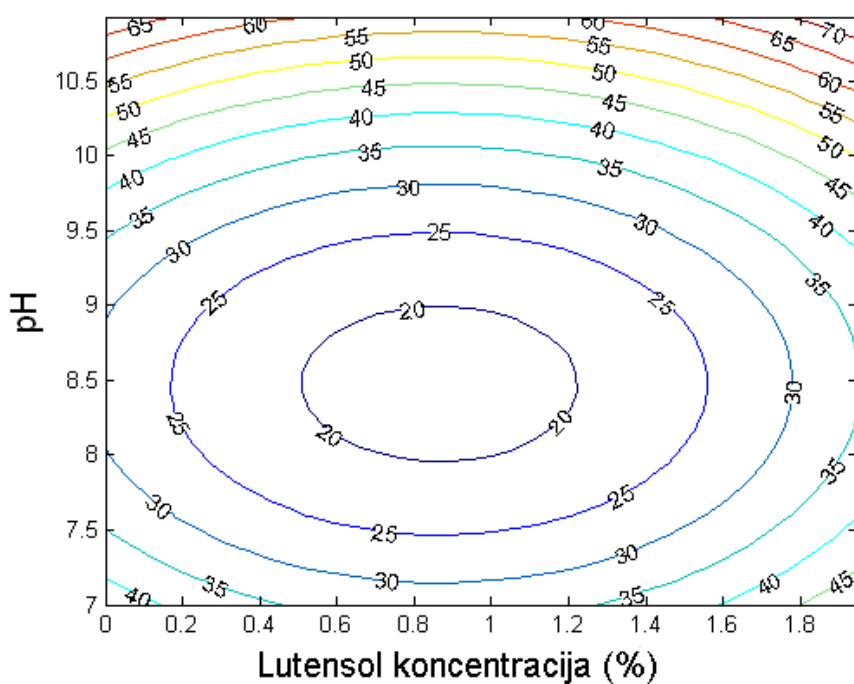
Literaturni podaci pokazuju da se uticaj pH vrednosti detergenta na njegovu efikasnost složen i mora se sagledati sa više strana, naročito u sistemu sa lipazom. Uticaj pH vrednosti se pre svega ogleda na jonizujuće stanje masnih kiselina nastalih hidrolizom masnih mrlja. Pod alkalnim uslovima kao produkti hidrolize nastaje deprotonovane masne kiseline koje će se akumulirati na granici faza. Ova novonastala polarna elektronegativna površina filma menjaće morfologiju lipidne površine i omogućiće penetriranje vode i dalje bubrenje filma. Konačno, rast površinske polarnosti i potencijala favorizovaće otpuštanje pojedinih grupisanih segmenata koji će u vidu pseodomicelarnih agregata napuštati lipidni film. Ipak, da bi došlo do ovakvog masovnog otpuštanja produkta, pored pH sistema, uticaće i drugi faktori poput prisustva Ca^{2+} jona, aktivnosti enzima, njegovog pH profila, kao i tipa tkanine i nečistoće (posebno u pogledu pKa masnih kiselina u njenom sastavu budući da je time određeno njihovo jonizujuće stanje u ispitivanom rastvoru).²⁰⁹

Pri nižim pH vrednostima, migracija produkata hidroliza ka unutrašnjosti filma dominiraće nad njegovim otpuštanjem u vodenu fazu. Izbor puferskog sistema takođe može imati ključnu ulogu u celokupnom sagledavanju uticaja pH na aktivnost enzima u

formulaciji detergenta. Pojedini puferi, poput upotrebljenog karbonatnog pufera (za $\text{pH} > 9$), mogu delovati kao omekšivači vode precipitirajući Ca^{2+} iz vode.²⁰⁰



a

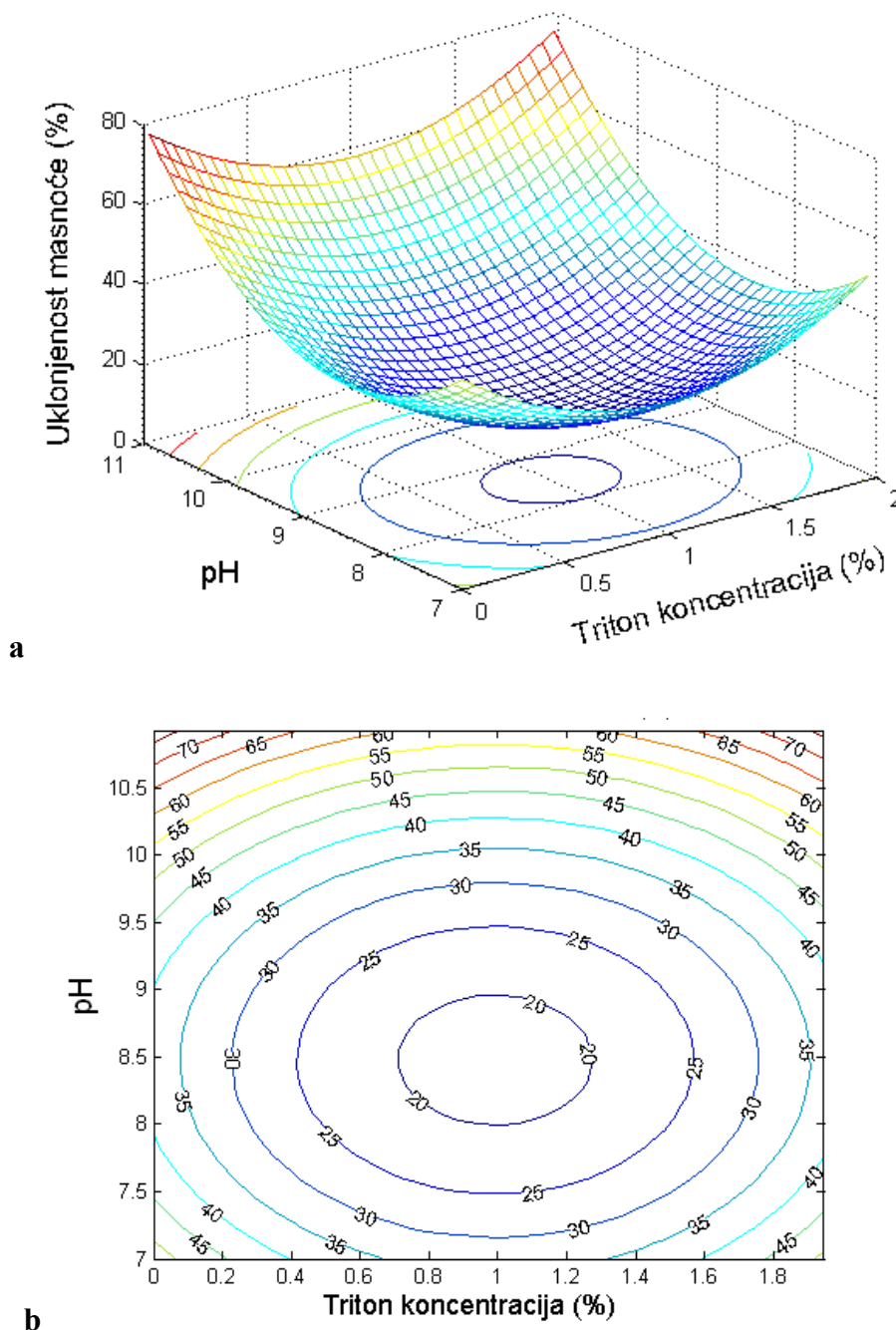


b

Slika 8.30. Uticaj različitih koncentracija Lutensol[®]-a XP80 i pH na efikasnost pranja

- a.) pri koncentraciji Triton[®]-a 0,99 % i količine enzima (ml) 6,
- b.) projekcija regresione krive pod a.)

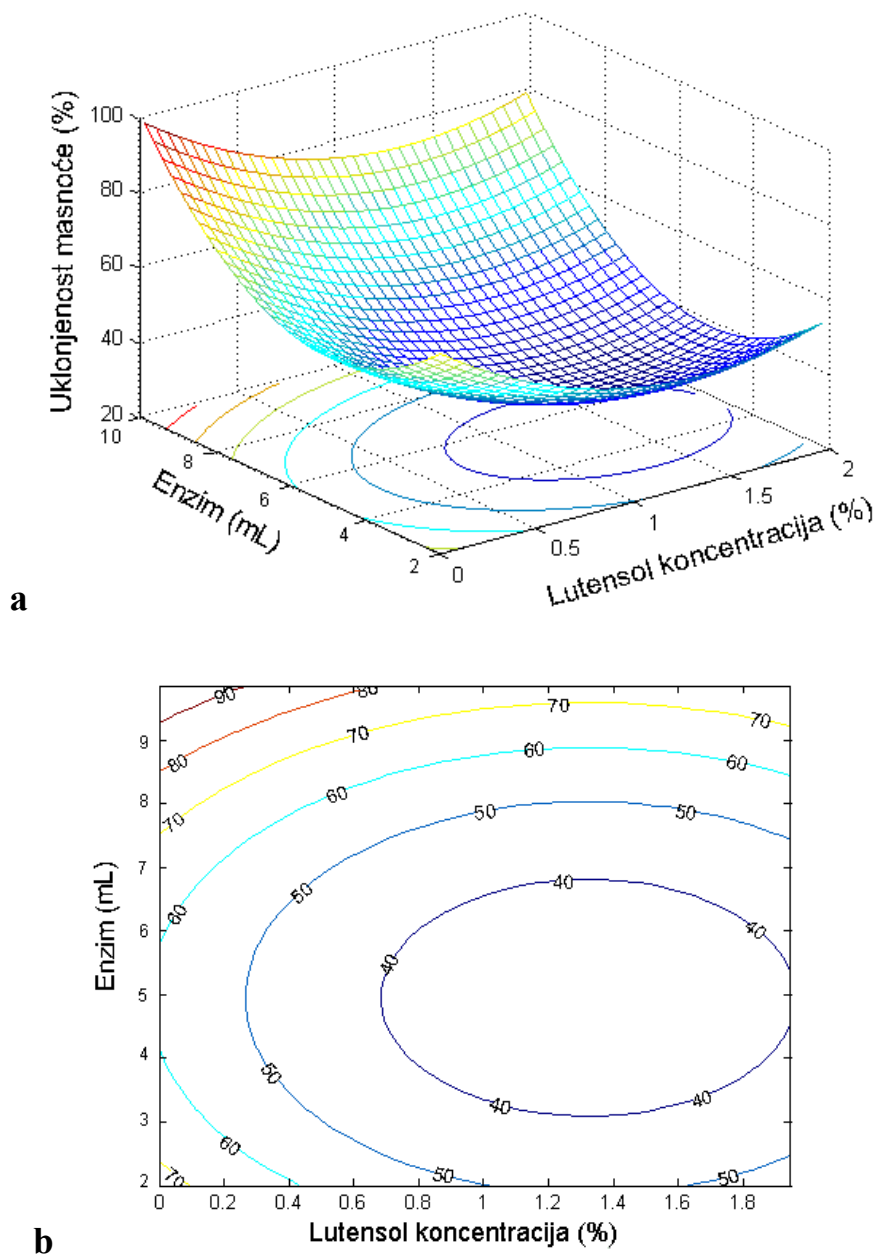
Uklanjanjem kalcijuma, onemogućeno je stvaranje kalcijumovih soli masnih kiselina-sapuna, koji se u baznim uslovima akumuliraju na granici faza otežavajući dalje uklanjanje nečistoće. Ipak, za pojedine enzime prisustvo izvesne količine Ca^{2+} jona je od presudnog značaja za očuvanje njihove strukturalne stabilnosti, a samim tim i aktivnosti enzima.



Slika 8.31. Uticaj različitih koncentracija Triton[®]-a X-100 i pH na efikasnost pranja

- a.) pri koncentraciji Lutensol[®]-a XP80 0,99 % i količine enzima (ml) 6,
 b.) projekcija regresione krive pod a.)

Drugi signifikantan parametar koji utiče na efikasnost formulacije je količina enzima. Rezultati regresione analize ukazuju na to da linearni i/ili kvadratni koeficijenti količine enzima u formulaciji mogu imati odlučujuću ulogu na efikasnost formulacije. Slika 8.32 prikazuje odzivnu površinu i konturu predviđene uklonjenosti masnoće u funkciji različitih koncentracija Lutensol[®]-a XP80 i količine enzima.



Slika 8. 32. Uticaj količine enzima i koncentracije Lutensol[®]-a XP 80 na efikasnost uklanjanja masnoće

- a.) pri pH 9 i koncentraciji Triton[®]-a X-100 1%
- b.) projekcija regresione krive pod a.)

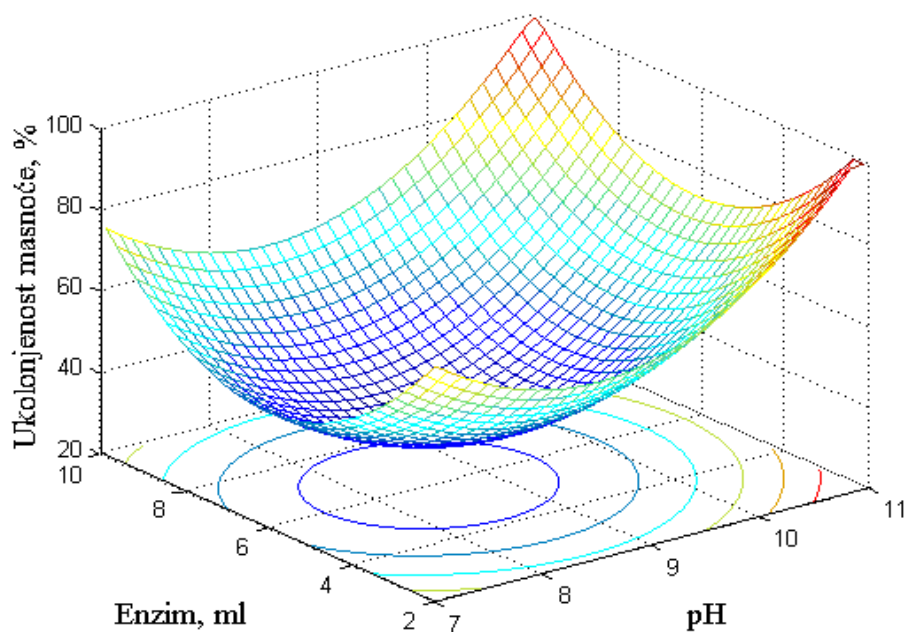
Uticaj pH i dodatka enzima prikazan je na slici 8.33. Poređenjem dobijenih odzivnih površina (slike 8.32 i 8.33) koje prikazuju uticaj količine enzima u funkciji ostalih ispitivanih faktora, uočava se da je količina enzima od presudne važnosti za ostvarenu efikasnost čišćenja kada namena detergenta diktira umereno bazne uslove (pH 9). Rezultati prikazani na slici 8.32 ukazuju na važnost korišćenja većih količina enzima u takvim formulacijama kako bi se se ostvario visok nivo efikasnosti formulacije. Koncentracija detergenta (Lutensol® XP80) se u umereno alkalnim formulacijama pokazala kao relativno nesignifikantan faktor. Prema modelu, povećanje koncentracije detergenta pri većem sadržaju enzima čak umanjuje efikasnost formulacije, otkrivajući denaturaciju enzima pri ovakvim uslovima.

Regresione krive (slike 8.32 i 8.33) otkrivaju da je dodatak enzima povoljan samo u određenim koncentracijama, odnosno dodatak enzima u koncentracijama u blizini centralne tačke nepovoljno utiču na uklanjanje masnih mrlja.

