

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Mina M. Mandić

**Biotehnološki značajni enzimi
iz sojeva roda *Pseudomonas*:
Identifikacija i rekombinantna ekspresija
lakaza i lipaza**

Doktorska disertacija

Beograd, 2021.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Mina M. Mandić

**Biotechnologically relevant enzymes
in strains of *Pseudomonas* genus:
Identification and recombinant expression
of laccases and lipases**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2021.

MENTORI:

dr Sanja Jeremić, viši naučni saradnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu

dr Đorđe Fira, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Sanja Jeremić, viši naučni saradnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu

dr Jasmina Nikodinović-Runić, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,
Univerzitet u Beogradu

dr Đorđe Fira, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

dr Goran Vukotić, naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

DATUM ODBRANE:

Biotehnološki značajni enzimi iz sojeva roda *Pseudomonas*: Identifikacija i rekombinantna ekspresija lakaza i lipaza

REZIME:

Bakterije roda *Pseudomonas* imaju sposobnost produkcije i razgradnje širokog spektra jedinjenja. Cilj ove doktorske teze bio je da se u kolekciji sojeva roda *Pseudomonas* identifikuju i rekombinantno ekspimiraju nove lakaze i lipaze, i evaluira njihov aplikativni potencijal. Sedam sojeva obuhvaćeno je analizom oksidativne i hidrolitičke aktivnosti prema pet različitih supstrata. Kod sojeva *Pseudomonas putida* F6, *P. putida* KT2440 i *P. putida* CA-3, utvrđeno je prisustvo gena koji kodiraju lakaze. Proteini McoCA3, McoKT, Cbp i CopA heterologo su ekspimirani u *E. coli* domaćinu, prečišćeni i okarakterisani. Pokazana je njihova aktivnost u širokom pH i temperaturnom opsegu kao i visoka termostabilnost. Ispitana je i sposobnost enzima da razgrade boje koje se koriste u tekstilnoj industriji, potencijalne zagađivače voda. Čelijski ekstrakt koji je sadržao CopA enzim iz *P. putida* F6 pokazao je najznačajniju aktivnost razgrađivši pet od sedam testiranih boja. Kod sojeva *P. aeruginosa* PAO1 i *P. chlororaphis* B-561, detektovana je lipolitička aktivnost i utvrđen potencijal za biorazgradnju polimera kao što su polihidroksialkanoati srednjeg lanca i polikaprolakton, a degradacioni potencijal soja B-561 potvrđen je i u modelu komposta. Homologo su ekspimirana tri proteina – LipA, PlcB i LipA, ali je zaključeno da nije došlo do njihove sekrecije.

U ovom radu je pokazano da su *Pseudomonas* sojevi dobar izvor biotehnološki značajnih enzima lakaza i lipaza. Rekombinantna ekspresija lakaza dala je funkcionalne enzime pogodne za primenu u razgradnji sintetičkih boja iz otpadnih voda. Za primenu rekombinantnih lipaza u biorazgradnji polimernih materijala neophodna je optimizacija sekrecije, ali divlji sojevi koji ekspimiraju ove enzime su dovoljno dobri biokatalizatori za njihovu razgradnju.

KLJUČNE REČI: lakaze, lipaze, rekombinantna ekspresija, biorazgradnja, bioremedijacija, polimeri, tekstilne boje, *Pseudomonas*

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Molekularna biologija prokariota

UDK BROJ: 579.841.1:577.15: 667.526: 502.174.1

Biotechnologically relevant enzymes in strains of *Pseudomonas* genus: Identification and recombinant expression of laccases and lipases

SUMMARY:

Pseudomonas strains have the ability to produce and degrade a wide range of compounds. The main objective of this thesis was to identify, recombinantly express and characterize novel laccases and lipases from *Pseudomonas* spp. collection, and to evaluate their application potential. Seven strains were analyzed for oxidative and hydrolytic activity towards five different substrates. Genes encoding laccases were detected in *P. putida* F6, *P. putida* KT2440 and *P. putida* CA-3 strains. Proteins McoCA3, McoKT, Cbp and CopA were heterologously expressed in *E. coli*, purified and characterized, exhibiting broad temperature and pH range and high thermal stability. The ability of enzymes to degrade textile dyes was also examined. All enzymes proved to be very efficient in degradation of synthetic dyes, with the CopA enzyme from *P. putida* F6 showing the most significant activity, degrading five out of seven tested dyes. Lipolytic activity was detected in two strains: *P. aeruginosa* PAO1 and *P. chlororaphis* B-561. The potential for biodegradation of polymeric materials such as medium chain length polyhydroxyalkanoates and polycaprolactone was demonstrated, while degradation potential of B-561 was confirmed in the compost system as well. Three lipases were homologously expressed – LipA, PlcB and LipA, but they were not secreted.

This study showed that *Pseudomonas* genus is a good source of biotechnologically relevant enzymes. Recombinant laccase expression yielded enzymes suitable for application in the degradation of persistent synthetic dyes from wastewaters. For the application of recombinant lipases in the biodegradation of polymers, optimization of the secretion is necessary, however wild type strains expressing these enzymes are good enough biocatalysts for biodegradation purpose.

KEY WORDS: laccase, lipase, recombinant expression, biodegradation, bioremediation, polymers, textile dyes, *Pseudomonas*

SCIENTIFIC FIELD: Biology

SCIENTIFIC DISCIPLINE: Molecular biology of prokaryotes

UDC NUMBER: 579.841.1:577.15: 667.526: 502.174.1

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Rod <i>Pseudomonas</i>	1
1.2. Značaj vrsta roda <i>Pseudomonas</i> u biotehnologiji.....	2
1.3. Značaj vrsta roda <i>Pseudomonas</i> u zaštiti životne sredine.....	2
1.4. Lakaze.....	3
1.4.1. Izvori i biološka uloga lakaza.....	3
1.4.2. Struktura lakaza.....	5
1.4.3. Aktivno mesto lakaza i mehanizam enzimske katalize.....	6
1.4.4. Medijatori lakaza.....	7
1.4.5. Supstrati za lakaze.....	8
1.4.6. Biohemijska karakterizacija lakaza.....	8
1.4.7. Značaj enzima lakaza u biotehnologiji i bioremedijaciji.....	9
1.4.8. Primena lakaza u razgradnji boja.....	11
1.5. Lipaze.....	12
1.5.1. Izvori i biološka uloga lipaza.....	12
1.5.2. Struktura lipaza i mehanizam enzimske katalize.....	12
1.5.3. Bakterijske lipaze.....	14
1.5.4. Mehanizmi sekrecije bakterijskih lipaza.....	15
1.5.5. Biohemijska karakterizacija lipaza.....	16
1.5.6. Selektivnost lipaza.....	16
1.5.7. Značaj enzima lipaza u biotehnologiji i bioremedijaciji.....	17
1.5.8. Primena lipaza u biorazgradnji polimera.....	19
1.5.8.1. Biorazgradivi polimeri kao alternativni plastici.....	19
1.5.8.2. PHA polimeri.....	20
1.5.8.3. Biorazgradnja PHA polimera.....	21
1.5.8.4. PCL polimeri.....	22
1.5.8.5. Biorazgradnja PCL polimera.....	23
1.5.8.6. Kompostiranje.....	24
1.5.8.7. Kompostiranje PHA i PCL materijala.....	25
2. CILJEVI	27
2.1 Specifični ciljevi	27
3. MATERIJAL I METODE	29
3.1. Bakterijski sojevi.....	29
3.2. Vektori i plazmidni konstrukti.....	31
3.3. Reagensi i kitovi.....	33
3.4. Kultivacija bakterijskih sojeva.....	34
3.4.1. Hranljive podloge.....	34
3.4.2. Uslovi gajenja bakterijskih sojeva i indukcija ekspresije enzima lakaza i lipaza.....	35
3.4.3. Čuvanje i održavanje bakterijskih kultura.....	35
3.5. Molekularno biološke metode.....	36
3.5.1. Izolacija ukupne DNK iz bakterijskih sojeva.....	36
3.5.2. Izolacija plazmida.....	36
3.5.3. Sintaza DNK u lančanoj reakciji polimeraze (PCR).....	36
3.5.3.1. Umnožavanje gena koji kodiraju lakaze.....	38
3.5.3.2. Umnožavanje gena koji kodiraju lipaze.....	39

3.5.4. Agarozna gel elektroforeza.....	39
3.5.5. Ligacija DNK fragmenata.....	39
3.5.6. Priprema kompetentnih ćelija.....	40
3.5.7. Transformacija kompetentnih ćelija.....	40
3.5.8. Restrikciona analiza plazmida.....	41
3.5.9. Sekvenciranje DNK.....	41
3.6. Bioinformatički alati.....	42
3.6.1. <i>In silico</i> analiza sekvenci za lakaze kod sojeva roda <i>Pseudomonas</i>	42
3.6.2. Analiza sekvence genoma <i>P. putida</i> F6.....	43
3.6.3. Dizajniranje prajmera.....	43
3.6.4. Statistička obrada i analiza podataka.....	45
3.7. Biohemijske i analitičke metode.....	45
3.7.1. Izolacija ukupnih proteina iz bakterijskih kultura.....	45
3.7.2. Određivanje koncentracije ukupnih proteina u uzorcima.....	45
3.7.3. Koncentrovanje ukupnih proteina.....	46
3.7.4. Taloženje proteina amonijum-sulfatom.....	46
3.7.5. Dijaliza: odvajanje proteina od malih molekula.....	47
3.7.6. Razdvajanje proteina poliakrilamidnom gel elektroforezom.....	47
3.7.6.1. Nativna poliakrilamidna gel elektroforeza (PAGE).....	47
3.7.6.2. Denaturišuća SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE).....	48
3.7.7. Hromatografske metode za izolovanje i prečišćavanje proteina.....	48
3.7.7.1. Prečišćavanje lakaze iz soja <i>P. putida</i> F6.....	48
3.7.7.2. Prečišćavanje rekombinantnih lakaza.....	50
3.7.8. N-terminalno sekvenciranje prečišćene proteinske frakcije iz divljeg soja <i>P. putida</i> F6.....	50
3.7.9. Ispitivanje aktivnosti lakaza.....	50
3.7.9.1. Selekcija sojeva sa aktivnošću lakaze u testu sa gvajakolom.....	50
3.7.9.2. Ispitivanje enzimske aktivnosti oksidacijom ABTS supstrata.....	50
3.7.9.3. Biohemijska karakterizacija prečišćenih rekombinantnih lakaza.....	51
3.7.9.4. Zimografsko detektovanje aktivnosti lakaza.....	51
3.7.9.5. Enzimska razgradnja tekstilnih boja lakazom.....	51
3.7.10. Ispitivanje aktivnosti lipaza.....	52
3.7.10.1. Selekcija sojeva sa aktivnošću lipaze na čvrstim podlogama sa rodaminom B.....	52
3.7.10.2. Ispitivanje lipolitičke aktivnosti izolovanih ćelijskih proteina.....	52
3.7.10.3. Esej sa supstratom <i>p</i> -nitrofenil palmitatom (<i>p</i> -NPP).....	52
3.8. Polimeri i biorazgradnja.....	53
3.8.1. Ispitivanje enzimske razgradnje polihidroksialkanoata (PHA) i polikaprolaktona (PCL) na čvrstim podlogama.....	53
3.8.2. Ispitivanje enzimske razgradnje PHA i PCL polimera u puferu.....	53
3.8.3. Ispitivanje enzimske razgradnje PHA i PCL polimera u modelu komposta.....	54
4. REZULTATI.....	55
4.1. Detekcija aktivnosti lakaza kod odabranih sojeva roda <i>Pseudomonas</i> iz laboratorijske kolekcije: oksidacija gvajakola i ABTS esej.....	55
4.2. <i>In silico</i> analiza poznatih sekvenci za lakaze kod sojeva roda <i>Pseudomonas</i>	57
4.3. Umnožavanje gena koji kodiraju lakaze.....	58
4.4. Izolacija i prečišćavanje lakaze iz soja <i>P. putida</i> F6: jonoizmenjivačka hromatografija.....	59
4.5. N-terminalno sekvenciranje izolovanog Lacc1 proteina.....	60

4.6. Sekvenciranje i analiza genoma <i>P. putida</i> F6.....	60
4.7. Umnožavanje <i>cbp</i> i <i>copA</i> gena iz soja <i>P. putida</i> F6.....	62
4.8. Kloniranje umnoženih gena koji kodiraju enzime sa aktivnošću lakaze.....	63
4.9. Ispitivanje enzimске aktivnosti rekombinantnih proteina.....	64
4.10. Karakterizacija rekombinantno eksprimiranih lakaza iz sojeva roda <i>Pseudomonas</i>	65
4.11. Ispitivanje razgradnje tekstilnih boja rekombinantno eksprimiranim lakazama.....	66
4.12. Detekcija lipolitičke aktivnosti kod odabranih <i>Pseudomonas</i> sojeva iz laboratorijske kolekcije u testu sa rodaminom B.....	67
4.13. Ispitivanje potencijala različitih izvora ugljenika za indukciju enzima lipaza kod odabranih sojeva roda <i>Pseudomonas</i>	68
4.14. Ispitivanje enzimске razgradnje PHA i PCL polimera na čvrstim podlogama.....	69
4.15. Ispitivanje enzimске razgradnje PHA i PCL polimera u puferu.....	70
4.16. Ispitivanje biorazgradnje PHA i PCL polimera u modelu komposta.....	71
4.17. Umnožavanje, kloniranje rekombinantna ekspresija gena koji kodiraju lipaze.....	74
4.18. Analiza lipolitičke aktivnosti u esaju sa <i>p</i> -nitrofenil palmitatom.....	75

5. DISKUSIJA

5.1. Lakaze.....	77
5.1.1. Identifikacija lakaza u sojevima roda <i>Pseudomonas</i> : utvrđivanje prisustva enzima i analiza genetičkih determinanti.....	77
5.1.2. Identifikacija lakaza kod soja <i>P. putida</i> F6.....	78
5.1.3. Karakterizacija rekombinantno eksprimiranih lakaza iz sojeva roda <i>Pseudomonas</i>	79
5.1.4. Primena lakaza iz sojeva roda <i>Pseudomonas</i> u razgradnji sintetičkih tekstilnih boja.....	80
5.2. Lipaze.....	81
5.2.1 Identifikacija lipolitičkih enzima u sojevima roda <i>Pseudomonas</i>	81
5.2.2. Enzimska razgradnja PHA i PCL polimera na čvrstim podlogama.....	82
5.2.3. Enzimska razgradnja PHA i PCL polimera u puferu.....	83
5.2.4. Enzimska razgradnja PHA i PCL polimera u modelu komposta.....	84
5.2.5. Rekombinantna ekspresija lipaza iz sojeva <i>P. aeruginosa</i> PAO1 i <i>P. chlororaphis</i> B-561 u homologom domaćinu i analiza enzimске aktivnosti.....	86

6. ZAKLJUČCI.....87

6.1. Lakaze.....	87
6.2. Lipaze.....	88

LITERATURA.....89

PRILOZI.....115

Prilog I.....	115
Prilog II.....	121
Prilog III.....	123
Prilog IV.....	125
Prilog V.....	126

1. UVOD

Kontinuirani rast populacije u svetu doveo je do drastičnog ubrzanja procesa industrijalizacije. Nemilosrdna eksploatacija neobnovljivih prirodnih izvora energije, devastacija šuma, smanjenje raspoloživih poljoprivrednih površina, zagađenje životne sredine i redukcija biodiverziteta samo su neke od štetnih posledica ovog procesa. Krčenje šuma i sagorevanje fosilnih goriva usloveli su promenu klime na globalnom nivou, kao i poremećaj prirodne ravnoteže neophodan za funkcionisanje svih bioloških sistema. Osiromašeno zemljište dodatno je degradirano antropogenim uticajem, akumulacijom ksenobiotika – nusproizvoda industrijskih postrojenja, a povoljni uslovi za život mnogih vrsta narušeni su kako u kopnenim, tako i vodenim ekosistemima.