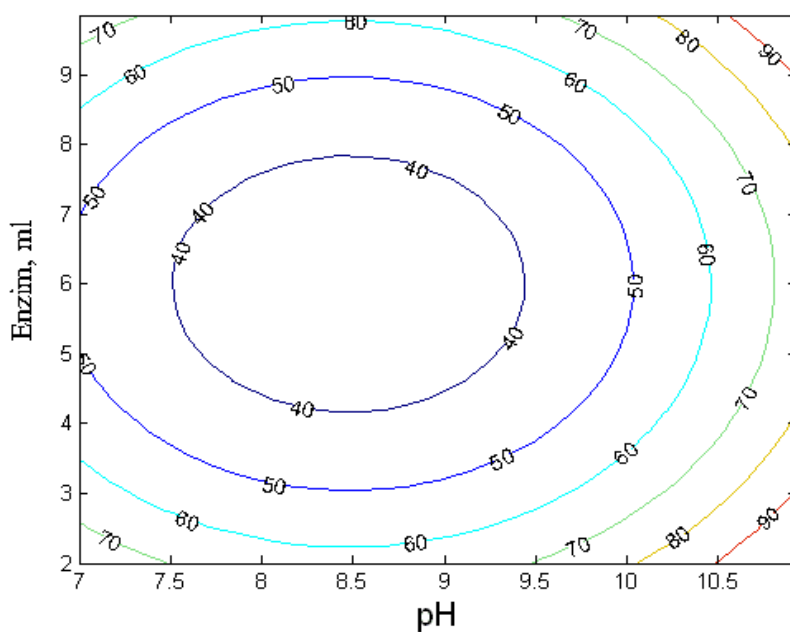
Nešto drugačije rezultate dobili su Saisubramanian i saradnici koji su optimizovali sastav detergenta na bazi cetiltrimetilamonijum-bromida koji bi sadržao lipazu iz *Aspergillus niger*. Oni su pokazali da sadržaj enzima oko centralne tačke ispitivanog opsega (100 IU) nepovoljno utiče na efikasnost čišćenja, pri čemu se uklanjanje masnih fleka značajno povećava sa smanjenjem sadržaja enzima. Sa druge strane, u njihovom slučaju je koncentracija detergenta uz dodatak enzima imala kumulativni efekat na efikasnost odmašćivanja. Takođe, uticaj pH je pokazao drugačiji trend u odnosu na našu formulaciju pa je maksimalno odmašćivanje ostvareno pri pH 9,5. Ipak, i pored optimizacije koja je povećala efikasnost odmašćivanja oko 30%, formulacija na bazi *A. niger* lipaze pokazuje lošija svojstva od naše formulacije za koju dobijeni model predviđa potpuno uklanjanje masnoća sa tkanina.⁸⁵

Thirunavukarasu i saradnici su takođe optimizovali sastav detergenta na bazi komercijalnog Rin Advanced uz dodatak lipaze iz *Cryptococcus* sp. S-2 metodom odzivnih površina. Pod optimalnim uslovima (0,5% deterženta, 1000 IU lipaze, pH 8, 37 °C) moguće je dostići skoro 90 % uklanjanja masnoće sa tkanine. Isti autori su prikazali međusobni uticaj temperature i koncentracije enzima na uklanjanje masnoća sa tkanina pri pH 8 i 0,5% detergenta i ustanovili da je efikasnost lipaze iz *Cryptococcus* sp. S-2 za uklanjanje masnoća sa tkanina pri niskim temperaturama jedna od najpoželjnijih osobina za njenu upotrebu u formulacijama detergenata zbog povećanja

sintetičkih tkanina koje ne tolerišu temperature iznad 50-60°C. Saglasno sa našim rezultatima, smanjenje pH vrednosti dovodi do smanjenja procenta uklonjenosti masnoća sa tkanina.²¹⁰



a



b

Slika 8.33. Uticaj različitih količina enzima (ml) i pH vrednosti na efikasnost pranja
 a.) pri koncentraciji Lutensol-a od (%)1.9848 i Triton®-a od (%)1.9848
 b.) Projekcija regresione krive

Može se pretpostaviti da je u formulacijama sa ovim sadržajem enzima sastav smeše za pranje koja sadrži sve komponente detergenata, kao i emulgovane masnoće i masne kiseline nastale njihovom enzimskom hidrolizom takva da je enzimska aktivnost takvom raspodela enzima i supstrata u svim nastalim pseudo-fazama preusmerena na način koji ne rezultuje u uočenoj efikasnosti pranja.

Kako je uticaj svakog ispitivanog faktora važan, tačan sastav treba odrediti prema nameni detergenta. Obzirom na to da je analizom regresionog modela uočen negativni koeficijent međusobnog dejstva surfaktanata, buduće formulacije bi trebale da sadrže samo jedan tip površinski aktivne materije. Ispitujući značaj svakog pojedinačnog parametra dobijene jednačine kojom je opisana zavisnost signifikantnih parametara, potvrđeni su prethodni rezultati koji ukazuju na to da se najbolji efekti odmašćivanja postižu u formulaciji pored enzima sadrži nisku dozu Lutensol® -a XP 80 pri svim pH vrednostima. Imajući u vidu i ekološke aspekte, buduće formulacije bi trebalo zasnivati na ovom surfaktantu. Količina enzima i pH u najvećoj meri određuju efikasnost formulacije. Ukoliko je cilj potpuno uklanjanje masnoća sa nekorozivnih površina pH bi trebalo držati u visoko alkalnoj oblasti, gde je najizraženiji kumulativni efekat dodatka malih koncentracija Lutensol®-a i enzima. Ipak, ukoliko namena formulacije diktira neutralan pH, efekat odmašćivanja će gotovo linearno pratiti povećanje koncentracije surfaktanata u formulaciji.

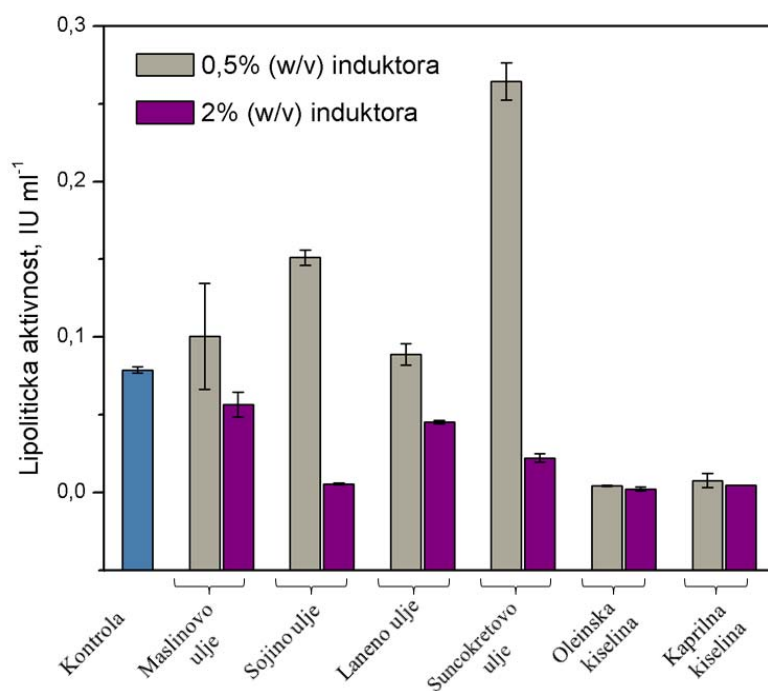
Moguće je gotovo potpuno ukloniti masno onečišćenje (blizu 100%) korišćenjem visokog sadržaja enzima (lipolitička aktivnost od $0,5 \text{ IU mL}^{-1}$) i u relativno blago alkalnoj sredini (pH 9) nakon polučasovnog pranja na 30°C u formulaciji sa relativno niskim sadržajem surfaktanta ($< 0,4 \text{ \% w/v}$ Lutensol® XP 80). Ovakva formulacija i način pranja odgovaraju primeni kao detergentsi za već dizajnirani i namenjeni uklanjanju masnih mrlja.

8.9. Optimizacija proizvodnje enzima

Kako je primećena izuzetna stabilnost lipaze i proteaze poreklom iz *P. aeruginosa* san-ai u uslovima relevantnim za industriju detergenata, dalji eksperimenti su izvršeni sa ciljem da se optimizuje postupak proizvodnje ovih enzima variranjem sastava fermentacione podloge i parametara produkcije enzima koji pozitivno utiču na genetsku regulaciju biosinteze enzima. Postoje dva osnovna regulacijska mehanizma kojima je određen nivo produkcije enzima: represija lako iskoristivim izvorima ugljenika/azota i indukcija susupstratima/analogama supstrata. Shodno tome, pažljivim izborom sastava hranljive podloge i uslova kultivacije može se uticati na regulacijske mehanizme i povećati prinos enzima. Optimizacija postupka proizvodnje lipaza u tečnim podlogama je pre svega zasnovan na inducibilnoj prirodi ovih enzima. Iz tog razloga, prvi korak ka utvrđivanju faktora koji imaju najveći uticaj na nivo sintetisanih lipaza je određivanje uticaja različitih induktora kao što su različita ulja i masne kiseline pri koncentracijama od 0,5 % i 2 % (w/v). Brojne studije o uticaju sastava fermentacione podloge na prinos proizvedenih lipaza potvrđuju da dodatak masnih supstanci pospešuje biosintezu ovog enzima.^{86,159,161}

Početni eksperimenti su pokazali da dodatak masnih kiselina (kaprilna i oleinska), kao i većih količina ulja (2%) inhibira produkciju lipaza, dok u manjim količinama (0.5%) suncokretovo i sojino ulje stimulišuće deluju na prinos enzima. Analizom literaturnih podataka o sastavu ovih ulja može se uvideti da sojino i suncokretovo ulje sadrže nešto veću količinu linolne kiseline ($\geq 50\%$ w/v) u odnosu na druga ispitivana ulja što je mogući razlog različitog uticaja ovih ulja.

Iako je dodatak sojinog i suncokretovog ulja u koncentraciji od 0,5% w/v povećao proizvodnju lipaze 1,9, odnosno 3,35 puta u odnosu na kontrolu, *Pseudomonas* spp. vrste pokazuju značajne varijacije u pogledu uticaja induktora na prinos ovog enzima (slika 8.34).



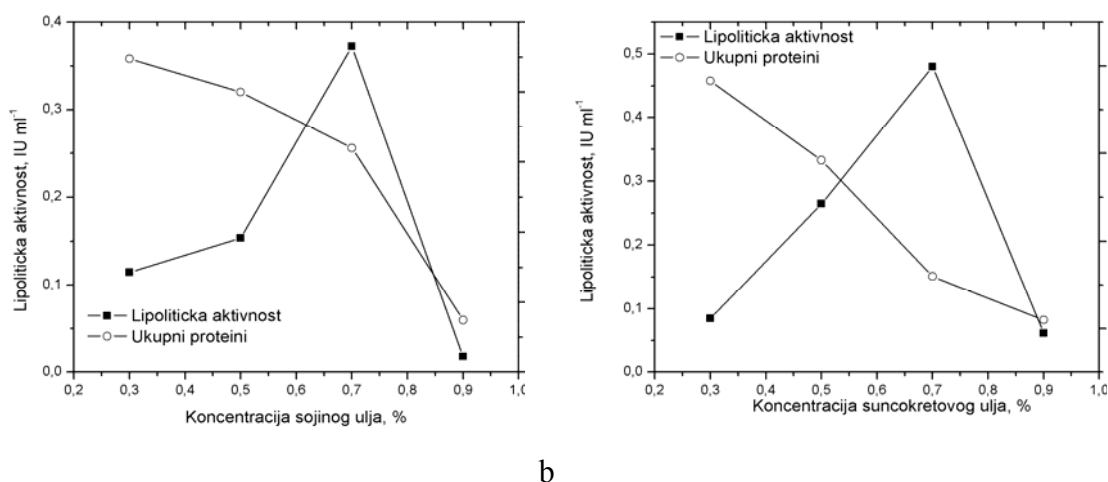
Slika 8.34. Uticaj različitih induktora (0,5 i 2% (w/v)) na prinos lipaza. Osnovna podloga: pepton I (10 g/L), ekstrakt kvasca (5 g/L), NaCl (5 g/L). Uslovi fermentacije: 250 rpm, 30 °C, 72 h, 1% inokuluma.

Gaur i saradnici u studiji proizvodnje lipaze iz *P. aeruginosa* PseA nisu primetili pozitivni uticaj dodatka induktora zaključujući da proizvodnja lipaze iz ovog mikroorganizma konstitutivna.¹⁸⁸ Gaoa i saradnici su ispitivanjem uticaja različitih tipova induktora na biosintezu lipaze iz *Pseudomonas* sp. 2106, počev od prirodnih ulja preko hemijski čistih triglicerida i masnih kiselina, došli do istog zaključka da je produkcija enzima iz ovog mikroorganizma njegovo konstitutivno svojstvo.²¹¹

Sa druge strane, Cadirci i Yasa su optimizujući sastav podloge za produkciju lipaze iz *P. fluorescens* P21 primetili da je sinteza ovog enzima stimulisana dodatkom maslinovog ulja i ulja iz lešnika i dodatkom ovih ulja u podlogu prinos enzima uvećan je 40, odnosno 20%.¹⁶¹ *Pseudomonas aeruginosa* LST-03 vrsta pokazuje interesantan uticaj induktora na sintezu lipaze. Dok su sintezu enzima stimulisale zasićene masne kiseline, kao i njihovi trigliceridi i metilestri, pri čemu se pozitivni uticaj ovih supstanci povećavao sa dužinom lanca masne kiseline, nezasićene masne kiseline iste dužine lanca nisu pokazivale ovaj efekat.¹⁵⁹

Sa druge strane, napravljen je i pokušaj da se optimizuje proizvodnja lipaze iz *P.putida* B-21, uzgajanjem u medijumima obogaćenim istim vrstama induktora. Ipak, nivo produkcije ovog enzima nije bitno odstupao od ostvarene aktivnosti u osnovnom medijumu (rezultati nisu prikazani grafički).

Kako su se suncokretovo i sojino ulje pri koncentracijama 0.5% pokazali kao najbolji induktori za proizvodnju lipaze iz *P. aeruginosa* san-ai, ispitan je i uticaj njihove koncentracije na produkciju lipaza i ukupne proteine (slika 8.35).

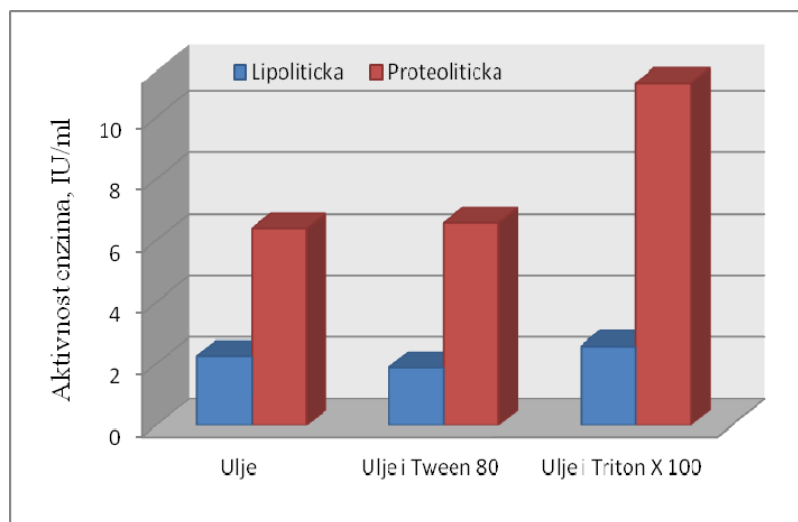


Slika 8.35. Uticaj koncentracije induktora na prinos lipaze i ukupne proteine. a) sojino ulje b) suncokretovo ulje. Osnovna podloga: pepton I (10 g/L), ekstrakt kvasca (5 g/L), NaCl (5 g/L). Uslovi fermentacije: 250 rpm, 30 °C, 72 h, 1% inokuluma.

Zaključeno je da je suncokretovo ulje bolji induktor lipaze što je u skladu sa prethodno dobijenim rezultatima. Takođe, na slikama 8.35a i 8.35b se lako uočava da pri povećanju koncentracije obe vrste ulja u intervalu od 0.1 do 0.7% dolazi do porasta produkcije lipaze dok dalje povećanje koncentracije ulja inhibira biosintezu enzima. Kako se ukupna količina produkovanih proteina u profermentisanom medijumu smanjuje, zaključeno je da je u oba slučaja došlo povećanja udela lipaza među produkovanim proteinima što je posebno značajno sa aspekta prečišćavanja prilikom eventualne industrijske proizvodnje ove lipaze.

Literaturni podaci takođe pokazuju i da je jedan od krucijalnih faktora u pogledu nivoa sintetisanog enzima u podlogama sa dodatkom lipida njegov stepen disperzije u bujonu. Tako dodatak emulgjućih supstanci bitno menja reološka svojstva

fermentacionih medijuma koja sadrže lipidne komponente, a samim tim se menja dinamika prenosa hranljivih materija i kiseonika tokom fermentacije. Dalje, zaključak brojnih literaturnih studija je da nejonski surfaktanti koji se najčešće dodaju u ove svrhe, povećavaju permeabilnost ćelijskih membrana što olakšava transfer supstanci, uključujući i enzime, u i iz ćelije, čime se ispoljava sinergijski efekat ovih supstanci u povećanju produkcije lipaza.²¹² Disperzanti koji se dodaju fermentacionim medijumima u ove svrhe ne smeju biti toksični za sam mikroorganizam producent, a ni delovati inhibitorno na enzim. U literaturi su poznati primeri stimulacije sekrecije lipaza iz *Burkholderia*, *Pseudomonas* i *Candida* spp. dodatkom surfaktanata tipa Triton[®] X-100 i Tween[®] 80.²¹³⁻²¹⁵ Kao i drugi procesni parametri, izbor površinski aktivne materije mora se pojedinačno odrediti u zavisnosti od proizvodnog mikroorganizma i željenog enzima. Primera radi, dodatak Tween-a 80 je stimulisao produkciju lipaze iz *P. aeruginosa* AAU2, dok dodatak Triton[®] X-100 u hranljivu podlogu prouzrokuje smanjeni nivo aktivnosti i do 40%.¹⁷¹ Dodatno, pojedina istraživanja su pokazala da suplementacija gore navedenim površinski aktivnim materijama poboljšava produkciju proteaza iz nekoliko *Aspergillus* sp.^{216,217} U cilju ostvarivanja bolje disperzije ulja u podlozi i olakšanog izlučivanja enzima u medijum, ispitan je uticaj obogaćivanja hranljive podloge koja sadrži 0,7% (w/v) suncokretovog ulja surfaktantima tipa Triton[®] X-100 i Tween 80 (0.1 % w/v) (slika 8.36).



Slika 8.36. Uticaj dodatka tenzida u podlogu sa suncokretovim uljem na ostvarenu enzimsku aktivnost

Budući da je u prethodnim istraživanjima Tween® 80 pokazao inhibitorno dejstvo na oba enzima, ne čudi činjenica da se dodatak ovog tenzida u hranljivu podlogu ne ostvaruje ni značajno poboljšanje u stepenu aktivnosti proizvedenih lipaza i proteaza. Sa druge strane, utvrđeno je da suplementacija Triton®-om X-100 poboljšava sekreciju lipaze i do 20%. Dalje, dodatak ove površinski aktivne materije je u velikoj meri stimulisao produkciju proteaza, pa je dostignuti nivo sekrecije ovog proteina u medijumu obogaćenim Triton®-om X-100 i do 75% veći u odnosu na kontrolu. Pozitivan uticaj suplementacije ovim surfaktantom na biosintezu oba ispitivana enzima predstavlja zbirni uticaj različitih efekata koji su posledica poboljšane disperzije ulja u hranljivoj podlozi, efikasnijeg prenosa kiseonika, povećane koncentracije ugljenika u podlozi, promena u permeabilnosti ćelijskih membrana, kao i uticaja na stabilnost produkovanih enzima.

8.9.1. Optimizacija produkcije lipaza i proteaza iz *P. aeruginosa* san-ai metodom statistički planiranog eksperimenta

Dalji pokušaji su načinjeni sa ciljem da se optimizuje proizvodnja lipaza i proteaza iz *P. aeruginosa* san-ai i utvrdili odnosi između komponenata hranljive podloge, parametara produkcije enzima i prinosa aktivnosti. Statistička obrada i analiza dobijenih podataka gde figuriše veliki broj parametara omogućila je da se utvrde empirijski modeli kojima su razjašnjeni osnovni mehanizmi u ovako složenim situacijama, konsekvntno obezbeđujući bolje razumevanje i kontrolu procesa.^{215,218-220} Na osnovu prethodnih rezultata i uvida u literaturu, izabrana su četiri eksperimentalna faktora koja su varirana u sledećim opsezima: suncokretovo ulje [0.2-1% (w/v)]; Triton® X-100 [0-0.2% (w/v)]; temperatura [15-35 °C], i inkubaciono vreme [48-144 h].

Eksperimentalni plan i ostvareni prinosi enzima dati su u sledećoj tabeli:

Tabela 8.7. Eksperimentalni plan-kodirane i stvarne vrednosti ispitivanih faktora i ostvareni prinosi enzima

run no.	Suncokretovo ulje	Triton® X-100	Temperatura, °C	vreme	Lipaza, IU ml ⁻¹	Proteaza, IU ml ⁻¹
1	(0.4) -1	(25ml) -1	(20°) -1	(72h) -1	0,930	0,000
2	(0.8) 1	(25ml) -1	(20°) -1	(72h) -1	2,420	2,533
3	(0.4) -1	(75ml) 1	(20°) -1	(72h) -1	0,024	0,000
4	(0.8) 1	(75ml) 1	(20°) -1	(72h) -1	0,036	0,000
5	(0.4) -1	(25ml) -1	(30°) 1	(72h) -1	1,099	12,613
6	(0.8) 1	(25ml) -1	(30°) 1	(72h) -1	0,710	2,320
7	(0.4) -1	(75ml) 1	(30°) 1	(72h) -1	0,395	13,106
8	(0.8) 1	(75ml) 1	(30°) 1	(72h) -1	2,748	14,133
9	(0.4) -1	(25ml) -1	(20°) -1	(120h) 1	0,053	0,000
10	(0.8) 1	(25ml) -1	(20°) -1	(120h) 1	1,397	6,107
11	(0.4) -1	(75ml) 1	(20°) -1	(120h) 1	0,053	0,320
12	(0.8) 1	(75ml) 1	(20°) -1	(120h) 1	0,027	0,000
13	(0.4) -1	(25ml) -1	(30°) 1	(120h) 1	0,112	12,426
14	(0.8) 1	(25ml) -1	(30°) 1	(120h) 1	2,099	14,266
15	(0.4) -1	(75ml) 1	(30°) 1	(120h) 1	0,097	8,826
16	(0.8) 1	(75ml) 1	(30°) 1	(120h) 1	0,426	10,533
17	(0.2) -2	(50ml) 0	(25°) 0	(96h) 0	1,433	7,800
18	(1.0) 2	(50ml) 0	(25°) 0	(96h) 0	1,805	6,378
19	(0.6) 0	(0ml) -2	(25°) 0	(96h) 0	1,293	6,733
20	(0.6) 0	(100ml) 2	(25°) 0	(96h) 0	0,894	1,567
21	(0.6) 0	(50ml) 0	(15°) -2	(96h) 0	0,617	0,587
22	(0.6) 0	(50ml) 0	(35°) 2	(96h) 0	0,120	3,307
23	(0.6) 0	(50ml) 0	(25°) 0	(48h) -2	1,400	6,733
24	(0.6) 0	(50ml) 0	(25°) 0	(144h) 2	0,500	10,253
25	(0.6) 0	(50ml) 0	(25°) 0	(96h) 0	1,035	8,388
26	(0.6) 0	(50ml) 0	(25°) 0	(96h) 0	0,850	8,788
27	(0.6) 0	(50ml) 0	(25°) 0	(96h) 0	1,082	8,288
28	(0.6) 0	(50ml) 0	(25°) 0	(96h) 0	0,916	7,877
29	(0.6) 0	(50ml) 0	(25°) 0	(96h) 0	0,940	8,266
30	(0.6) 0	(50ml) 0	(25°) 0	(96h) 0	1,014	8,546

Statističkom obradom dobijenih eksperimentalnih podataka procenjeni su uticaji pojedinačnih faktora, kao i njihovi međusobni efekti na biosintezu lipaza i proteaza. Signifikantnost parametara je potvrđena je na osnovu t-testa i p-vrednosti, dok je adekvatnost dobijenih modela potvrđena na osnovu Fišerovih koeficijenata.

Regresionom i disperzionom analizom utvrđeno je da su relevantne promenljive za proizvodnju lipaza temperatura i koncentracija ulja i surfaktanta u podlozi. Dok je koncentracija ulja u ispitivanom opsegu imala pozitivan efekat na sintezu enzima (+0.327), temperatura i koncentracija Triton[®] X-100 su pokazale veoma složenu međusobnu zavisnost. Nakon odbacivanja nedovoljno značajnih parametara, dobijena je sledeća jednačina koja predviđa prinos lipolitičke aktivnosti:

$$Y=1.09+0.327*x_1-0.24*x_2+0.27*x_2*x_3+0.073*x_3-0.20*x_3^2 \quad (8.2)$$

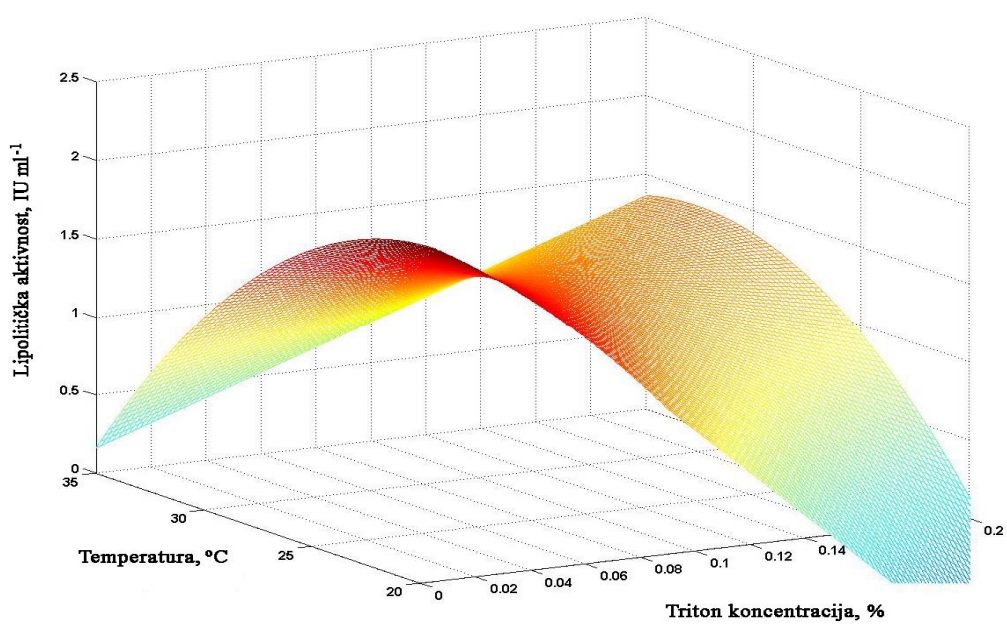
gde je Y očekivana lipolitička aktivnost [IU mL⁻¹], x_1 kodirana vrednost koncentracije suncokretovog ulja, x_2 kodirana vrednost koncentracije Triton[®] X-100, i x_3 kodirana vrednost temperature.

Analizom ostvarenih prinosa proteolitičke aktivnosti, utvrđeno je da na nivo produkcije ovog enzima najviše utiču temperatura i koncentracija Triton[®] X-100:

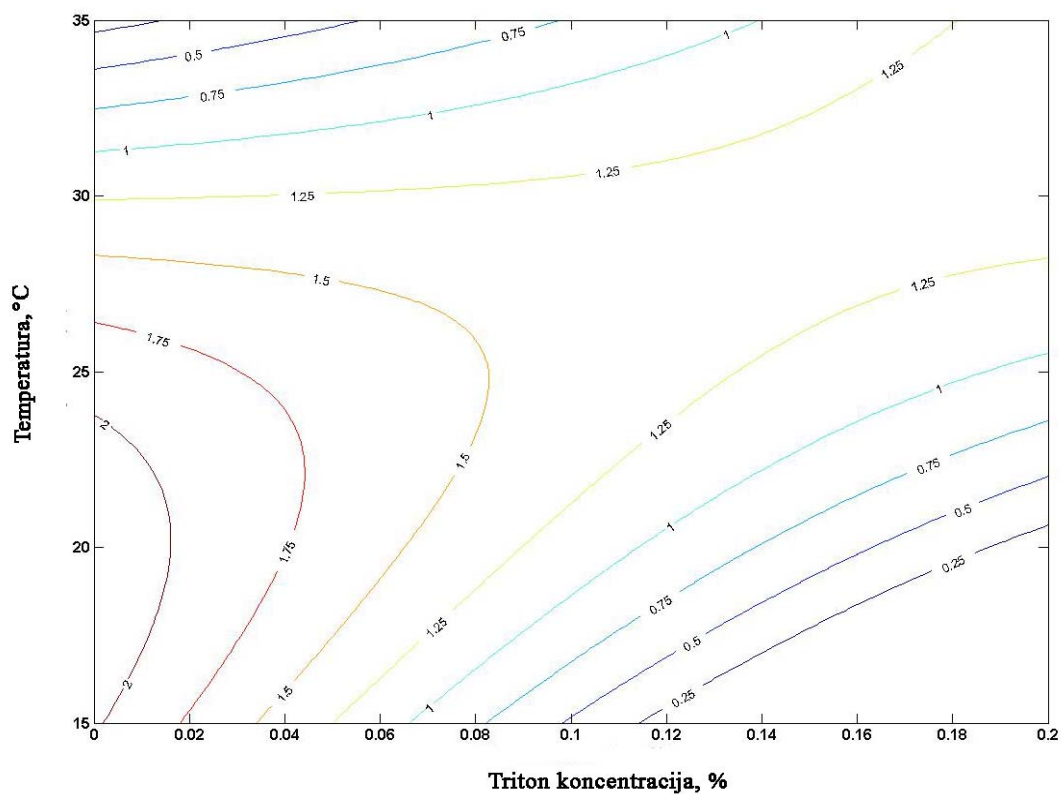
$$Y=8.28-0.570*x_2-0.830*x_2^2+0.835*x_2*x_3+3.53*x_3-1.38*x_3^2 \quad (8.3)$$

Oba modela su ocenjena kao adekvatna na osnovu izračunatih vrednosti Fišerovih koeficijenata koji su nekoliko puta manji od teorijskih vrednosti za nivo značajnosti od 5 % (F=4.38 model za lipazu; F=4.13 model za proteazu).

Poređenjem rezultata dobijenih eksperimentalno i matematički, primećena je interesantna zavisnost između uticaja temperature i koncentracije Triton[®] X-100 na lipolitičku aktivnost. Sagledavanjem dejstva ispitivanih faktora na prinose proizvedenih lipaza i proteaza, uočava se inverzan uticaj ovih parametara na biosintezu proučavanih enzima što potvrđuju i izgledi odzivnih površina koji oslikavaju njihove očekivane prinose. Projekcije regresionih krivih modela koji predstavljaju predviđenu lipolitičku aktivnost u zavisnosti od temperature i koncentracije Triton[®] X-100 su date na slici 8.37. Dalje, uticaj istih parametara na nivo produkovanih proteaza je dat na slici 8.38.