U današnje vreme glavni izvori toksičnih jedinjenja i zagađivača životne sredine su petrohemijska postrojenja i izlivi, proces podzemne gasifikacije uglja, otpadna ulja, industrijska proizvodnja različitih hemikalija, prekomerna upotreba pesticida – insekticida, herbicida i fungicida u poljoprivredi, kao i zabrinjavajuće količine plastičnog otpada. Samo u poslednjih 50 godina višestruko je uvećana koncentracija zagađivača kao što su: aromatični ugljovodonici – benzen, toluen, etil-benzen i *p*-, *o*- i *m*-ksilen (BTEX, *eng.* Benzene, Ethylbenzene, Toluene, Xylene); policiklični aromatični ugljovodonici (PAHs, *eng.* polycyclic aromatic hydrocarbons) – naftalen, antracen i stiren; hloro- i nitrofenoli, polihlorovani bifenili, organski rastvarači, boje, plastomeri i organohlorovani pesticidi (Kahlon 2016).

Međutim, za određene mikroorganizme klimatske promene i zagađenje životne sredine mogu predstavljati selektivni pritisak i pokrenuti mehanizme koji dovode do adaptacije na novonastale uslove i tolerancije na polutante. Zagađena životna sredina može biti odličan izvor bakterija koje svojim metabolizmom prevode toksične supstance u manje štetne oblike, koji se mogu lakše ukloniti ili vratiti u prirodan ciklus. Traganje za novim vrstama mikroorganizama i novim biotehnoški značajnim enzimima koji bi mogli da odgovaraju potrebama svetskog tržišta, a da pritom zadovolje kriterijume bezbednosti i isplativosti, predstavlja izazov za mnoge naučnike.

1.1. Rod *Pseudomonas*

Vrste roda *Pseudomonas* spadaju među najbolje izučene bakterijske vrste. Identifikovao ih je Migula, krajem 19. veka i opisao kao Gram-negativne, aerobne, štapičaste mikroorganizme koji ne formiraju spore i kreću se upotrebom polarnih flagela (Lysenko 1961). Otpornost na različite biotičke i abiotičke faktore, svojstvo formiranja biofilma, kao i sposobnost da koriste širok spektar organskih jedinjenja kao izvor ugljenika za svoj rast, omogućila je bakterijama roda *Pseudomonas* da budu prisutne svuda, pa i u ekstremnim sredinama. Zbog velike fiziološke raznovrsnosti, odnosno raznolikosti metabolizma, predstavnici ovog roda odupiru se nepovoljnim uslovima i uspešno prilagođavaju različitim izazovima spoljašnje sredine – niskoj ili visokoj temperaturi i vlažnosti, nedovoljnoj snabdevenosti okruženja kiseonikom i hranljivim materijama, kao i dejstvu antibiotika (Novik, Savich et al. 2015). Metabolizam pseudomonada predmet je mnogih istraživanja i često se navodi da ove bakterije poseduju znatno veću metaboličku mrežu u odnosu na druge bakterije sa genomom slične veličine (5,5 Mbp – 6,5 Mbp, ~5400 gena) (Tiso, Wierckx et al. 2014). Vrste roda *Pseudomonas* uglavnom naseljavaju vodu i/ili zemljište. Stanovnici su biljaka, i to kao korisne bakterije koje ih štite od patogenih uticaja ili direktno promovišu njihov rast (PGPR, *eng.* plant growth-promoting rhizobacteria), ili kao komensalne bakterije (Rehm 2008). Osim toga, pripadnici ove veoma rasprostranjene grupe mogu biti biljni, životinjski, ali i humani oportunistički patogeni. Vrsta *P. syringae* i njeni patovari izazivaju bakterioze biljaka, dok je vrsta *P. aeruginosa* izazivač akutnih i hroničnih infekcija koje su najčešće povezane sa kompromitovanim imunološkim sistemom domaćina (Novik, Savich et al. 2015, Park, Shin et al. 2015, Xin et al. 2018).

1.2. Značaj vrsta roda *Pseudomonas* u biotehnologiji

Predstavnici roda *Pseudomonas* imaju sposobnost biosinteze i razgradnje velikog broja različitih jedinjenja. Korisna svojstva pseudomonada mogu se primeniti u različitim biotehnološkim procesima: biotransformaciji, sintezi niskomolekularnih jedinjenja i polimera (Rehm 2008). Biotransformacija je proces koji podrazumeva korišćenje bioloških sistema – celih ćelija mikroorganizama ili njihovih enzima, kao katalizatora u proizvodnji vrednih jedinjenja (Rehm 2008). Biokatalizatori mogu pojednostaviti, ili u nekim slučajevima čak i omogućiti, proces proizvodnje složenih jedinjenja ili njihovih intermedijera (Hegazy, Mohamed et al. 2015). U poređenju sa hemijskim katalizatorima, biokatalizatori pokazuju određene prednosti: visoku efikasnost u blagim, ekološki prihvatljivim uslovima, raznolikost i enantioselektivnost (Fessner and Anthonsen 2009). Svojstvo enantioselektivnosti je naročito važno u procesima organske sinteze, jer se upotrebom biokatalizatora mogu dobiti čisti enantiomeri, čime se unapređuje efikasnost i bezbednost lekova, ali i jedinjenja koja se koriste u poljoprivredi. Mnogi enzimi, kao i cele ćelije pseudomonada koriste se kao biokatalizatori u industrijskim procesima, a primeri ovih enzima koji su trenutno u upotrebi u biotransformaciji su: aminopeptidaze, dehalogenaze, različite dehidrogenaze, monooksigenaze, oksidaze, lipaze (Tiso, Wierckx et al. 2014). Takođe, vrste roda *Pseudomonas* mogu vršiti biotransformaciju različitih aromatičnih jedinjenja. Najbolje proučeni primeri su konverzija toluena u 3-metilcatehol (Wery, Da Silva et al. 2000, Hüsken, Beeftink et al. 2001, Faizal, Ohba et al. 2007) i konverzija stirena u (S)-stiren oksid (Park, Bühler et al. 2007, Blank, Ionidis et al. 2008). Vrste roda *Pseudomonas* koje su u današnje vreme najviše zastupljene u biotehnologiji i industriji su *P. putida*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* i *P. chlororaphis*. Vrsta *P. fluorescens* koristi se za sintezu antibiotika mupirocina koji deluje na meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* i druge Gram-pozitivne bakterije (Wang, Cui et al. 2020). *P. putida* se uglavnom primenjuje u sintezi biosurfaktanata ramnolipida i biopolimera polihidroksialkanoata (PHA). *P. aeruginosa* i *P. chlororaphis* se koriste za sintezu različitih fenazinskih jedinjenja, biokontrolnih agenasa u suzbijanju štetočina u usevima (Jin, Zhou et al. 2015, Zhou, Jiang et al. 2016, Peng, Zhang et al. 2018). Vrsta *P. aeruginosa* je takođe našla svoju primenu u poljoprivredi, tekstilnoj industriji, industriji papira i pulpe, kao i industriji eksploziva. Sojevi ove vrste koriste se za proizvodnju različitih jedinjenja kao što su vanilin, ramnolipidi i biopigmenti. Veoma su dobar izvor biotehnološki značajnih enzima lipaza i proteaza. Enzimi lipaze iz sojeva ove vrste sastavni su deo komercijalnih sredstava za čišćenje i odmašćivanje u domaćinstvima (Anayo, Peter et al. 2019).

1.3. Značaj vrsta roda *Pseudomonas* u zaštiti životne sredine

Mnogi predstavnici roda *Pseudomonas* sposobni su da razgrade aromatična jedinjenja i druge toksične zagađivače iz prirodnih i antropogenih izvora, što ih čini pogodnim za primenu u bioremedijaciji. Bioremedijacija se definiše kao proces u kome mikroorganizmi, biljke ili njihovi enzimi uklanjaju zagađivače iz životne sredine, vraćajući je u prvobitno stanje. Ovaj koncept podrazumeva biorazgradnju, tj. delimičnu ili, veoma retko, potpunu transformaciju toksičnih supstanci koje lako dospevaju u podzemne vode i lance ishrane (Rehm 2008, Gouma, Fragoeiro et al. 2014). Ukoliko su uslovi u datoj sredini povoljni, doći će do prirodne atenuacije, procesa bioremedijacije koji se oslanja na mikroorganizme već prisutne u tom staništu, bez potrebe za spoljašnjom intervencijom. Kada je dostupnost hranljivih materija ograničena, može se pristupiti njihovom dodavanju u zemljište sa ciljem pospešivanja rasta autohtonih populacija. Ovaj proces naziva se biostimulacija. Kada je u zemljište neophodno uvesti mikroorganizme koji nisu karakteristični za datu sredinu, ali imaju sposobnost razgradnje određenog zagađivača, radi se o bioaugmentaciji. Bioaugmentacija ponekad podrazumeva upotrebu genetički modifikovanih organizama.