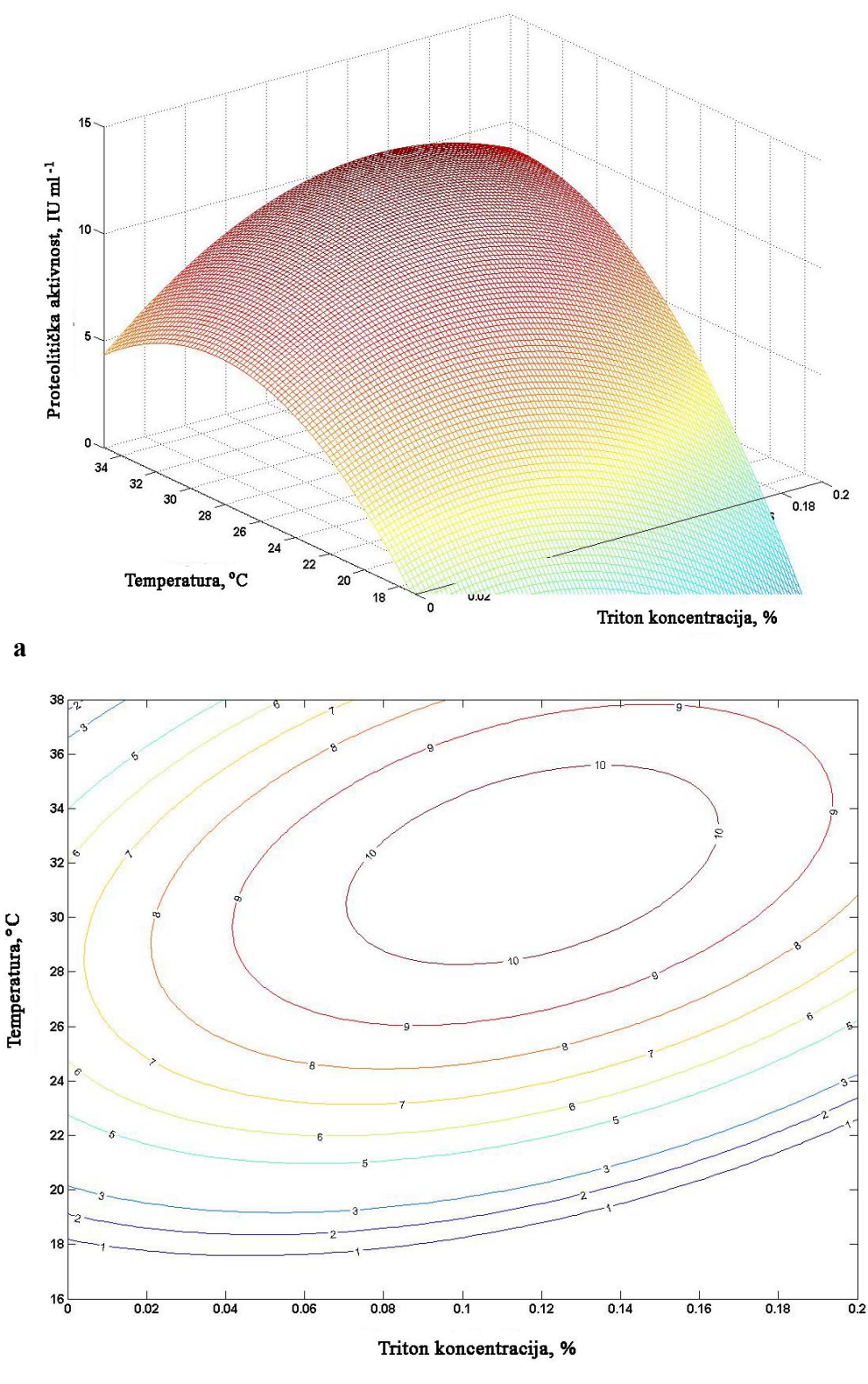
a



b

Slika 8.37. a.) Uticaj Temperature i koncentracije Triton[®]-a X-100 na lipolitičku aktivnost

b.) Projekcija regresione površine

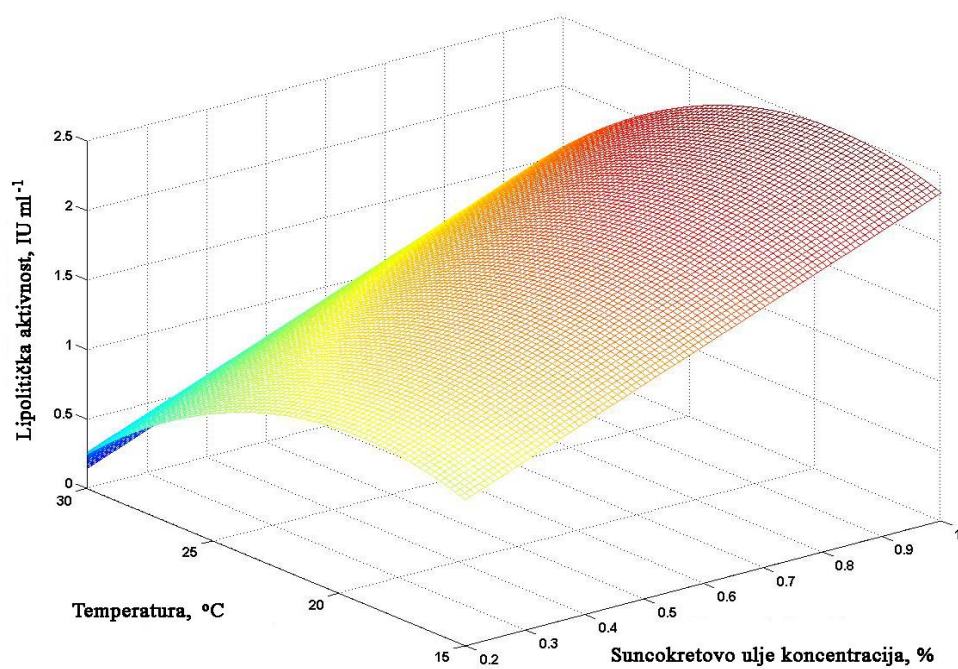


Slika 8.38. a.) Uticaj Temperature i koncentracije Triton[®]-a X-100 na proteolitičku aktivnost

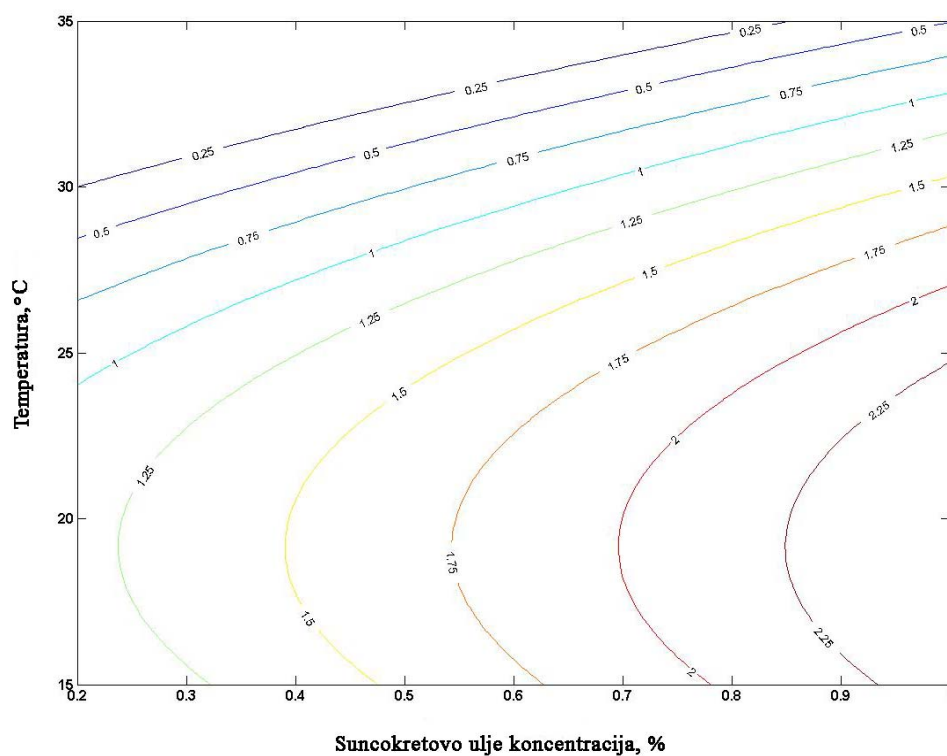
b.) Projekcija regresione površine

Izgled regresionih površina i kontura projekcija regresionih krivih otkriva različit uticaj temperature u medijumima drugačijeg sastava. Konkretno, najveći ostvareni prinos lipaze se opaža na nižim temperaturama u medijumu bez suplementacije surfaktantom. Ipak, sa porastom temperature beleži se uporedni rast prinosa enzima sa povećanjem koncentracije Triton[®]-a X-100 u fermentacionom medijumu. Ovi rezultati su naizgled usklađeni sa ostvarenim prinosima produkovanih proteaza budući da je primetno da temperatura i koncentracija surfaktanta u okolini centralne tačke, odnosno njihove vrednosti na sredinama ispitivanih opsega, pogoduju pretežno sekreciji proteaza. Tako, pad produkcije lipaze na temperaturama iznad 25 °C delom može biti posledica inaktivacije ovih enzima nativnim simultano proizvedenim proteazama. Iako je studija koja je imala za cilj da se potvrdi stepen podložnosti proteolitičkoj degradaciji lipaze nativno koegzistirajućim proteazama potvrdila da je ispitivani enzim izuzetno stabilan u toku više dana (poglavlje 8.6.1), ova ispitivanja su vršena na temperaturama na kojim proizvedena proteaza ispoljava 10-50% aktivnosti u odnosu na aktivnost enzima na 30 °C. Shodno tome, ovakav profil produkcije enzima je u izvesnoj meri posledica pojačane proteolize lipaza, dok temperatura zasigurno utiče različito na mehanizme sinteze i sekrecije lipaza i proteaza.

Uvidom u literaturu, može se primetiti da je proizvodnja lipaza pomoću psihotrofnih mikroorganizama najčešće najveća na temperaturama ispod optimuma mikrobnog rasta, pri čemu *Pseudomonas* spp. pokazuju prilične varijacije u produktivnosti ekstracelularnih enzima na temperaturama nižim od optimalnih za rast. Tako je produkcija lipaza iz *Pseudomonas fluorescens* 2D redukovana za 95% sa povećanjem temperature sa 25 na 30 °C.²²¹ Sam mehanizam temperaturne regulacije sinteze različitih enzima je još uvek predmet opsežnih ispitivanja. Dok se većina autora slaže da je sinteza različitih enzima na temperaturama različitim od optimalnih za rast bakterija adaptivni odgovor na promenu životne okoline, nije poznat način ove složene regulacije koji uključuje posebne senzore, signalno-transdukcione mehanizme, regulatore i novo sintetisane ili aktivirane proteine koji pokreću takav ćelijski odgovor.²²² Različiti nivo enzima tako može biti posledica različitih temperaturnih optimuma aktivnosti, kao i različitih konformacija periplazmatičnih enzima neophodnih za post-translacione modifikacije i transfer enzima u spoljnu sredinu.²²³⁻²²⁵



a



b

Slika 8.39. a.) Uticaj koncentracije suncokretovog ulja i Triton[®]-a X-100 na lipolitičku aktivnost

b.) Projekcija regresione površine

Analizom dobijenog modela koji predviđa ostvarenu nivo produkcije lipaza, nedvosmisleno se uočava da dodatak suncokretovog ulja linearno prati ostvarenu aktivnost u ispitivanom opsegu (slika 8.39). Tako je sa stanovišta maksimalne produkcije enzima, fermentaciju potrebno vršiti u medijumu koji sadrži i do 1% (% w/v) ovog ulja.

Literaturni podaci koji opisuju fermentacione procese za dobijanje različitih mikrobnih enzima, pokazuju da dodatak induktora, posebno uz dodatak disperzanata, ne mora biti tako jednoznačan. Tako je optimizacija produkcije lipaze iz *Rhizopus delemar* pokazala da je efikasan induktor kojim je stimulirana proizvodnja enzima takođe suncokretovo ulje. Međutim, ovaj parametar je pokazao i složenu međuzavisnost sa ostalim ispitivanim faktorima, posebno sa koncentracijom surfaktanta (u ovom slučaju Tween[®] 80). Naime, negativan koeficijent korelacije između ovih faktora, sugerisao je različit uticaj koji koncentracija surfaktanta ima na proizvodnju lipaze pri nižim i višim koncentracijama ulja.²²⁶ Tako, pri nižim koncentracijama ulja, suplementacija Tween[®]-om 80 je srazmerno njegovoj koncentraciji stimulirala produkciju lipaze, dok je taj efekat izostao u medijumu koji sadrži veće doze ulja. Sličnu složenu zavisnost koncentracije ulja (maslinovog) i Tween[®]-a 80 pokazala je i studija u kojoj je optimizovana proizvodnja lipaze iz *Bacillus pumilus* RK31.²²⁷

Sa druge strane, model kojim je optimizovana proizvodnja lipaze iz *Geotrichum* sp. potpuno je isključio suplementaciju maslinovim/sojinim uljem kao značajnim parametrom za biosintezu enzima, iako autori napominju da je izvesna količina ulja kao induktora neophodna u cilju stimulacije produkcije lipaze.²²⁸

Na osnovu pokazanog, zaključuje se da prilagođavanjem sastava fermentacionog medijuma kao i promenom postavke eksperimenata može odgovoriti različitim zahtevima za proizvodnju enzima. Visoka proteolitička aktivnost se tako može ostvariti fermentacijom u medijumu koji je obogaćen Triton[®] X-100 (0.12% w/v) pri čemu se proces proizvodnje treba voditi na 32 °C. Niže temperature (20 °C) i suplementacija suncokretovim uljem pogoduju biosintezi lipaze.

9. Zaključak

Na osnovu prikazanih rezultata eksperimentalnog rada mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Ispitivanje rasta velikog broja mikroorganizama na selektivnim medijumima izdvojilo je potencijalne producente lipaza iz kolekcija kultura Tehnološko-metalurškog i Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, među kojima se nalaze prirodni izolati, kao i komercijalno dostupni mikrobni sojevi.
- Ispitivanje kinetike mikrobnog rasta i produkcije lipaza selektovanih sojeva u tečnim hranljivim podlogama pokazalo je da svi ispitivani mikroorganizmi postižu najveću produkciju enzima u kasnim stacionarnim fazama rasta ćelija, odnosno, početkom faze odumiranja mikroorganizma.
- Ustanovljeni su temperaturni i pH profili dobijenih enzima u cilju utvrđivanja mogućnosti njihove industrijske aplikacije. Dobijene bakterijske lipaze poreklom iz *Pseudomonas* spp. su pokazale potrebnu funkcionalnost u alkalnoj sredini, dok se *Candida utilis* i *Rhizopus oryzae* svrstavaju u red kiselih lipaza.
- Izdvojeni producenti lipaza su ispitani i sa aspekta proizvodnje ekstracelularnih proteaza na selektivnom medijumu. Kao dobar producent oba enzima izdvojen je izolat iz otpadnog mašinskog ulja okarakterisan kao *Pseudomonas aeruginosa*. Ispitana je kinetika produkcije protaze iz ovog mikroorganizma u tečnom medijumu, kao i osnovne karakteristike proizvedenog enzima za koji su utvrđeni operativni optimumi na pH 9 i 60 °C.
- Izvršena je pouzdana identifikacija selektovanog producenta lipaza i proteaza metodom sekvencioniranja 16S genomske sekvence, koja je potvrdila da ovaj izolat pripada *Pseudomonas aeruginosa* vrsti.
- Dobijena lipaza iz *Pseudomonas putida* B-21 i lipaza i proteaza iz *Pseudomonas aeruginosa* san-ai su ispitane sa aspekta stabilnosti u prisustvu površinski aktivnih materija, oksidacionih agenasa i komercijalnih detergenata kako bi se

utvrdila primenljivost dobijenih enzima kao aditiva u formulacijama detergenata.

- Lipaza iz *Pseudomonas aeruginosa* san-ai je pokazala izraženu stabilnost u prisustvu nekoliko površinski aktivnih materija, oksidacionih agenasa i komercijalnih detergenata na različitim temperaturama. Triton[®] X-100, Lutensol[®] XP 80, Tween[®] 20, pa čak i SDS su aktivirali *P. aeruginosa* san-ai lipazu i do 55%.
- Proteaza iz *Pseudomonas aeruginosa* san-ai je takođe bila stabilna u prisustvu nekoliko površinski aktivnih materija. Konkretno, dodatak Tween[®]-a 80 je višestruko aktivirao ovaj enzim tokom višerasovne inkubacije.
- Lipaza iz *Pseudomonas putida* B-21 je pokazala zadovoljavajuću stabilnost u prisustvu Triton[®] X-100, Lutensol[®] XP 80 i Tween[®]-a 80.
- Ispitana je efikasnost uklanjanja masnih mrlja nekoliko formulacija na bazi lipaze iz *Pseudomonas aeruginosa* san-ai i surfaktanata koji nisu pokazali izraženi denaturišući efekat. U zavisnosti od tipa surfaktanta i njegove koncentracije, postignuto je uklanjanje i do 80% masnoće.
- Enzimska formulacija detergenata je optimizovana metodom statistički planiranog eksperimenta. Uzimajući u obzir ekološke aspekte kao i pokazanu efikasnost, najbolji efekti odmašćivanja postižu se u formulaciji koja pored enzima sadrži nisku dozu Lutensol[®]-a XP 80 (0,4%).
- Kako je lipaza induktivni enzim, optimizacija proizvodnje lipaze pomoću ove vrste mikroorganizama podrazumevala je ispitivanje uticaja različitih induktora. Kao najbolji induktor produkcije lipaze izabrano je suncokretovo ulje, dok je dodatak Triton[®]-a X-100 dodatno pospešio sekreciju ovog enzima, kao i nativnih proteaza.
- Dalja optimizacija produkcije enzima metodom statistički planiranog eksperimenta definisala je sastave podloga i procesne parametre kojima se modifikuju regulatorni putevi biosinteze enzima sa ciljem povećanja prinosa lipaza i proteaza. Visoka proteolitička aktivnost se tako može ostvariti fermentacijom u medijumu koji je obogaćen Triton[®] X-100 (0.12% w/v) pri čemu se proces proizvodnje treba voditi na 32 °C. Niže temperature (20 °C) i suplementacija suncokretovim uljem pogoduju biosintezi lipaze.

10. Literatura

1. E. Jurado, V. Bravo, G. Luzon, M. Fernandez-Serrano, M. Garcia-Roman, D. Altmajer-Vaz, J. Maria Vicaria, Hard-Surface Cleaning Using Lipases: Enzyme-Surfactant Interactions and Washing Tests, *Journal of Surfactants and Detergents* **10** (2007) 61–70.
2. H. Lund, S. Gunnar Kaasgaard, P. Skagerlind, L. Jorgensen, C. Isak Jørgensen, M. van de Weert, Correlation Between Enzyme Activity and Stability of a Protease, an Alpha-Amylase and a Lipase in a Simplified Liquid Laundry Detergent System, Determined by Differential Scanning Calorimetry, *Journal of Surfactants and Detergents* **15** (2012) 9–21.
3. H.Lund, S.G. Kaasgaard, P. Skagerlind, L. Jorgensen, C. Isak Jørgensen, M. van de Weert, Protease and Amylase Stability in the Presence of Chelators Used in Laundry Detergent Applications: Correlation Between Chelator Properties and Enzyme Stability in Liquid Detergents, *Journal of Surfactants and Detergents* **15** (2012) 265–276.
4. H.S. Olsen, P. Falholt, The Role of Enzymes in Modern Detergency, *Journal of Surfactants and Detergents* **1** (1998) 555–567.
5. C. Hemachander, R. Puvanakrishnan, Lipase from *Ralstonia pickettii* as an additive in laundry detergent formulations, *Process Biochemistry* **35** (2000) 809–814.
6. P.H. Nielsen, P. Skagerlind, Cost-neutral replacement of surfactants with enzymes- a short-cut to environmental improvement for laundry washing, *Household and Personal Care Today* **4** (2007) 3–7.
7. M.S. Showell. Introduction to Detergents. in: *Handbook of Detergents*, Part D: Formulation, Taylor & Francis Group, Boca Raton, SAD (2006)
8. S.N. Blagojević, N.I. Potkonjak, D.Ž. Sužnjević, B.R. Simonović, Detergenti: Istorijat i razvoj, *Hemijski preglad* **51** (2010) 39–46
9. L. Oldenhove de Guertechin. Surafcants:Classifications. in: *Handbook of Detergents*, Part A: Properties, Guy Broze (Editor), Marcel Dekker, Inc., SAD (1999)
10. www.wikipedia.com
11. A. Crutzen, M.L. Douglass, Detergent Enzymes: A challenge!, in: *Handbook of Detergents - Part A – Properties*, Guy Broze (Editor), Marcel Dekker, Inc., SAD (1999)
12. F. Hasan, A. A. Shah, S. Javed, A. Hameed, Enzymes used in detergents: Lipases, *African Journal of Biotechnology* **9** (2010) 4836–4844.
13. Z. Knežević, *Enzimsko inženjerstvo*, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, (2008).
14. R.L. Antrim, J. Buchert, H. Burrows, I. Herbots, B. Kottwitz, H.B.M. Lenting, M.L. Niku-Paavola, P.J. Reilly, A. Suurnäkki, L. Viikari, Industrial Enzymes: Enzymes in Nonfood Applications, in: *Enzymes in Industry: Production and Applications*, Dr. Wolfgang Aehle (Editor), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. (treće izdanje, 2007)

15. S. Ito, Alkaline cellulase for laundry detergents: Production by *Bacillus sp.* KSM-635 and enzymatic properties, *Extremophiles* **1** (1997) 61-66.
16. Novozymes A/S, Novozymes Xpect®—The natural choice for fruit stains (brošura) 2011.
17. Z. Knežević (2003) Imobilizacija lipaze iz *Candida rugosa* na polimernim nosačima i na vlaknima od regenerisane celuloze u dijalizatoru, Doktorska disertacija, Tehnolološko-metalurški fakultet, Beograd
18. J. L. Arpigny, K.E. Jaeger, Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties, *Biochemical Journal* **343** (1999) 177-183.
19. B. Joseph, P.W. Ramteke, G. Thomas, Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments, *Biotechnology Advances* **26** (2008) 457–470.
20. G.D. Haki, S.K. Rakshit, Developments in industrially important thermostable enzymes: a review, *Bioresource Technology* **89** (2003) 17–34
21. N.Ž. Prlainović (2012) Proučavanje mehanizma enzimske sinteze 4,6-disupstituisanih-3-cijano-2-piridona, Doktorska disertacija, Tehnolološko-metalurški fakultet, Beograd
22. D.M. Jovanović (1998) Izolacija i karakterizacija lipaze prirodnog izolata *Penicillium cyclopium* BG AL1, Magistarski rad, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd.
23. M. Matori, T. Asahara, Y. Ota, Positional specificity of microbial lipases, *Journal of Fermentation and Bioengineering* **72** (1991) 397-398.
24. A. Adnani, M. Basri, E.A. Malek, A.B. Salleh, M.B.A. Rahman, N. Chaibakhsh, R.N.Z.R.A. Rahman, Optimization of lipase-catalyzed synthesis of xylitol ester by Taguchi robust design method, *Industrial Crops and Products* **31** (2010) 350–356.
25. H. Abbas, L. Comeau, Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor sp.*, *Enzyme and Microbial Technology* **32** (2003) 589-595.
26. G. Ozyilmaz, E. Gezer, Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **64** (2010) 140-145.
27. P. You, E. Su, X. Yang, D. Mao, D. Wei, Carica papaya lipase-catalyzed synthesis of terpene esters, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **71** (2011) 152–158
28. H.S.G. Tan, B. Yu, P. Curran, S. Q. Liu, Lipase-catalysed synthesis of natural aroma-active 2-phenylethyl esters in coconut cream, *Food Chemistry* **124** (2011) 80–84.
29. U.H. Zaidan, M.B.A. Rahman, S.S. Othman, M. Basri, E. Abdulmalek, R.N.Z.R.A. Rahman, A.B. Salleh, Biocatalytic production of lactose ester catalysed by mica-based immobilised lipase, *Food Chemistry* **131** (2012) 199–205.
30. D. Bezbradica, D. Mijin, S. Šiler-Marinković, Z. Knežević, The effect of substrate polarity on the lipase-catalyzed synthesis of aroma esters in solvent-free systems, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **45** (2007) 97-101.
31. K.E. Jaeger, M.T. Reetz, Microbial lipases form versatile tools for biotechnology, *Trends in Biotechnology* **16** (1998) 396-403.
32. S. Brocca, F. Secundo, M. Ossola, L. Alberghina, G. Carrea, G., M. Lotti, Sequence of the lid affects activity and specificity of *Candida rugosa* lipase isoenzymes. *Protein Science* **12** (2003) 2312–2319.
33. G. Santarossa, P.G. Lafranconi, C. Alquati, L. DeGioia, L. Alberghina, P. Fantucci, M. Lotti, Mutations in the “lid” region affect chain length specificity

- and thermostability of a *Pseudomonas fragi* lipase, FEBS Letters **579** (2005) 2383–2386
34. P.L.A. Overbeeke, C. Govardhan, N. Khalaf, J.A. Jongejan, J.J. Heijnen, Influence of lid conformation on lipase enantioselectivity, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **10** (2000) 385–393
 35. F. Secundo, G. Carrea, C. Tarabiono, P. Gatti-Lafranconi, S. Brocca, M.Lotti, K.E. Jaeger, M. Puls, T. Eggert, The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **39** (2006) 166–170
 36. D. Bezbradica (2007) Sinteza estara katalizovana slobodnom lipazom i lipazom imobilisanom na polimernim nosačima, Doktorska disertacija, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu.
 37. M. Nardini, B. W. Dijkstra, α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing, Current Opinion in Structural Biology **9** (1999) 732-737.
 38. R.N.Z.R.A. Rahman, A.B. Salleh, M. Basri, Lipases: Introduction, in: New Lipases and Proteases. R.N.Z.R.A. Rahman, A.B. Salleh, M. Basri (Eds.) Nova Science Publishers, Inc. New York, 2006
 39. S. Naik, A. Basu, R. Saikia, B.Madan, P. Paul, R. Chatterjee, J. Brask, A. Svendsen, Lipases for use in industrial biocatalysis: Specificity of selected structural groups of lipases, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **65** (2010) 18–23.
 40. J. Vakhlu, A. Kour, Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning, Electronic Journal of Biotechnology **9** (2006) 1–17.
 41. A.R. Macrae, P. How, Rearrangement process, United States Patent 4719178 (1988).
 42. M. Kapoor, M.N. Gupta, Lipase promiscuity and its biochemical applications, Process Biochemistry **47** (2012) 555–569.
 43. D.A. Lang, B.W. Dijkstra, Structural investigations of the regio- and enantioselectivity of lipases, Chemistry and Physics of Lipids **93** (1998) 115 – 122.
 44. S. Singh, U.C. Banerjee, Enantioselective hydrolysis of methoxyphenyl glycidic acid methyl ester [(±)-MPGM] by a thermostable and alkalostable lipase from *Pseudomonas aeruginosa*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **36** (2005) 30–35
 45. Z. Habibi, M. Mohammadi, M. Yousefi, Enzymatic hydrolysis of racemic ibuprofen esters using *Rhizomucor miehei* lipase immobilized on different supports, Process Biochemistry **48** (2013) 669–676.
 46. K.W. Lee, H.A. Bae, G.S. Shin, Y.H. Lee, Purification and catalytic properties of novel enantioselective lipase from *Acinetobacter* sp. ES-1 for hydrolysis of (S)-ketoprofen ethyl ester, Enzyme and Microbial Technology **38** (2006) 443–448.
 47. W.Y. Lou, M.H. Zong, Y.Y. Liu, J.F. Wang, Efficient enantioselective hydrolysis of d,l-phenylglycine methyl ester catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase B in ionic liquid containing systems, Journal of Biotechnology **125** (2006) 64–74.
 48. R. K. Saxena, P. K. Ghosh, R. Gupta, W.S. Davidson, S. Bradoo, R. Gulati, Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry, Current Science **77** (1999) 101-115.
 49. L. Liu, D. Lan, Q. Wang, C. Gao, Z. Li, B. Yang, Y. Wang, A “bridge-like” structure responsible for the substrate selectivity of mono- and diacylglycerol

- lipase from *Aspergillus oryzae*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **97** (2013) 144–149.
50. T. Xu, L. Liu, S. Hou, J. Xu, B. Yang, Y. Wang, J. Liu, Crystal structure of a mono- and diacylglycerol lipase from *Malassezia globosa* reveals a novel lid conformation and insights into the substrate specificity, Journal of Structural Biology **178** (2012) 363–369.
 51. S. Ferreira-Dias, G. Sandoval, F. Plou, F. Valero, The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries, Electronic Journal Of Biotechnology 16 (2013) Volume 16 Number 3 (14 May 2013)
 52. R. Sharma, Y. Chisti, U. C. Banerjee, Production, purification, characterization and applications of lipases, Biotechnology Advances **19** (2001) 627–662.
 53. F. Hasan, A.A. Shah, A. Hameed, Industrial applications of microbial lipases, Enzyme and Microbial Technology **39** (2006) 235–251.
 54. I. Meiri-Bendek, G.B. Dror, H. Laouz, D. Yaakobi, Z. Bar-On, A. Shulman, Human Breast Milk Lipid Mimetic As Dietary Supplement, US 20070218169 A1 patent
 55. P. Torres, D. Reyes-Duarte, N. López-Cortés, M. Ferrer, A. Ballesteros, F. J. Plou, Acetylation of vitamin E by *Candida antarctica* lipase B immobilized on different carriers, Process Biochemistry **43** (2008) 145–153.
 56. D. Bezbradica, M. Stojanović, D. Veličković, A. Dimitrijević, M. Carević, M. Mihailović, N. Milosavić, Kinetic model of lipase-catalyzed conversion of ascorbic acid and oleic acid to liposoluble vitamin C ester, Biochemical Engineering Journal **71** (2013) 89–96.
 57. A.L. Margolin, Enzymes in the synthesis of chiral drugs, Enzyme and Microbial Technology **15** (1993) 266–280
 58. E. Battistel, D. Bianchi, P. Cesti, C. Pina, Enzymatic resolution of (S)-(+)-naproxen in a continuous reactor. Biotechnology and Bioengineering **38** (1991) 659–664.
 59. M.R. Bradić, N.D. Ognjanović, D.I. Bezbradica, S.Ž. Grbavčić, N. Avramović, D.Ž. Mijin, Z.D. Knežević-Jugović, Enzimaska sinteza monoacilglicerola, Hemijska industrija **64** (2010) 375–388.
 60. A. M. Gumel, M. S. M. Annuar, T. Heidelberg, Y. Chisti, Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid esters, Process Biochemistry **46** (2011) 2079–2090
 61. Y. Fan, J. Qian, Lipase catalysis in ionic liquids/supercritical carbon dioxide and its applications, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **66** (2010) 1–7.
 62. S. Soultani, S. Ognier, J.M. Engasser, M. Ghoul, Comparative study of some surface active properties of fructose esters and commercial sucrose esters, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **227** (2003) 35–44
 63. M. Habulin, S. Kabeder, L. Knez, Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters in organic solvent and in supercritical carbon dioxide and their antimicrobial activity, The Journal of Supercritical Fluids **45** (2008) 338–345.
 64. A. Salis, V. Solinas, M. Monduzzi, Wax esters synthesis from heavy fraction of sheep milk fat and cetyl alcohol by immobilised lipases, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **21** (2003) 167–174.
 65. L. Deng, X. Wang, K. Nie, F. Wang, J. Liu, P. Wang, T. Tan, Synthesis of Wax Esters by Lipase-catalyzed Esterification with Immobilized Lipase from *Candida* sp. 99–125, Chinese Journal of Chemical Engineering **19** (2011) 978–982.

66. K.E. Jaeger, T. Eggert, Lipases for biotechnology, *Current Opinion in Biotechnology* **13** (2002) 390-397.
67. Q. You, X. Yin, Y. Zhao, Y. Zhang, Biodiesel production from jatropha oil catalyzed by immobilized *Burkholderia cepacia* lipase on modified attapulgate, *Bioresource Technology* **148** (2013) 202-207.
68. N. Ognjanovic, D. Bezbradica, Z. Knezevic-Jugovic, Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability, *Bioresource Technology* **100** (2009) 5146-5154.
69. J. Yan, X. Zheng, S. Li, A novel and robust recombinant *Pichia pastoris* yeast whole cell biocatalyst with intracellular overexpression of a *Thermomyces lanuginosus* lipase: Preparation, characterization and application in biodiesel production, *Bioresource Technology* **151** (2014) 43-48.
70. A. de Vasconcellos, A.S. Paula, R.A. Luizon Filho, L. A. Farias, E. Gomes, D.A.G. Aranda, J.G. Nery, Synergistic effect in the catalytic activity of lipase *Rhizomucor miehei* immobilized on zeolites for the production of biodiesel, *Microporous and Mesoporous Materials* **163** (2012) 343-355.
71. M. Kaieda, T. Samukawa, T. Matsumoto, K. Ban, A. Kondo, Y. Shimada, H. Noda, F. Nomoto, K. Ohtsuka, E. Izumoto, H. Fukuda, Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent, *Journal of Bioscience and Bioengineering* **88** (1999) 627-631.
72. T. Tan, J. Lu, K. Nie, L. Deng, F. Wang, Biodiesel production with immobilized lipase: a review, *Biotechnology Advances* **28** (2010) 628-634.
73. C.S. Pundir, B.S. Singh, J. Narang, Construction of an amperometric triglyceride biosensor using PVA membrane bound enzymes, *Clinical Biochemistry* **43** (2010) 467-472.
74. C.S. Pundir, J. Narang, Determination of triglycerides with special emphasis on biosensors: A review, *International Journal of Biological Macromolecules* **61** (2013) 379-389.
75. K. Bojsen, K. Borch, S. A. Patkar, D. A. Petersen, A. Svendsen, J. Vind, Lipase variant, EP 1054956 A1 patent (2000)
76. K.V. Andersen, K. Bojsen, D.A. Halkier, S.A. Patkar, A. Svendsen, J. Vind, Lipase variant, EP 1171581 A1 patent (2002)
77. K. Borch, J. Vind, A. Svendsen, D.A. Halkier, S.A. Patkar, K. Bojsen, Lipase variant, US 6624129 B1 patent (2003)
78. M.E. Bjornvad, K. Borch, T. H. Callisen, H. Ge, P.K. Hansen, J.C.F. Knotzel, M. Lamsa, A. Svendsen, J. Vind, D. Yaver, Lipase variants, WO 2007087508 A2 patent (2007)
79. J.S. Okkels, A. Svendsen, S.A. Patkar, K. Borch, Protein engineering of microbial lipases with industrial interest, in: *Engineering Of/with Lipases*, F.X. Malcata (Ed.) Kluwer academic publisher, Holandija (1996)
80. E. Boel, T. Christensen, I. B. Høge-Jensen, H.F. Woldike, Methods for producing Humicola lipases in aspergillus, US5965384 A (1999)
81. E.L. Roggen, A.A. Olsen, S. Ernst, Low allergenic protein variants, WO 2000026230 A1 patent (2000)
82. S. Ernst, A.A. Olsen, E.L. Roggen, Glycosylated proteins having reduced allergenicity, WO 2000026354 A1 patent (2000)