U okviru roda *Pseudomonas* određene vrste pokazale su se kao posebno pogodne za razgradnju hemijskih zagađivača, odnosno proces bioremedijacije: *P. aeruginosa* (herbicidi i pesticidi), *P. alcaligenes* (policiklični aromatični ugljovodonici), *P. mendocina* (toluen), *P. pseudoalcaligenes* (cijanid), *P. resinovorans* (karbazol), *P. veronii* (prosta aromatična jedinjenja – benzol, indol, piridin i dr.), *P. putida* (toluen, stiren, *m*- i *p*-ksilen) i *P. stutzeri* (hlorovani ugljovodonici) (Inouye, Nakazawa et al. 1987, Weissenfels, Beyer et al. 1990, O'Connor, Buckley et al. 1995, Stoffels, Amann et al. 1998, Shim and Yang 1999, Widada, Nojiri et al. 2002, Nam, Chang et al. 2003, Hong, Nam et al. 2004, Huertas, Luque-Almagro et al. 2006, Rehm 2008, Tao, Shen et al. 2012, Anayo, Peter et al. 2019). Najbolji primeri bakterija koje poseduju kompleksne puteve razgradnje različitih aromatičnih ugljovodonika je soj *P. putida* mt-2 i njegov derivat *P. putida* KT2440 (Jiménez, Miñambres et al. 2002, Loh and Cao 2008). Putevi razgradnje toluena i *m*-ksilena kodirani su genima koji se nalaze na plazmidu pWW0 u *P. putida* mt-2 i detaljno su proučeni (de Lorenzo 2008). Sojevi koji razgrađuju halogenovane i nitrovane aromatične ugljovodonike izolovani su iz kontaminiranih sredina, što ukazuje na njihovu prirodnu sklonost ka razgradnji ovih jedinjenja. Otpornost na rastvarače je još jedna bitna odlika pseudomonada koje se mogu naći u zagađenim sredinama. U jednoj studiji sojevi vrste *P. putida* uspeli su da prežive visoku koncentraciju toluena (10 %, v/w) dodatog u zemljište, a najveću otpornost na ovaj rastvarač pokazao je soj *P. putida* DOT-T1E (Huertas, Duque et al. 1998). Nekoliko studija pokazalo je da različiti *Pseudomonas* sojevi, kao što su *P. putida*, *Pseudomonas* sp. CA1 i *Pseudomonas* sp. CN1 u okviru konzorcijuma sa sojevima *Agrobacterium tumefaciens*, *Nocardia* sp., *Rhizobium* sp. i drugim uspešno razgrađuju herbicid atrazin (Udiković-Kolić, Scott et al. 2012). Pokazano je i da sojevi *P. putida* mogu razgraditi sirovu naftu prisutnu u zagađenom zemljištu (Raghavan and Vivekanandan 1999). Metaboličkim inženjerstvom može se uvećati kapacitet vrsta roda *Pseudomonas* da razgrađuju različite zagađivače (Timmis and Pieper 1999, Ramos, Marqués et al. 2011), ali su posledice otpuštanja genetički modifikovanih organizama u životnu sredinu još uvek nedovoljno ispitane (de Lorenzo 2008).

Vrste roda *Pseudomonas* su među najviše proučenim bakterijskim vrstama koje imaju sposobnost razgradnje plastičnog otpada različitog porekla. Potpuna eliminacija plastičnog materijala podrazumeva razgradnju polimera do monomernih jedinica koje bakterijska ćelija može usvojiti i iskoristiti u svom ćelijskom metabolizmu (Lucas, Bienaime et al. 2008, Singh and Sharma 2008, Kolvenbach, Helbling et al. 2014). Enzimi koji učestvuju u razgradnji plastičnih materijala su najčešće vanćelijski i pripadaju grupi hidrolaza: esteraze, lipaze, kutinaze i poliuretaneze. Ovi enzimi se mogu naći u različitim vrstama roda *Pseudomonas*: *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. protegens*, *P. stutzeri*, a polimeri koje razgrađuju su polietilen (PE), polistiren (PS), poliuretan (PUR), poli(etilen-tereftalat) (PET), poli(etilen-glikol) (PEG) i drugi. Sposobnost razgradnje plastičnih polimera je osobina vrsta roda *Pseudomonas* koja se može primeniti u bioremedijaciji sredina zagađenih ovom vrstom otpada (Wilkes and Aristilde 2017).

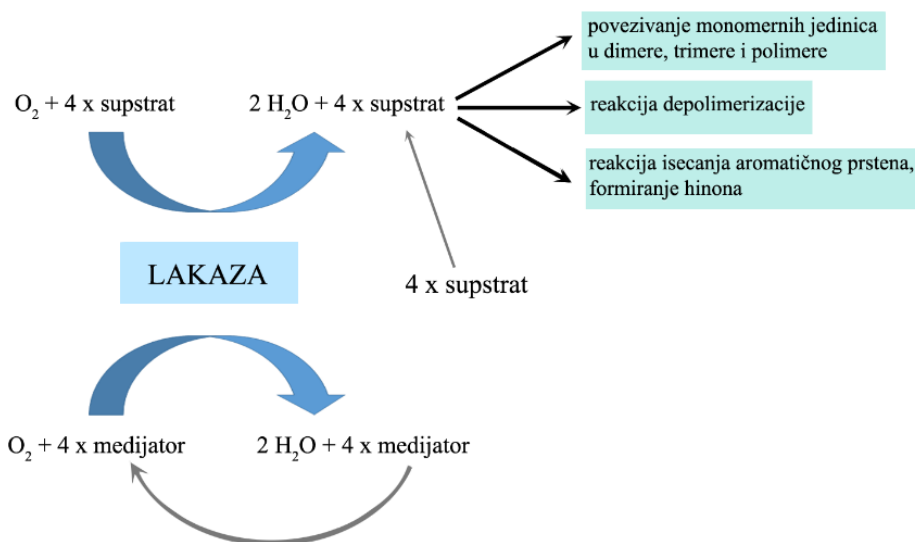
1.4. Lakaze

1.4.1. Izvori i biološka uloga lakaza

Enzim lakaza otkriven je 1883. godine, dok je japanski naučnik Hikorokuro Yoshida izučavao očvršćavanje bleđožute tečnosti (urušiol) na površini lak-drвета *Rhus vernicifera* (*jap. urushi* – lak-drvo) u prisustvu vazduha. Proces očvršćavanja urušiola koji je predstavljao osnovu za dobijanje laka iz ovog drвета, zapravo je bio katalizovan enzimom lakazom. Lakaza je svoje ime (urušiol oksidaza) dobila po ovom procesu, koji se i danas koristi u nekim azijskim zemljama.

Lakaze (*p*-bezenediol:kiseonik oksidoreduktaze, EC 1.10.3.2) su enzimi koji oksiduju širok spektar jedinjenja, kao što su fenoli, aromatični i alifatični amini, redukujući molekularni kiseonik do vode (Bassanini, Ferrandi et al. 2021). Ovi enzimi pripadaju familiji multi-bakar oksidaza, koje se često nazivaju i plave oksidaze. Lakaze se klasifikuju kao metaloenzimi, jer sadrže, u većini slučajeva, četiri bakarna jona koji imaju veoma važnu ulogu u katalitičkoj aktivnosti enzima. Domeni

u okviru ovog enzima koji sadrže bakar nazivaju se kupredoksiniski domeni (Murphy, Lindley et al. 1997). Iako su uglavnom monomeri, ovi enzimi mogu se naći i u formi homodimera, heterodimera, pa čak i multimernih kompleksa (Arregui, Ayala et al. 2019). Kao tipični predstavnici familije multi-bakar oksidaza, lakaze katalizuju reakcije jednoelektronske oksidacije supstrata. Za katalitičku aktivnost ovog enzima nisu neophodni kofaktori ili peroksid (Strong and Claus 2011). Intermedijer koji nastaje u katalitičkoj reakciji podleže neenzimskim reakcijama kuplovanja, što dalje može voditi u tri različita tipa reakcija (Slika 1). Za lakaze su karakteristični slaba specifičnost ka supstratu i variranje u katalitičkoj aktivnosti u zavisnosti od izvora enzima (Yaropolov, Skorobogat'ko et al. 1994). Aktivnost nekih lakaza se upotrebom medijatora može proširiti na supstrate koji inače nisu specifični za ovaj enzim.