83. G. Ruchi, G. Anshu, S.K. Khare, Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain: Production optimization by response surface methodology and application, *Bioresource Technology* **99** (2008) 4796–4802.
84. R. Liu, X. Jiang, H. Mou, H. Guan, H.M. Hwang, X. Li, A novel low-temperature resistant alkaline lipase from a soda lake fungus strain *Fusarium solani* N4-2 for detergent formulation, *Biochemical Engineering Journal* **46** (2009) 265–270.
85. N.Saisubramanian, N.G. Edwinoliver, N. Nandakumar, N.R. Kamini, R. Puvanakrishnan, Efficacy of lipase from *Aspergillus niger* as an additive in detergent formulations: a statistical approach. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **33** (2006) 669–676.
86. L. Bora, M.C. Kalita, Production of thermostable alkaline lipase on vegetable oils from a thermophilic *Bacillus* sp. DH4, characterization and its potential applications as detergent additive, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **83** (2008) 688–693.
87. V.P. Lailaja, M. Chandrasekaran, Detergent compatible alkaline lipase produced by marine *Bacillus smithii* BTMS 11, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **29** (2013) 1349–1360.
88. N. Saisubramanian, S. Sivasubramanian, N. Nandakumar, B. Indirakumar, N. Amaranath Chaudhary, R. Puvanakrishnan, Two Step Purification of *Acinetobacter* sp. Lipase and Its Evaluation as a Detergent Additive at Low Temperatures, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **150** (2008) 139–156.
89. P. Rath, R.K. Saxena, R. Gupta, A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation, *Process Biochemistry* **37** (2001) 187–192.
90. H.K. Wang, R.J. Liu, F.P. Lu, W. Qi, J. Shao, H.J. Ma, A novel alkaline and low-temperature lipase of *Burkholderia cepacia* isolated from Bohai in China for detergent formulation, *Annals of Microbiology* **59** (2009) 105–110.
91. M.B. Rao, A. M. Tanksale, M. S. Ghatge, V.V. Deshpande, Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62** (1998) 597–635.
92. J.J. Neitzel (2010) Enzyme Catalysis: The Serine Proteases. *Nature Education* **3**(9):21
93. A.B. Salleh, C. N. A. Razak, R.N.Z.R.A. Rahman, M. Basri, Protease:Introduction, in: *New Lipases and Proteases*. R.N.Z.R.A. Rahman, A.B. Salleh, M. Basri (Eds.) Nova Science Publishers, Inc. New York, 2006
94. M. Teuber, Production of chymosin (EC 3.4.23.4) by microorganisms and its use for cheesemaking, *Bulletin of the International Dairy Federation* **251** (1990) 3–15.
95. Y. Kawaguchi, S. Kosugi, K. Sasaki, T. Uozumi, T. Beppu, Production of chymosin in *Escherichia coli* cells and its enzymatic properties, *Agricultural and Biological Chemistry* **51** (1987) 1871–1877.
96. J. Yacoubou, Microbial Rennets and Fermentation Produced Chymosin (FPC): How Vegetarian Are They? <http://www.vrg.org>
97. R.J. Siezen, J.A.M. Leunissen, Subtilases: The superfamily of subtilisin-like serine protease, *Protein Science* **6** (1997) 501–523.
98. K. Maurer, Detergent proteases, *Current Opinion in Biotechnology* **15** (2004) 330–334.
99. R. Gupta, Q.K. Beg, P. Lorenz, Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications, *Applied Microbiology and Biotechnology* **59** (2002) 15–32.

100. K. Saeki, K. Ozaki, T. Kobayashi, S. Ito, Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes, and crystal structures, *Journal of Bioscience and Bioengineering* **103** (2007) 501–508.
101. A. Tomlinson, J. Carnali, A review of key ingredients used in past and present Auto-dishwashing formulation and physico-chemical processes they facilitate, in: *Handbook for cleaning/decontamination of surfaces*, I. Johansson, P. Somasundaran (Eds.) Elsevier, Holandija (2007)
102. P.N. Bryan, Protein engineering of subtilisin, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1543** (2000) 203–222.
103. A.A. Olsen, E. L. Roggen, S. Ernst, Low allergenic protein variants, US 6686164 B1, WO 2005118793 A2, WO 2002088340 A3, US 20050181446 A1 patent (2004)
104. B. Jaouadi, S. Ellouz-Chaabouni, M. Rhimi, S. Bejar, Biochemical and molecular characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus pumilus* CBS with high catalytic efficiency, *Biochimie* **90** (2008) 1291–1305.
105. X.Q. Han, S. Damodaran, Purification and Characterization of Protease Q: A Detergent- and Urea-Stable Serine Endopeptidase from *Bacillus pumilus*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46** (1998) 3596–3603.
106. R. Rajkumar, K.R. Jayappriyan, R. Rengasamy, Purification and characterization of a protease produced by *Bacillus megaterium* RRM2: application in detergent and dehairing industries, *Journal of Basic Microbiology* **51** (2011) 614–624.
107. A. Sellami-Kamoun, A. Haddar, N. El-Hadj Ali, B. Ghorbel-Frikha, S. Kanoun, M. Nasri, Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations, *Microbiological Research* **163** (2008) 299–306.
108. N. Hmidet, N. El-Hadj Ali, A. Haddar, S. Kanoun, S.K. Alya, M. Nasri, Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive, *Biochemical Engineering Journal* **47** (2009) 71–79
109. K. Jellouli, O. Ghorbel-Bellaaj, H.B. Ayed, L. Manni, R. Agrebi, M. Nasri, Alkaline-protease from *Bacillus licheniformis* MP1: Purification, characterization and potential application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization, *Process Biochemistry* **46** (2011) 1248–1256
110. D. Jain, I. Pancha, S.K. Mishra, A. Shrivastav, S. Mishra, Purification and characterization of haloalkaline thermoactive, solvent stable and SDS-induced protease from *Bacillus* sp.: A potential additive for laundry detergents, *Bioresource Technology* **115** (2012) 228–236.
111. K.K. Doddapaneni, R. Tatineni, R.N. Vellanki, S. Rachcha, N. Anabrolu, V. Narakuti, L.N. Mangamoori, Purification and characterization of a solvent and detergent-stable novel protease from *Bacillus cereus*, *Microbiological Research* **164** (2009) 383–390.
112. S.K. Singh, S.K. Singh, V.R. Tripathi, S.K. Garg, Purification, characterization and secondary structure elucidation of a detergent stable, halotolerant, thermoalkaline protease from *Bacillus cereus* SIU1, *Process Biochemistry* **47** (2012) 1479–1487.
113. R.M. Banik, M. Prakash, Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*, *Microbiological Research* **159** (2004) 135–140.

114. L.V.A. Reddy, Y.J. Wee, H.W. Ryu, Purification and characterization of an organic solvent and detergent-tolerant novel protease produced by *Bacillus* sp. RKY3, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **83** (2008) 1526–1533.
115. S.K. Rai, A.K. Mukherjee, Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (Alzwiprase) from *Bacillus subtilis* DM-04, *Biochemical Engineering Journal* **48** (2010) 173–180.
116. C.S. Rao, T. Sathish, P. Ravichandra, R.S. Prakasham, Characterization of thermo- and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications, *Process Biochemistry* **44** (2009) 262–268.
117. M. Venugopal, A. V. Saramma, An alkaline protease from *Bacillus circulans* BM15, newly isolated from a mangrove station: characterization and application in laundry detergent formulations, *Indian Journal of Microbiology* **47** (2007) 298–303.
118. A. Ghafoor, S. Hasnain, Characteristics of an extracellular protease isolated from *Bacillus subtilis* AG-1 and its performance in relation to detergent components, *Annals of Microbiology* **59** (2009) 559–563.
119. M.S. Dodia, C.M. Rawal, H.G. Bhimani, R.H. Joshi, S.K. Khare, S.P. Singh, Purification and stability characteristics of an alkaline serine protease from a newly isolated *Haloalkaliphilic bacterium* sp. AH-6, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **35** (2008) 121–131.
120. M. Venugopal, A.V. Saramma, Characterization of alkaline protease from *Vibrio fluvialis* strain VM10 isolated from a mangrove sediment sample and its application as a laundry detergent additive, *Process Biochemistry* **41** (2006) 1239–1243.
121. I. A. Cavello, S. F. Cavalitto, R. A. Hours, Biodegradation of a Keratin Waste and the Concomitant Production of Detergent Stable Serine Proteases from *Paecilomyces lilacinus* *Applied Biochemistry and Biotechnology* **167** (2012) 945–958.
122. B.Y. Chen, H.T. Wang, Utility of enzymes from *Fibrobacter succinogenes* and *Prevotella ruminicola* as detergent additives, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **35** (2008) 923–930.
123. R. Tunga, B. Shrivastava, R. Banerjee, Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*, *Process Biochemistry* **38** (2003) 1553–1558.
124. M. Hajji, S. Kanoun, M. Nasri, N. Gharsallah, Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1, *Process Biochemistry* **42** (2007) 791–797.
125. M.F. Najafi, D. Deobagkar, D. Deobagkar, Potential Application of Protease Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100, *Electronic Journal of Biotechnology* **8** (2005) 197–203.
126. A. Gupta, S.K. Khare, Enhanced production and characterization of a solvent stable protease from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA, *Enzyme and Microbial Technology* **42** (2007) 11–16.
127. R. Garrett, C. Grisham, *Biochemistry*, Cengage Learning, Inc. 2009.
128. D.B. Archer, D.A. Wood, (1995) Fungal exoenzymes, in: *The growing fungus*, Editors: Neil A. R. Gow, Geoffrey M. Gadd, Chapman and Hill, London.

129. A. Ullmann, Catabolite repression: a story without end, *Research in Microbiology* **147** (1996) 455-458.
130. M. Jirešová, J. Janeček, J. Náprstek, J. Spížek, Z. Dobrová, Catabolite repression of different inducible enzymes in *Escherichia coli* and the effect of cAMP, *Folia Microbiologica* **26** (1981) 265-269.
131. Mansi El-Mansi, Charles F. A. Bryce (2007) *Fermentation microbiology and biotechnology*, Taylor and Francis, Boca Raton
132. F. Rosenau, K.E. Jaeger, Bacterial lipases from *Pseudomonas*: Regulation of gene expression and mechanisms of secretion, *Biochimie* **82** (2000) 1023-1032
133. K. Pauwels, M.M. Sanchez del Pino, G. Feller, P. Van Gelder P (2012) Decoding the Folding of *Burkholderia glumae* Lipase: Folding Intermediates En Route to Kinetic Stability. *PLoS ONE* 7(5): e36999. doi:10.1371/journal.pone.0036999
134. A. Urban, M. Leipelt, T. Eggert, K.E. Jaeger, DsbA and DsbC affect extracellular enzyme formation in *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Bacteriology* **183** (2001) 587-596.
135. L. A. Underkofler, R. R. Barton, S. S. Rennert, Production of Microbial Enzymes and Their Applications, *Applied Microbiology* **6** (1958) 212-221.
136. K. Davranov, V. B. Kbnlameizer, Current state of the study of microbial lipases, *Chemistry of Natural Compounds* **33** (1997) 113-126.
137. D. Li, B. Wang, T.Tan, Production enhancement of *Rhizopus arrhizus* lipase by feeding oleic acid, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **43** (2006) 40-43
138. D. Wang, Y. Xu, T. Shan, Effects of oils and oil-related substrates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and optimization of the lipase fermentation media, *Biochemical Engineering Journal* **41** (2008) 30-37.
139. N. Gupta, V. Sahai, R. Gupta, Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: Statistical medium optimization and production in a bioreactor, *Process Biochemistry* **42** (2007) 518-526.
140. M.A. Gordillo, J.L. Montesinos, C. Casas, F. Valero, J. Lafuente, C. Solà, Improving lipase production from *Candida rugosa* by a biochemical engineering approach, *Chemistry and Physics of Lipids* **93** (1998) 131-142.
141. G. Corzo, S. Revah, Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681, *Bioresource Technology* **70** (1999) 173-180.
142. H. Yu, J. Han, N. Li, X. Qie, Y. Jia, Fermentation Performance and Characterization of Cold-Adapted Lipase Produced with *Pseudomonas* Lip35, *Agricultural Sciences in China* **8** (2009) 956-962.
143. B.L. Cohen, H. Drucker, Regulation of exocellular protease in *Neurospora crassa*: Induction and repression under conditions of nitrogen starvation, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **182** (1977) 601-613.
144. A. Ganesh Kumar, S. Swarnalatha, B. Sairam, G. Sekaran, Production of alkaline protease by *Pseudomonas aeruginosa* using proteinaceous solid waste generated from leather manufacturing industries, *Bioresource Technology* **99** (2008) 1939-1944.
145. R.N.Z.R.A. Rahman, L.P. Geok, M. Basri, A.B. Salleh, An organic solvent-tolerant protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain K: Nutritional factors affecting protease production, *Enzyme and Microbial Technology* **36** (2005) 749-757.
146. S. Benjamin, A. Pandey, Optimization of liquid media for lipase production by *Candida rugosa*, *Bioresource Technology* **55** (1995) 167-170.

147. S.Ž. Grbavčić, S.I. Dimitrijevic-Brankovic, D.I. Bezbradica, S.S. Siler-Marinkovic, Z.D. Knezevic Zorica, Effect of fermentation conditions on lipase production by *Candida utilis*, *Journal of the Serbian Chemical Society* **72** (2007) 757-765.
148. S.Y. Lee, J.S. Rhee, Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK, *Enzyme and Microbial Technology* **15** (1993) 617-623.
149. I. Karadzic, A. Masui, L. Izrael-Zivkovic, N. Fujiwara, Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from putrid mineral cutting oil as component of metalworking fluid, *Journal of Bioscience and Bioengineering* **102** (2006) 82-89.
150. G. Sarath, R.S. de la Motte, F.W. Wagner, Protease assay methods in: *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*, R.J. Beynon, J.S. Bond (Eds.), Oxford: IRL Press, Velika Britanija (1989) 25-55
151. N. Hutadilok-Towatana, A. Painupong, P. Suntinanalert, Purification and characterization of an extracellular protease from alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp. PS719, *Journal of Bioscience and Bioengineering* **87** (1999) 581-587.
152. QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook, Qiagen, Holandija, 2012
153. QIAquick® Spin Handbook, Qiagen, Holandija, 2008.
154. APHA-AWWA-WEF, American Public Health Association AWWA, Water Federation (1998) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Washington DC, USA.
155. H. Chahinian, L. Nini, E. Boitard, J.P. Dubès, L.C. Comeau, L. Sarda, Distinction Between Esterases and Lipases: A Kinetic Study with Vinyl Esters and TAG, *Lipids* **37** (2002) 653-662.
156. G. Kouker, K.E. Jaeger, Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases, *Applied and Environmental Microbiology* **53** (1987) 211-213.
157. R. Gupta, P. Rathi, N. Gupta, S. Bradoo, Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview, *Biotechnology and Applied Biochemistry* **37** (2003) 63-71.
158. A. Hiol, M.D. Jonzo, N. Rugani, D. Druet, L. Sarda, L. Claude Comeau, Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit, *Enzyme and Microbial Technology* **26** (2000) 421-430.
159. T. Ito, H. Kikuta, E. Nagamori, H. Honda, H. Ogino, H. Ishikawa, T. Kobayashi, Lipase production in two-step fed-batch culture of organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03, *Journal of Bioscience and Bioengineering* **91** (2001) 245-250.
160. N. Kulkarni, R.V. Gadre, Production and properties of an alkaline, thermophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* NS2W, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **28** (2002) 344 - 348.
161. B.H. Cadirci, I. Yasa, An organic solvents tolerant and thermotolerant lipase from *Pseudomonas fluorescens* P21, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **64** (2010) 155-161.
162. M. Elibol, D. Ozer, Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*, *Process Biochemistry* **36** (2000) 325-329.
163. B. S. Kim, C. T. Hou, Production of lipase by high cell density fed-batch culture of *Candida cylindracea*, *Bioprocess and Biosystems Engineering* **29** (2006) 59-64.

164. I. Sokolovská, C. Albasi, J.P. Riba, V. Bálež, Production of extracellular lipase by *Candida cylindracea* CBS 6330, *Bioprocess Engineering* **19** (1998) 179-186.
165. E. J. Gilbert, J.W. Drozd, C.W. Jones, Physiological regulation and optimization of lipase activity in *Pseudomonas aeruginosa* EF2, *Journal of General Microbiology* **131** (1991) 2215-2221.
166. A. Hiol, M.D Jonzo, D. Druet, L. Comeau, Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. *hiemalis*, *Enzyme and Microbial Technology* **25** (1999) 80-87.
167. J. L. Smith, John A. Alford, Inhibition of Microbial Lipases by Fatty Acids, *Applied Microbiology* **14** (1966) 699-705.
168. R. B. Salah, H. Mosbah, A. Fendri, A. Gargouri, Y. Gargouri, H. Mejdoub, Biochemical and molecular characterization of a lipase produced by *Rhizopus oryzae*. *FEMS Microbiology Letters* **260** (2006) 241-248.
169. Z. Li, X. Li, Y. Wang, Y. Wang, F. Wang, J. Jiang, Expression and characterization of recombinant *Rhizopus oryzae* lipase for enzymatic biodiesel production, *Bioresource Technology* **102** (2011) 9810-9813.
170. C. Joshi, S.K.Khare, Purification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* lipase produced by SSF of deoiled *Jatropha* seed cake, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **2** (2013) 32-37.
171. A. Bose, H. Keharia, Production, characterization and applications of organic solvent tolerant lipase by *Pseudomonas aeruginosa* AAU2, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **2** (2013) 255-266.
172. M. Cheng, S. Takenaka, S. Aoki, S. Murakami, K. Aoki, Purification and characterization of an eggshell membrane decomposing protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain ME-4, *Journal of Bioscience and Bioengineering* **107** (2009) 373-378.
173. M.F. Najafi, D.N. Deobagkar, M. Mehrvarz, D.D. Deobagkar, Enzymatic properties of a novel highly active and chelator resistant protease from a *Pseudomonas aeruginosa* PD100, *Enzyme and Microbial Technology* **39** (2006) 1433-1440.
174. N. Mahanta, A. Gupta, S.K. Khare, Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate, *Bioresource Technology* **99** (2008) 1729-1735.
175. M.B. Veerabhadrapa, S. B. Shivakumar, S. Devappa, Solid-state fermentation of *Jatropha* seed cake for optimization of lipase, protease and detoxification of anti-nutrients in *Jatropha* seed cake using *Aspergillus versicolor* CJS-98, *Journal of Bioscience and Bioengineering* **117** (2014) 208-214.
176. C. Henriette, S. Zinebi, M. F. Aumaitre, E. Petitdemange, H. Petitdemange, Protease and lipase production by a strain of *Serratia marcescens* (532 S), *Journal of Industrial Microbiology* **12** (1993) 129-135.
177. D.M.G. Freire, G.L. Sant'Anna Jr., T.L.M. Alves, Mathematical modeling of lipase and protease production by *Penicillium restrictum* in a batch fermenter, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **79** (1999) 845-855.
178. I. Karadzic, A. Masui, N. Fujiwara, Purification and characterization of a protease from *Pseudomonas aeruginosa* grown in cutting oil. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **98** (2004) 145-152.

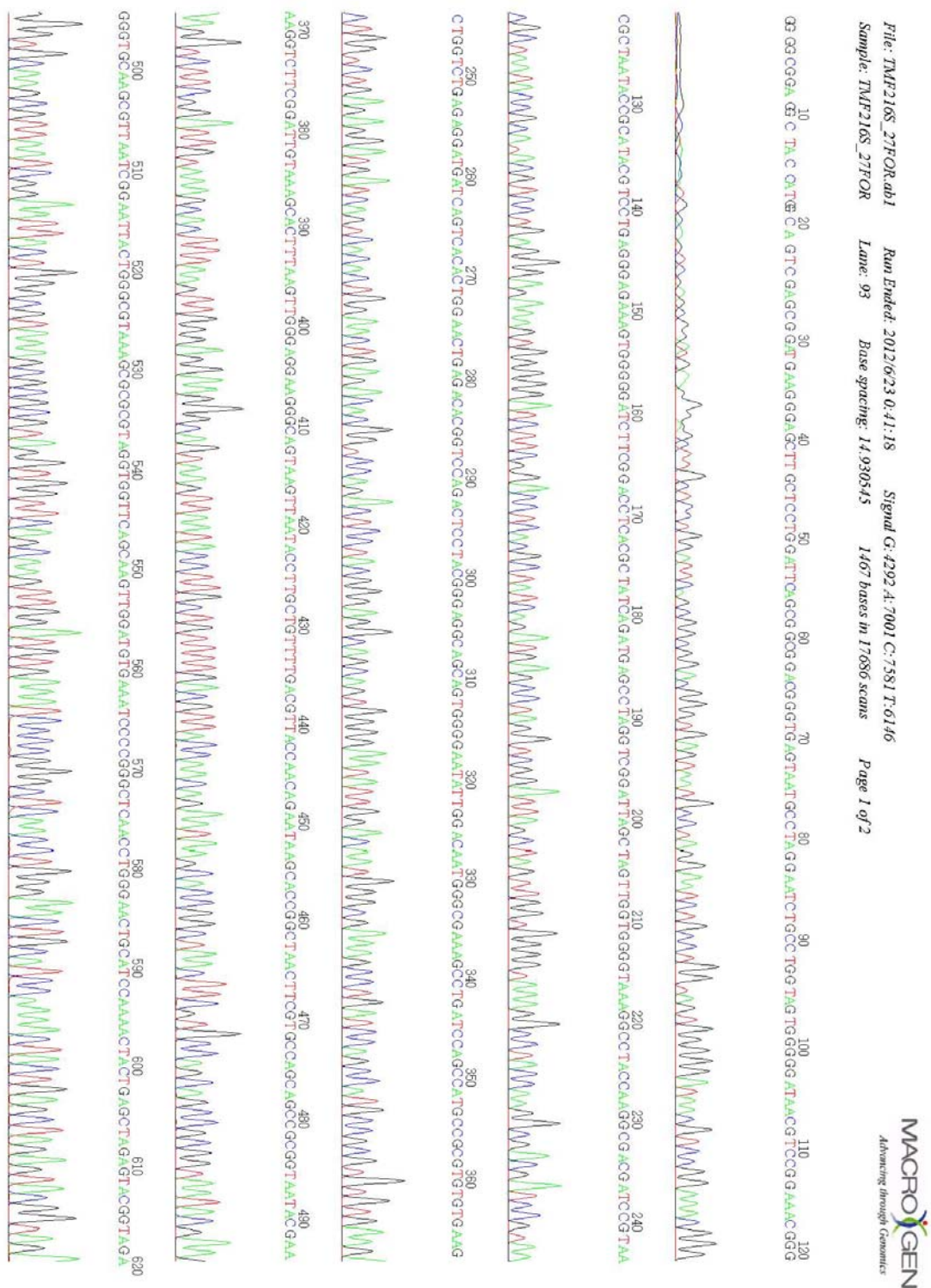
179. Doudoroff M., Palleroni N.J., 1974. Genus *Pseudomonas*, In: Buchanan R.E., Gibbons N.E. (eds). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th edition. pp. 217-243. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, USA.
180. M. Rikalovic, A. Abdel-Mawgoud, E. Déziel, G. Gojgic-Cvijovic, Z. Nestorovic, M. Vrvic, I. Karadzic, Comparative Analysis of Rhamnolipids from Novel Environmental Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Surfactants and Detergents* **16** (2013) 673-682.
181. M. R. Stoner, D.A. Dale, P.J. Gualfetti, T. Becker, M.C. Manning, J.F. Carpenter, T. W. Randolph, Protease autolysis in heavy-duty liquid detergent formulations: effects of thermodynamic stabilizers and protease inhibitors, *Enzyme and Microbial Technology* **34** (2004) 114-125.
182. L. K. Nielsen, O. Simonsen, Chapter 5 Design of liquid enzyme products with built-in liquid detergent stabilization system, *Computer Aided Chemical Engineering* **23** (2007) 149-163.
183. G. Savelli, N. Spreti, P. Di Profio, Enzyme activity and stability control by amphiphilic self-organizing systems in aqueous solutions, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **5** (2000) 111 -117.
184. S.F. Santos, D. Zanette, H. Fisher, H., R.J. Itri, A systematic study of bovine serum albumin (BSA) and sodium dodecyl sulfate (SDS) interactions by surface tension and small angle X-ray scattering. *Journal of Colloid and Interface Science* **262** (2003) 400-408.
185. G. L. Russell, L. N. Britton, Use of Certain Alcohol Ethoxylates to Maintain Protease Stability in the Presence of Anionic Surfactants, *Journal of Surfactants and Detergents* **5** (2002) 5-10.
186. M. Guncheva, D. Zhiryakova, N. Radchenkova, M. Kambourova, Effect of nonionic detergents on the activity of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* MC7, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **49** (2007) 88-91.
187. M.A. Biasutti, E.B. Abuin, J.J. Silber, N.M. Correa, E.A. Lissi, Kinetics of reactions catalyzed by enzymes in solutions of surfactants, *Advances in Colloid and Interface Science* **136** (2008) 1-24.
188. R. Gaur, A. Gupta, S.K. Khare, Purification and characterization of lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA, *Process Biochemistry* **43** (2008) 1040-1046.
189. E. Hoshino, A. Tanaka, Enhancement of Enzymatic Catalysis of *Bacillus amyloliquefaciens* α -Amylase by Nonionic Surfactant Micelles, *Journal of Surfactants and Detergents* **6** (2003) 299-303.
190. G. Ji, H. Zhang, F. Huang, X. Huang, Effects of nonionic surfactant Triton X-100 on the laccase-catalyzed conversion of bisphenol A, *Journal of Environmental Sciences* **21** (2009) 1486-1490.
191. A. Gupta, I. Roy, S.K. Khare, M.N. Gupta, Purification and characterization of a solvent stable protease from *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *Journal of Chromatography A* **1069** (2005) 155-161.
192. W.C. Almeida do Nascimento, M.L. Leal Martins, Studies on the stability of protease from *Bacillus sp.* and its compatibility with commercial detergent, *Brazilian Journal of Microbiology* **37** (2006) 307-311.

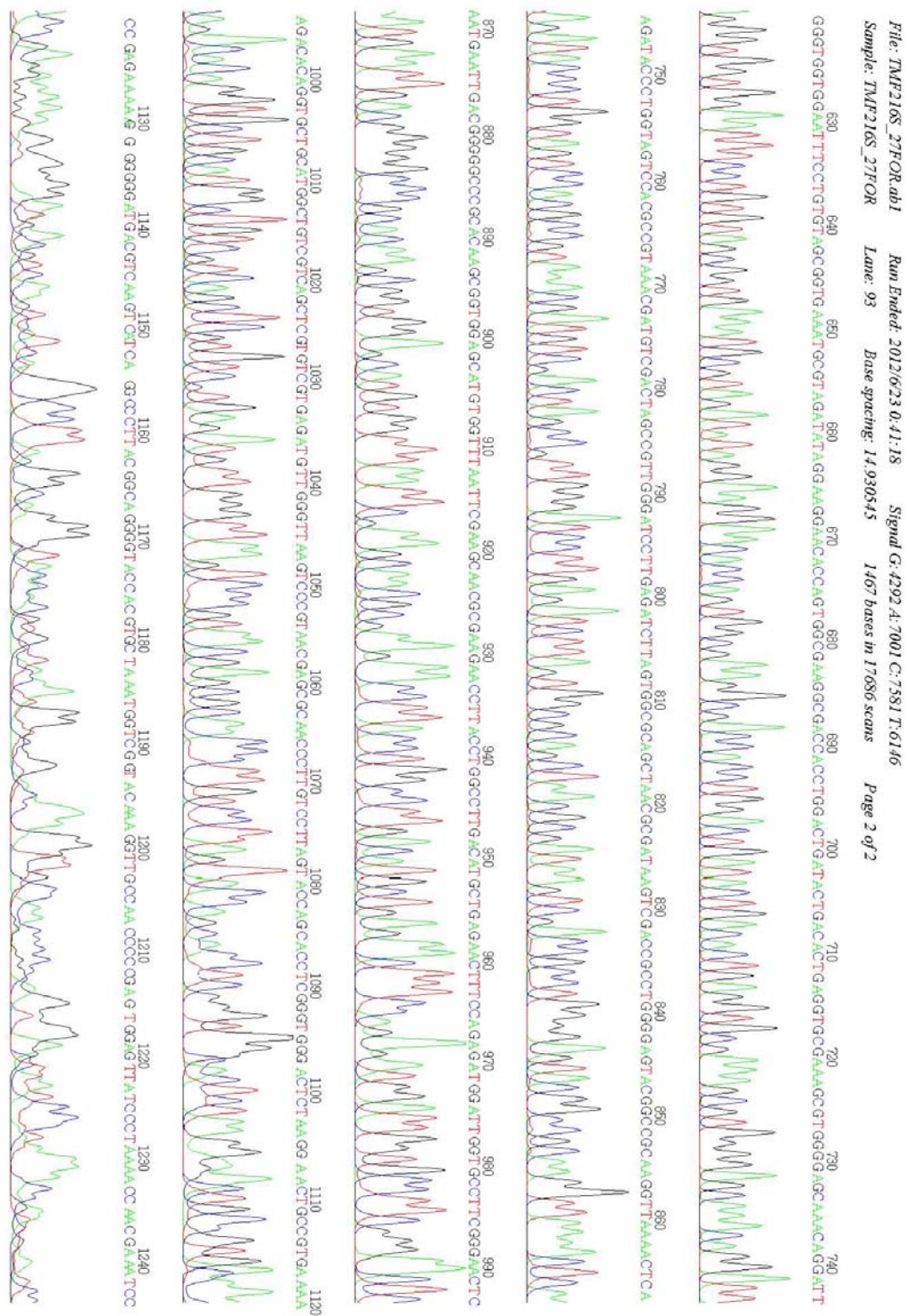
193. H.S. Joo, Y.M. Koo, J.W. Choi, C.S. Chang, 2005. Stabilization method of an alkaline protease from inactivation by heat, SDS and hydrogen peroxide. *Enzyme and Microbial Technology* **36** (2005) 766–772.
194. K. Shah, K. Mody, J.Keshri, B. Jha, Purification and characterization of a solvent, detergent and oxidizing agent tolerant protease from *Bacillus cereus* isolated from the Gulf of Khambhat, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **67** (2010) 85–91.
195. S.K. Singh, S.K. Singh, V.R. Tripathi, S.K. Garg, S.K. Khare, Downstream processing, characterization, and structure–function relationship of solvent-, detergent-, psychro-, thermo-, alkalistable metalloprotease from metal-, solvent-tolerant psychrotrophic *Pseudomonas putida* SKG-1 isolate, *Biotechnology Progress* **29** (2013) 99–108.
196. H.S. Joo, C.G. Kumar, G.C. Park, S.R. Paik, C.S. Chang, Oxidant and SDS-stable alkaline protease from *Bacillus clausii* I-52: production and some properties, *Journal of Applied Microbiology* **95** (2003) 267–272.
197. I. Belhaj-Ben Romdhane, A. Fendri, Y. Gargouri, A. Gargouri, H. Belghith, A novel thermoactive and alkaline lipase from *Talaromyces thermophilus* fungus for use in laundry detergents, *Biochemical Engineering Journal* **53** (2010) 112–120.
198. A. Haddar, A. Sellami-Kamoun, N. Fakhfakh-Zouari, N. Hmidet, M. Nasri, Characterization of detergent stable and feather degrading serine proteases from *Bacillus mojavensis* A21, *Biochemical Engineering Journal* **51** (2010) 53–63.
199. W. E. Knox, V. H. Auerbach, K. Zarudnaya, M. Spirtes, The action of cationic detergents on bacteria and bacterial enzymes, *Journal of Bacteriology* **58** (1949) 443–452.
200. I.A. Rahman, R.N.Z.R.A. Rahman, A.B. Salleh, M. Basri, Formulation and Evaluation of an Automatic Dishwashing Detergent Containing T1 Lipase, *Journal of Surfactants and Detergents* **16** (2013) 427–434
201. R. Sharma, S.K. Soni, R.M. Vohra, L.K. Gupta, J.K. Gupta, Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1, *Process Biochemistry* **37** (2002) 1075–1084
202. M. Chauhan, R.S. Chauhan, V.K. Garlapati, Evaluation of a New Lipase from *Staphylococcus* sp. for Detergent Additive Capability, *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 374967, 6 pages, 2013. doi:10.1155/2013/374967
203. B. Simončić, V. Rozman, Wettability of cotton fabric by aqueous solutions of surfactants with different structures, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **292** (2007) 236–245.
204. C. Kim, Y.L. Hsieh, Wetting and absorbency of nonionic surfactant solutions on cotton fabrics, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **187–188** (2001) 385–397.
205. E. Kissa (1987) Kinetics and mechanisms of soiling and detergency. In: Cutler WG, Kissa E (eds) *Detergency: Theory and Technology*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp 193–323
206. A. Sonesson, T. Callisen, U. Elofsson, H. Brismar, Imaging the Detergency of Single Cotton Fibers with Confocal Microscopy: the Effect of Surfactants and Lipases. *Journal of Surfactants and Detergents* **10** (2007) 211–218.