Slika 1. Mehanizam reakcije lakaze sa supstratom ili medijatorom. Šema je napravljena po uzoru na šemu iz rada Stronga i Klauza (Strong and Claus 2011)

Lakaze su široko rasprostranjene u prirodi i mogu se naći kod bakterija, gljiva, lišajeva, viših biljaka i insekata (Riva 2006). Biološke uloge lakaza su različite i zavise od izvora enzima, kao i od faze u kojoj se nalazi organizam koji ih proizvodi. Lakaze viših biljaka učestvuju u procesu sinteze lignina, složenog biopolimera koji ulazi u sastav ćelijskog zida, kao i u mehanizmu odgovora biljaka na povrede (Mayer and Staples 2002). Osim lak-drвета, potvrđeno je i da mnoge druge vrste viših biljaka poseduju lakaze. Ovi enzimi se mogu naći u drvetu breskve, jabuke, kruške, javora, topole, ali i u kupusu, repi, krompiru i mnogim drugim vrstama (Sharma, Goel et al. 2007, Madhavi and Lele 2009). Međutim, iako ih mnoge biljne vrste poseduju, ovi enzimi nisu okarakterisani, jer ih je veoma teško identifikovati i prečistiti iz biljnih ekstrakata koji sadrže veliki broj različitih enzima sa oksidativnom aktivnošću (Sharma, Goel et al. 2007).

Fungalne lakaze uključene su u odbranu organizma od stresa, formiranje plodonosnog tela, sporulaciju, biljnu patogenezu, razgradnju lignina i polimerizaciju prekursora melanina (Alcalde 2007, Strong and Claus 2011). Veliki broj gljiva proizvodi lakaze, od kojih su gljive izazivači belog truljenja najpoznatiji producenti. Među bazidiomicetama ističu se vrste *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* i *Coprinus cinereus* koje proizvode različite izoforme ovog enzima (Arregui, Ayala et al. 2019). Kako je uloga fungalnih lakaza uglavnom vezana za razgradnju lignina, većina ovih lakaza pripada vanćelijskim enzimima. Neke gljive poseduju unutarćelijske lakaze, a često se u jednom organizmu mogu naći oba tipa ovog enzima. Osim toga, pronađene su i lakaze koje su ukotvljene u ćelijski zid. Unutarćelijske i periplazmatične lakaze najverovatnije učestvuju u transformaciji niskomolekularnih fenolnih

jedinjenja koja se mogu naći u ćeliji. Smatra se da je lokalizacija enzima uslovljena njenom fiziološkom ulogom i da određuje sa kojim će supstratima enzim imati interakciju (Baldrian 2006).

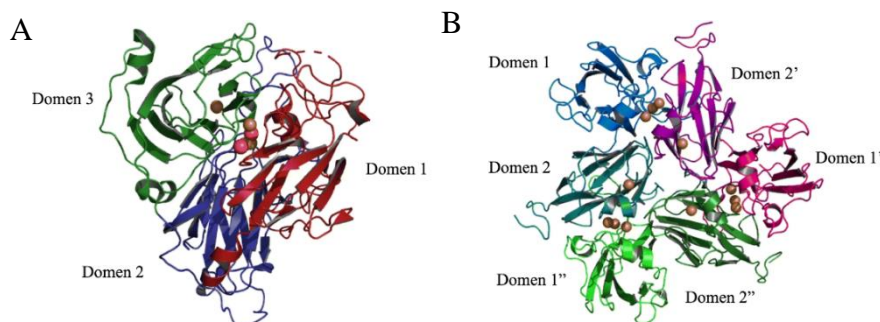
Biološka uloga lakaza kod lišajeva je da obezbede dovoljne količine ugljenika u saprofitnoj fazi, u uslovima nepovoljnim za fotosintezu (Beckett, Ntombela et al. 2015). Lakaze insekata imaju važnu ulogu u očvršćavanju i pigmentaciji kutikule, kao i u imunom sistemu i procesima zarastanja rana (Dittmer and Kanost 2010, Du, Yan et al. 2017). Ovi enzimi pronađeni su kod rodova *Manduca*, *Drosophila*, *Papilo*, *Calliphora*, *Lucilia*, *Oryctes*, *Sacophanga* i drugih (Madhavi and Lele 2009).

Bakterijske lakaze učestvuju u pigmentaciji, morfogenezi, oksidaciji toksina, homeostazi bakra i zaštiti spora od različitih fizičkih i hemijskih faktora (Singh, Bhalla et al. 2011). Prva bakterijska, multimerna lakaza detektovana je u vrsti *Azospirillum lipoferum* (Givaudan, Effosse et al. 1993), sa ulogom u ćelijskoj pigmentaciji i iskorišćavanju fenolnih jedinjenja poreklom iz biljaka (Faure, Bouillant et al. 1994). Usledila je identifikacija lakaza, kao i enzima sa lakaznom aktivnošću iz vrsta rodova *Bacillus*, *Streptomyces*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Yersinia*, *Proteobacterium*, *Marinomonas* i drugih (Arregui, Ayala et al. 2019). Najbolje proučena bakterijska lakaza je CotA enzim iz vrste *B. subtilis* koji je sastavni deo spoljašnjeg omotača endospore i čija je uloga biosinteza braon pigmenta, kao i zaštita spora od UV zračenja i hidrogen peroksida (Driks 2004).

1.4.2. Struktura lakaza

Najbolje proučene lakaze su poreklom iz gljiva. Lakaze gljiva mogu imati monomernu, homodimernu i heterodimernu strukturu, ali postoje i izoenzimi kod kojih oligomerizacijom nastaju multimerni kompleksi. Njihova molekulska masa se kreće od 50 kDa do 140 kDa, u zavisnosti od organizma, mada je tipična fungalna lakaza veličine 60 kDa – 70 kDa. U slučaju homodimernih struktura obe identične jedinice koje čine enzim imaju molekulska masu karakterističnu za monomernu lakazu (Baldrian 2006). Ovakvi slučajevi zabeleženi su kod lakaza iz gljiva koje izazivaju truljenje drveta, kao što su *P. pulmonarius* i *T. villosa*. Fungalne lakaze su obično glikozilovane, što uvećava njihovu masu za 10 % –25 %, kod nekih slučajeva i više od 30 %, a deo koji se sastoji od ugljenih hidrata osigurava enzimu konformacionu stabilnost i štiti ga od proteolize i inaktivacije radikalima (Morozova, Shumakovich et al. 2007, Maestre-Reyna, Liu et al. 2015).

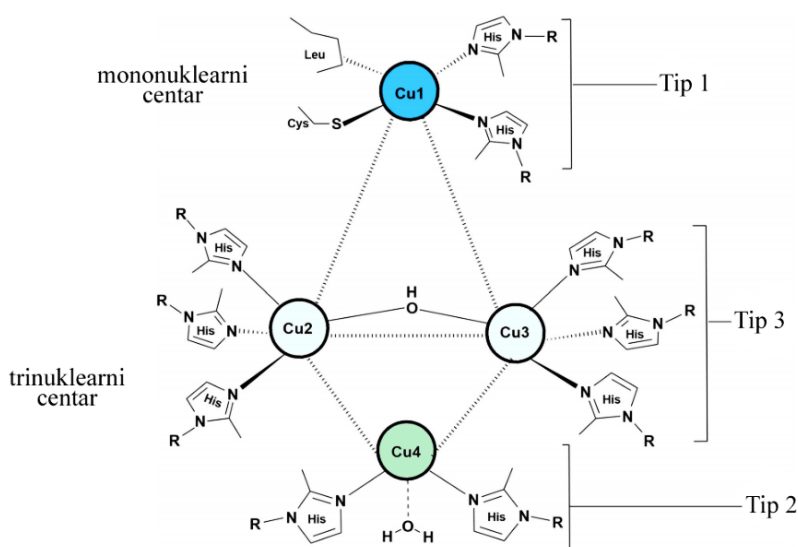
Molekulska masa do sada opisanih bakterijskih lakaza kreće se oko 50 kDa –70 kDa i većina njih pripada monomernim unutarćelijskim enzimima, mada postoje i primeri vanćelijskih enzima – kod vrsta roda *Streptomyces* i kod soja *B. tequilensis* SN4 (Sondhi, Sharma et al. 2014). CotA lakaza iz vrste *B. subtilis* ima tri kupredoksinška domena i slična je CueO enzimu iz *E. coli* koji reguliše homeostazu bakra (Slika 2A) (Roberts, Weichsel et al. 2002, Enguita, Martins et al. 2003). Vrste iz roda *Streptomyces*, *Amycolatopsis* i *Nitrosomonas* poseduju lakaze sa dva kupredoksinška domena i nazivaju se „male lakaze“ (SLACs, eng. small laccases). Smatra se da se nedostatak jednog domena, koji je neophodan za katalitičku aktivnost, nadomešćuje formiranjem strukture homotrimer (Slika 2B) (Arregui, Ayala et al. 2019).



Slika 2. A: Lakaza iz *B. subtilis* sa tri kupredoksinška domena: B: lakaza iz *S. coelicolor* sa dva kupredoksinška domena (homotrimer). Slika je preuzeta iz rada Arregija i saradnika (Arregui, Ayala et al. 2019).

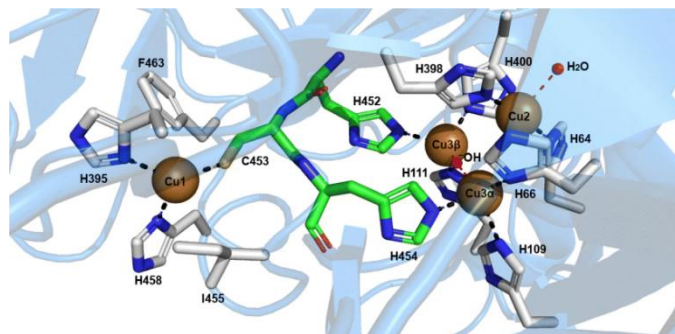
1.4.3. Aktivno mesto lakaza i mehanizam enzimske katalize

Lakaze poseduju četiri domena koji se uglavnom sastoje od aminokiselina histidina koji vezuju bakar (Slika 3). Za potpunu katalitičku aktivnost enzima lakaze, neophodna su sva četiri atoma bakra po jednoj aktivnoj jedinici proteina, a svaki od njih je povezan sa jednim polipeptidnim lancem. Bakarni joni imaju ključnu ulogu u katalitičkom mehanizmu lakaza. Na osnovu elektron paramagnetne rezonantne (EPR) spektroskopije bakarni joni su klasifikovani u tri tipa: Tip 1 (T1), ili plavi, Tip 2 (T2), ili normalni i Tip 3 (T3), ili kuplovani binuklearni bakarni centar (Messerschmidt and Huber 1990, Sundaram, Zhang et al. 1997). Bakarni jon T1 čija je apsorpcija svetlosti na talasnoj dužini od 610 nm, daje lakazama karakterističnu plavu boju. Slični enzimi koji ne poseduju ovaj tip bakarnog jona nazivaju se žute, ili bele lakaze (Chaurasia, Shanker et al. 2013). Bakarni jon T2 se ne može detektovati u vidljivom spektru svetlosti, dok T3 apsorbuje na talasnoj dužini od 330 nm (Arregui, Ayala et al. 2019).



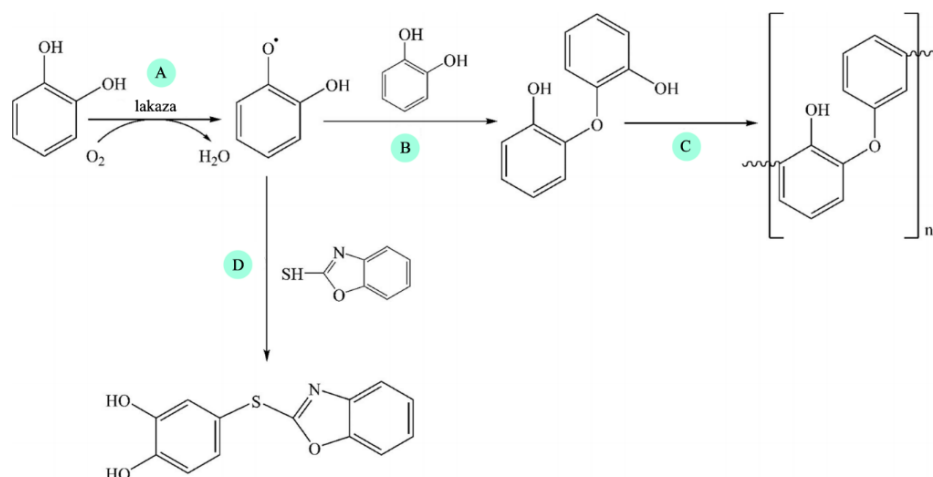
Slika 3. Struktura aktivnog mesta enzima lakaze. Slika je preuzeta iz rada Agravala i saradnika i prerađena (Agrawal, Venkatesh et al. 2018).

T1 jon ima trigonalnu orijentaciju, sa dva očuvana histidina i jednim cisteinom kao ekvatorijalnim ligandima, i aksijalnim ligandom promenljive prirode, obično metioninom u bakterijskim, i leucinom ili fenilalaninom u fungalnim lakazama. T2 bakar je u koordinaciji sa dva histidinska ostatka i vodom, dok je svaki T3 bakar koordinovan sa po tri histidina i premošćujućim hidroksidom (Slika 3). T2 i T3 bakarni centri formiraju trinuklearni centar koji interaguje sa egzogenim ligandom (Cole, Tan et al. 1990). Prostorna organizacija mononuklearnog i trinuklearnog bakarnog centra koji zajedno formiraju aktivno mesto enzima prikazana je na Slici 4.



Slika 4. Prostorna organizacija katalitičkog centra lakaze iz gljive *T. versicolor*. Slika je preuzeta iz rada Aregija i saradnika (Arregui, Ayala et al. 2019).

Kataliza započinje oksidacijom organskog supstrata koji donira jedan elektron primarnom akceptoru, bakarnom jonu T1 u okviru mononuklearnog centra. Supstrat se oksiduje i postaje ariloksiradikal koji dalje podleže neenzimskim reakcijama kuplovanja (Slika 5). Plavi bakarni jon prenosi elektron dalje na kiseonik koji se nalazi u trinuklearnom centru i koji se zatim redukuje u vodu. Nakon ove reakcije supstrat je oksidovan, molekularni kiseonik je redukovan u vodu, a enzim se regeneriše (Chaurasia, Shanker et al. 2013). Lakaze katalizuju četiri pojedinačne jednoelektronske oksidacije supstrata sa četvoroelektronskim redukcijom raskidanjem veze u molekulu kiseonika, u čemu učestvuju sva četiri atoma bakra.



Slika 5. Mehanizam enzimske katalize lakaza. A: Katalizovana oksidacija supstrata i formiranje radikala; B: Oksidativno kuplovanje radikala i formiranje dimera; C: Polimerizacija; D: Kuplovanje sa jedinjenjima koja nisu supstrati za lakazu. Slika je preuzeta iz rada Kudange i saradnika (Kudanga, Nemađziva et al. 2017).