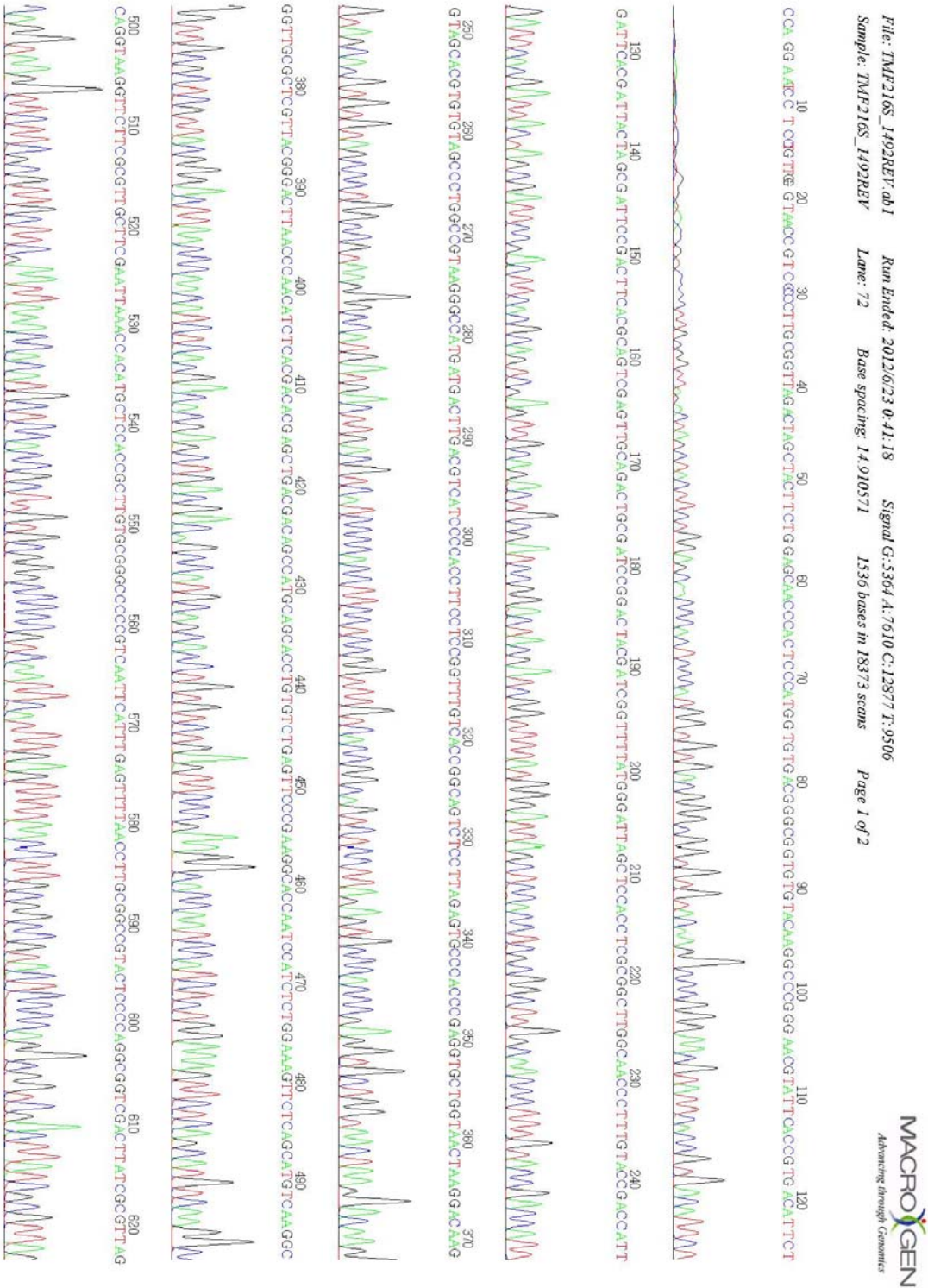
207. S.K. Obendorf, A.Varanasi, R. Mejldal, M. Thellersen, Function of lipase in lipid soil removal as studied using fabrics with different chemical accessibility, *Journal of Surfactants and Detergents* **4** (2001) 233-245.
208. A. Pettersson, M. Adamsson, G. Dave, Toxicity and detoxification of Swedish detergents and softener products, *Chemosphere* **41** (2000) 1611-1620.
209. T. Snabe, S.B. Petersen, Lag phase and hydrolysis mechanisms of triacylglycerol film lipolysis, *Chemistry and Physics of Lipids* **125** (2003) 69-82.
210. K. Thirunavukarasu, N.G. Edwinoliver, S. Durai Anbarasan, M.K. Gowthaman, H. Iefuji, N.R. Kamini, Removal of triglyceride soil from fabrics by a novel lipase from *Cryptococcus* sp. S-2, *Process Biochemistry* **43** (2008) 701-706.
211. X.G. Gaoa, S.G. Cao, K.C. Zhang, Production, properties and application to nonaqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated *Pseudomonas* strain, *Enzyme and Microbial Technology* **27** (2000) 74-82.
212. E. Dalmau, J.L. Montesinos, M. Lotti, C. Casas, Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Enzyme and Microbial Technology* **26** (2000) 657-663.
213. S.F. Lin, Production and stabilization of a solvent-tolerant alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111, *Journal of Fermentation and Bioengineering* **82** (1996) 448-451.
214. B.K.H.L. Boekema, A. Beselin, M. Breuer, B. Hauer, M. Koster, F. Rosenau, K.E. Jaeger, J. Tommassen, Hexadecane and Tween[®] 80 stimulate lipase production in *Burkholderia glumae* by different mechanisms, *Applied and Environmental Microbiology* **73** (2007) 3838-3844.
215. R.V. Muralidhar, R.R. Chirumamila, R. Marchant, P. Nigam, A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources, *Biochemical Engineering Journal* **9** (2001) 17-23.
216. S. Negi, R. Banerjee, Optimization of culture parameters to enhance production of amylase and protease from *Aspergillus awamori* in a single fermentation. *African Journal of Biochemistry Research* **4** (2010) 73-80.
217. Y. Fukushima, H. Itoh, T. Fukase, H. Motai, Stimulation of protease production by *Aspergillus oryzae* with oils in continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* **34** (1991) 586-590.
218. A.P. Kempka, N.L. Lipke, T. Da Luz Fontoura Pinheiro, S. Menoncin, S., H. Treichel, D.M.G. Freire, M. Di Luccio, D. de Oliveira, Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation, *Bioprocess and Biosystems Engineering* **31** (2008) 119-125.
219. Y. Teng, Y. Xu, Culture condition improvement for whole-cell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus chinensis* using statistical method. *Bioresource Technology* **99** (2008) 3900-3907.
220. S. Liu, Y. Fang, M. Lv, S. Wang, L. Chen, Optimization of the production of organic solvent-stable protease by *Bacillus sphaericus* DS11 with response surface methodology, *Bioresource Technology* **101** (2010) 7924-7929.
221. A. Makhzoum, J.S. Knapp, R.K.Owusu, Factor affecting growth and lipase production by *Pseudomonas fluorescens* 2D. *Food Microbiology* **12** (1995) 277-290.
222. B. Gügi, N. Orange, F. Hellio, J.F. Burini, C. Guillou, F. Leriche, J.F. Guespin-Michel, Effect of growth temperature on several exported enzyme activities in the

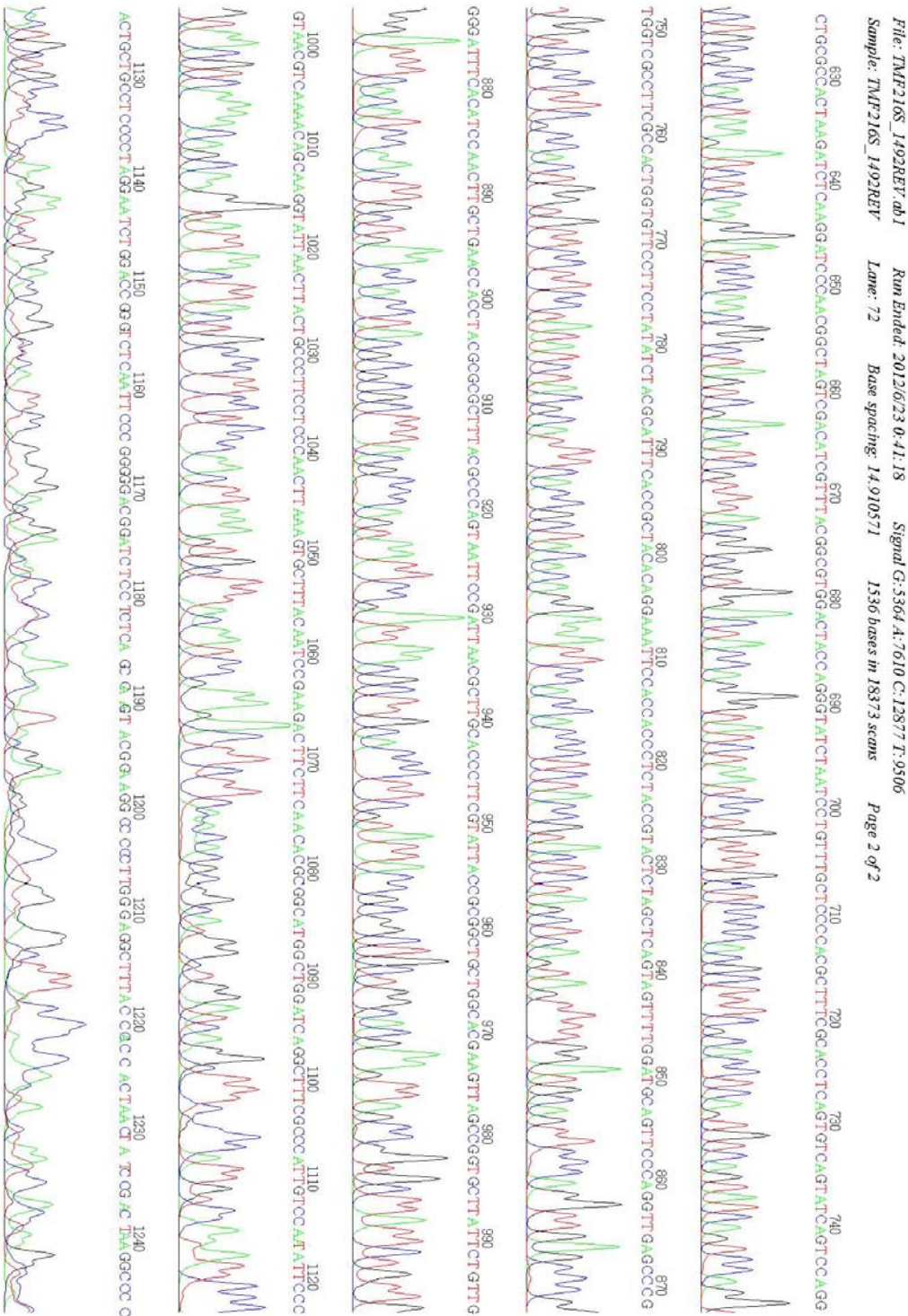
- psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*, Journal of Bacteriology **173** (1991) 3814-3820.
223. E. Sugawara , E.M. Nestorovich, S.M. Bezrukov, H. Nikaido, *Pseudomonas aeruginosa* Porin OprF Exists in Two Different Conformations, Journal of Biological Chemistry **281** (2006) 16220-16229
224. T. Jaouen, E. Dé , S. Chevalier, N. Orange, Pore Size Dependence on Growth Temperature Is a Common Characteristic of the Major Outer Membrane Protein OprF in Psychrotrophic and Mesophilic *Pseudomonas* Species, Applied and Environmental Microbiology **70** (2004) 6665-6669.
225. F.J.F. Burini, B. Gügi, A. Merieau, F.J.F. Guespin-Michel, Lipase and acidic phosphatase from the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fluorescens*: Two enzymes whose synthesis is regulated by the growth temperature, FEMS Microbiology Letters **122** (1994) 13-18.
226. Ü. Açikel, M. Erşan, Y.S. Açikel, Optimization of critical medium components using response surface methodology for lipase production by *Rhizopus delemar*, Food and Bioprocess Processing **88** (2010) 31–39.
227. R. Kumar, S.i Mahajan, A. Kumar, D. Singh, Identification of variables and value optimization for optimum lipase production by *Bacillus pumilus* RK31 using statistical methodology, New Biotechnology **28** (2011) 65-71.
228. J.F.M Burkert, F Maugeri, M.I Rodrigues, Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design, Bioresource Technology **91** (2004) 77–84.

11. Prilozi









Prilog A.

12. Biografija autora

Sanja Ž. Grbavčić, dipl. inž. rođena je 26.09.1980. godine u Beogradu. Osnovnu školu završila je u Beogradu, kao i V beogradsku gimnaziju. Studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu započela je školske 1999/2000. godine, a diplomirala na smeru Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija 2006. godine sa prosečnom ocenom 8,13. Diplomski rad pod nazivom "Optimizacija postupka produkcije lipaza pomoću kvasaca" odbranila je sa ocenom 10,00.

Školske 2006. god. upisala je magistarske studije na Katedri biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta. Odlukom Nastavno-naučnog veća održanog 07.02.2008. prelazi sa magistarskih na doktorske studije Tehnološko-metalurškog fakulteta na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju, i položila 11/11 ispita sa prosečnom ocenom 10,00.

Od juna 2006. godine Sanja Grbavčić je kao istraživač-pripravnik bila zaposlena na projektu BTH1008- „Dodaci hrani dobijeni biotehnoškim putem“ koji je u periodu 2004-2007 godine finansiralo Ministarstvo nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije u okviru „Nacionalnog programa biotehnologije i agroindustrije“. Od aprila 2008. je zaposlena na projektu tehnološkog razvoja TR 20064- „Razvoj biotehnoških postupaka za proizvodnju aditiva i novih formulacija za prehrambenu industriju“ koji finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. Zvanje istraživača saradnika stiče 2009. godine.

Od 01.01.2011. godine je zaposlena kao istraživač saradnik u Inovacionom centru Tehnološko-metalurškog fakulteta na projektu Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije br. III 46010 pod nazivom "Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti".

13. Izjava o autorstvu

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а САЊА ГРБАВЧИЋброј индекса ДС 33/07

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ПРОИЗВОДЊА МИКРОБНИХ ЛИПАЗА И ПРОТЕАЗА КАО
АДИТИВА У ФОРМУЛАЦИЈАМА ДЕТЕРГЕНАТА

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

Потпис докторанда

У Београду, 25.6.2014Сања Грбавчић

14. Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора САЊА ГРБАВЧИЋ
Број индекса ДС 33/07
Студијски програм БИОХЕМИЈСКО ИНЖЕЊЕРСТВО И БИОТЕХНОЛОГИЈА
Наслов рада ПРОИЗВОДЊА МИКРОБНИХ ЛИПАЗА И ПРОТЕАЗА КАО АДИТИВА
У ФОРМУЛАЦИЈАМА ДЕТЕРГЕНТА
Ментор ДР ЗОРИЦА КНЕЖЕВИЋ-ЈУГОВИЋ

Потписани/а САЊА ГРБАВЧИЋ

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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 докторанда

У Београду, 25.6.2014.

Sanja Grbavcic

15. Izjava o korišćenju

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

ПРОИЗВОДЊА МИКРОБНИХ ЛИПАЗА И ПРОТЕАЗА КАО АДИТИВА
У ФОРМУЛАЦИЈАМА ДЕТЕРГЕНАТА

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
- ☒ 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 25.6.2014

Sanja Grbavcic