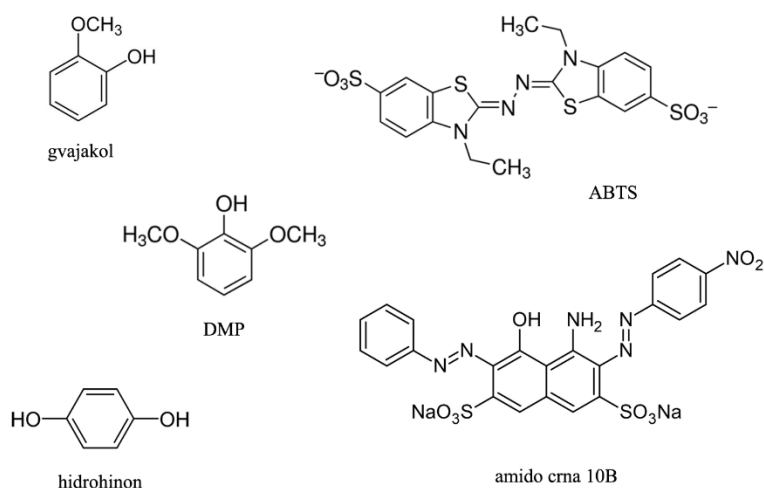
1.4.4. Medijatori lakaza

Efikasnost enzimske oksidacije supstrata lakazama zavisi od razlike između redoks potencijala supstrata i T1 bakarnog centra. U poređenju sa peroksidazama lignina lakaze imaju manji redoks potencijal, pa se dugo smatralo da ovi enzimi mogu katalizovati samo oksidaciju fenolnih jedinjenja u okviru lignina (Wong 2009, Rivera-Hoyos, Morales-Álvarez et al. 2013, Pollegioni, Tonin et al. 2015). Otkriće medijatora proširilo je opseg supstrata za lakaze, naročito supstrata čija veličina ne dozvoljava prilaz aktivnom mestu enzima, kao i supstrata sa visokim redoks potencijalom. Medijatori predstavljaju male molekule koji se lako oksiduju i deluju kao redoks intermedijeri između aktivnog mesta enzima i ne-fenolnog supstrata. Najčešće korišćeni medijatori su sintetička jedinjenja kao što je 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS) i *N*-hidroksi-benzotriazol (HBT), kao i prirodna fenolna jedinjenja siringaldehid (SA) i acetosiringon (AS) (Cañas and Camarero 2010). Različiti medijatori imaju različite mehanizme katalize. Oksidacija supstrata posredovana ABTS-om odvija se reakcijom transfera elektrona, u kojoj se ABTS prvo oksiduje do radikal katjona (ABTS^{•+}), a nakon toga do dikatjona (ABTS²⁺). *N*-heterociklični ili *N*-OH tip medijatora (HBT) nakon oksidacije enzimom lakazom formira *N*-oksiradikal, a potom se deprotonuje i preuzima benzilni vodonik od suptrata. Na sličan način reaguju i fenolni medijatori, s tim da se kao intermedijer formira fenoksiradikal (Hu, Chao et al. 2009, Wong 2009). Efekat medijatora na oksidativnu aktivnost lakaze varira u zavisnosti od enzima, supstrata i tipa formiranog radikala, sposobnosti medijatora da se reciklira i stabilnosti enzima u prisustvu datog medijatora (Morozova, Shumakovich et al. 2007, Wong 2009, Cañas and Camarero 2010, Pogni, Baratto et al. 2015). Nezavisno od katalitičkog mehanizma, glavna prepreka u korišćenju medijatora je njihova cena, kao i činjenica da mogu ispoljiti toksičnost i inaktivirati lakazu (Kurniawati and Nicell 2007, Weng, Liu

et al. 2013). Iako su lakaze koje ne zahtevaju prisustvo medijatora za svoju katalitičku aktivnost povoljnije za upotrebu u industriji, sistemi lakaza/medijator predstavljaju izvodljiva rešenja za industrijske procese. Idealni medijatori su jeftini, efikasni, stabilni, netoksični, ekološki su prihvatljivi, mogu da se recikliraju, uz potencijalnu regulaciju inaktivacije enzima (Morozova, Shumakovich et al. 2007, Kues and Ruhl 2011).

1.4.5. Supstrati za lakaze

Lakaze oksiduju širok spektar supstrata (Baldrian 2006, Reiss, Ihssen et al. 2013). Hidrohinon i kateholi, kao predstavnici jednostavnih difenola su dobri supstrati za većinu lakaza, međutim, 2,6-dimetoksifenol (DMP) i gvajakol su znatno pogodniji (Slika 6) (Yaropolov, Skorobogat'ko et al. 1994). Lakaze mogu katalizovati oksidaciju supstituisanih polifenola, siringaldazina, benzeniola, hidroksi-indola, fenilpropanoide, aromatičnih i alifatičnih amina i drugih jedinjenja. Za razliku od enzima tirozinaza, lakaze ne mogu oksidovati tirozin (Niladevi and Prema 2008, Niladevi, Sheejadevi et al. 2008, Giardina, Faraco et al. 2010, Majeau, Brar et al. 2010, Jeon, Baldrian et al. 2012). Pored ABTS-a, siringaldazin i DMP su najčešće korišćeni supstrati u enzimskim esejima u kojima se dokazuje aktivnost lakaze (Slika 6). Neki od pomenutih supstrata se zbog visokog redoks potencijala ne mogu oksidovati direktno lakazama, već zahtevaju prisustvo ranije pomenutih prirodnih ili sintetičkih redoks medijatora (Morozova, Shumakovich et al. 2007, Cañas and Camarero 2010). Lakaze takođe mogu oksidovati policiklične aromatične ugljovodonike, azo boje, indigo boje, pesticide i druge česte zagađivače životne sredine (Majeau, Brar et al. 2010, Christopher, Yao et al. 2014). Sposobnost lakaza da razgrađuju toksične polutante, ali i da sintetišu netoksična kompleksna aromatična jedinjenja su osnova za primenu ovih enzima u procesu bioremedijacije (Cañas and Camarero 2010).



Slika 6. Supstrati za lakazu

1.4.6. Biohemijska karakterizacija lakaza

Lakaze gljiva su katalitički aktivne prema fenolnim supstratima uglavnom u kiselim sredinama, a optimalno funkcionišu na pH vrednostima u opsegu od 3 do 5,5. Iako su strukture ovih lakaza stabilne na pH 7, ovi enzimi nisu aktivni u neutralnim i alkalnim sredinama (Baldrian 2006, Xu, Wang et al. 2019). Aktivnost bakterijskih lakaza obično je veća u neutralnim u odnosu na alkalne sredine, slično biljnim lakazama. Najčešće su katalitički aktivne na pH vrednostima 3–9 pH optimum ovih lakaza zavisi od supstrata na koje deluju. Kada su u pitanju fenolni supstrati, kao što je

2,3-dimetoksifenol, optimalna pH vrednost za dejstvo lakaza vrsta *B. subtilis*, *B. clausii*, i *S. coelicolor* su pH 7, pH 8 i pH 9, dok za reakciju sa ABTS-om, sva tri enzima zahtevaju nižu vrednost pH, odnosno pH 4 (Dubé, Shareck et al. 2008, Brander, Mikkelsen et al. 2014).

Što se tiče optimalne temperature za aktivnost fungalnih lakaza, ona se može značajno razlikovati u zavisnosti od vrste koja je proizvodi. Temperaturni optimum lakaze izolovane iz vrste *Ganoderma lucidum* je 20 °C – 25 °C, a pokazana je njena stabilnost na temperaturama između 10 °C i 50 °C u trajanju od 4 h (Ko, Leem et al. 2001). Lakaza izolovana iz vrste *Marasmius quercophilus* stabilna je 1 h na 60 °C, a njena katalitička aktivnost znatno je uvećana prethodnom inkubacijom enzima na 40 °C i 50 °C (Farnet, Criquet et al. 2000). Vreme poluživota lakaze iz gljive *Cerrena unicolor* iznosi 10 min na 80 °C (Songulashvili, Jimenez-Tobón et al. 2012). Lakaze poreklom iz bakterija aktivne su u širokom temperaturnom opsegu (30 °C – 85 °C), sa temperaturnim optimumom između 45 °C i 60 °C. Većina bakterijskih lakaza je stabilna na visokim temperaturama. Vreme poluživota lakaze iz vrste *B. subtilis* iznosi 250 min na temperaturi od 70 °C, a kod vrste *S. viridochromeogenes* 30 min na 80 °C. Maksimalna temperatura za aktivnost lakaze iz *B. tequilensis* SN4 je 85 °C na pH 8 (Jimenez-Juarez, Roman-Miranda et al. 2005, Brander, Mikkelsen et al. 2014, Sondhi, Sharma et al. 2014, Trubitsina, Tishchenko et al. 2015).

Bakterijske lakaze otporne su na visoke koncentracije soli i mogu biti aktivne čak i na koncentraciji od 1 M NaCl, kao što je to slučaj kod vrsta *Marinomonas mediterranea* i *B. halodurans* (Ruijssenaars and Hartmans 2004, Jimenez-Juarez, Roman-Miranda et al. 2005). Neke bakterijske lakaze pokazale su visoku toleranciju na različite organske rastvarače, uključujući etanol, metanol, dimetilformamid, acetonitril, aceton i dimetilsulfoksid, kao što je to primećeno kod lakaze bakterijskog soja *B. pumilus* W3 koja zadržava više od 50 % enzimske aktivnosti u mešavinama organskih rastvarača i vode (Guan, Luo et al. 2018).

Uopšteno govoreći, većina lakaza se ponaša slično u prisustvu nekoliko inhibitora enzimske aktivnosti. Azid, tioglikolna kiselina (TGA) i dietilditiokarbaminska kiselina (DETCA) inhibiraju aktivnost lakaze, dok etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA) nepovoljno utiče na njenu aktivnost, ali ne značajno. Mali anjoni halidi (isključujući jodide), azid, cijanid i hidroksid vezuju se za T1 i T2 bakar, što za posledicu ima prekid transfera elektrona i inhibiciju aktivnosti enzima. Drugi inhibitori uključuju jone metala (Hg^{+2}), masne kiseline, sulfhidrilne agense, hidroksiglicin, kojičnu kiselinu, kao i kvaternarna amonijum jedinjenja. Anjonski i katjonski surfaktanti kao što su natrijum dodecil sulfat (SDS, *eng.* sodium dodecyl sulfate) i cetrimonijum bromid (CTAB) pozitivno utiču na aktivnost lakaza, dok nenaelektrisani surfaktanti kao Tween-80 i Tween-20 ne menjaju aktivnost ovih enzima (Dalfard, Khajeh et al. 2006, Sondhi, Sharma et al. 2014). Divalentni katjoni Ca^{+2} , Cu^{+2} , Ni^{+2} , Co^{+2} i Mn^{+2} u većini slučajeva značajno povećavaju aktivnost lakaza, jer modifikuju fizičko stanje supstrata, što direktno utiče na brzinu enzimske reakcije (Mongkolthanasarak, Tongbopit et al. 2012, Sondhi, Sharma et al. 2014, Muthukumarasamy, Jackson et al. 2015).

1.4.7. Značaj enzima lakaza u biotehnologiji i bioremedijaciji

Lakaze su, zbog svojih osobina, veoma značajni enzimi koji se primenjuju u mnogim granama industrije – tekstilnoj, prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj, industriji papira i pulpe, a učestvuju i u procesu delignifikacije lignocelulozne biomase, organskoj sintezi i proizvodnji biogoriva, kao i u bioremedijaciji (Yang, Li et al. 2017). Za katalitičku aktivnost ne zahtevaju prisustvo skupih kofaktora, već samo kiseonik koji redukuju do vode, te nema toksičnih sporednih proizvoda reakcije (Strong and Claus 2011). Postoji više od 15 komercijalnih proizvoda baziranih na lakazama koji se koriste u tekstilnoj, prehrambenoj i industriji papira (Rodríguez-Couto 2019). U prehrambenoj industriji lakaze se koriste se za otklanjanje polifenola, proizvoda spontane oksidacije u vinu, kao i za poboljšanje kvaliteta testa u pekarskim proizvodima (Si 1995, Durán, Rosa et al. 2002). Lakaze se primenjuju i kao katalizatori u proizvodnji lekova i kao sastojci nekih kozmetičkih proizvoda (Kunamneni, Plou et al. 2008).

Većina lakaza koja je danas u upotrebi u industrijskim procesima poreklom je iz gljiva. Međutim, nedostatak fungalnih lakaza je njihov nedovoljan prinos u domaćinima koji ih proizvode. Količine proizvedenog enzima ne mogu da isprate potrebe industrije, jer gljive vrlo često proizvode nekoliko izoenzima, pa je potrebno uložiti dodatne napore za prečišćavanje željene forme lakaze (Arregui, Ayala et al. 2019). S obzirom da su fungalne lakaze glikozilovani enzimi, heterologa ekspresija je otežana zbog nedostatka neophodne posttranslacione modifikacije proteina u domaćinima poput *E. coli* (Arregui, Ayala et al. 2019). Njihova optimalna aktivnost u kiselim uslovima predstavlja još jednu prepreku za njihovu širu primenu.

U poslednje vreme, upotreba bakterijskih lakaza je u velikom porastu, zbog izuzetnih svojstava koja ih čine pogodnijim za upotrebu u različitim biotehnološkim i industrijskim procesima u poređenju sa fungalnim lakazama. Najznačajnija svojstva bakterijskih lakaza koja im omogućavaju široku primenu su stabilnost u širokom pH i temperaturnom opsegu, otpornost na većinu najčešće korišćenih organskih rastvarača i stabilnost pri visokim koncentracijama soli (Guan, Luo et al. 2018). Takođe, upotreba bakterijskih lakaza je ekonomičnija zbog šireg spektra supstrata, proizvodnje veće količine enzima u kraćem vremenskom periodu i jednostavnijeg procesa kloniranja, rekombinantne ekspresije i dirigovane evolucije (Fernandes, da Silveira et al. 2014, Prins, Kleinsmidt et al. 2015). Bakterijske lakaze koriste se u izbeljivanju pulpe i papira, obezbojavanju i razgradnji tekstilnih boja iz efluenta tekstilne industrije i kao biosenzori (Mathews, Smithson et al. 2016). Lakaza iz soja *B. tequilensis* SN4 koristi se za delignifikaciju i izbeljivanje pulpe u prisustvu HBT medijatora (Sondhi, Sharma et al. 2015). Prečišćena CotA lakaza iz *B. subtilis* 168 imobilisana na elektrodi u okviru biosenzora pokazala je visoku stabilnost i elektrokatalitičku aktivnost za kvantitativnu detekciju hidrohina (Zhang, Lv et al. 2020).

Policiklični aromatični ugljovodonici (PAH) spadaju u perzistentne organske zagađivače životne sredine. Ova jedinjenja se ne razgrađuju, nerastvorna su u vodi i akumuliraju se u zemljištu i sedimentima, što otežava proces bioremedijacije (Ihssen, Reiss et al. 2015). Do danas je prijavljen veoma mali broj bakterijskih vrsta koje su sposobne da razgrade ove ksenobiotike (Zeng, Lin et al. 2011, Menaka, Lone et al. 2015). Smatra se da enzim lakaza pretvara PAH jedinjenja u hinone, a potom u ugljen-dioksid. Ukoliko je prisutan HBT medijator, acenaftilen se pretvara u 1,2-acenaftalendion i 1,8-naftalnu kiselinu (Madhavi and Lele 2009). Prečišćena lakaza iz *Bacillus* sp. PK4 pretvara 92 % bisfenol A (BPA) u 4-etil-2-metoksifenol kao krajnji proizvod (Rajeswari and Bhuvanewari 2016). *B. subtilis* lakaza razgrađuje 4-dihlorofenol. Ovaj način uklanjanja hlorofenola je ekonomski i ekološki vrlo pogodan i visoko efikasan biohemijski proces (Menaka, Lone et al. 2015). Enzim lakaza iz *S. cyaneus* sposoban je da oksiduje tri mikropolutanta – bisfenol A, lekove diklofenak i mefenaminsku kiselinu u kiseloj sredini (Margot, Bennati-Granier et al. 2013).

S obzirom da je prisustvo lakaza u bakterijama otkriveno realativno skoro, još uvek se traže novi izvori ovih veoma korisnih enzima. Nekoliko bakterijskih lakaza je rekombinantno ekspimirano u heterologom domaćinu i detaljno okarakterisano – CotA lakaza iz *B. subtilis*, kao i lakaze iz *B. coagulans*, *B. clausii* and *B. licheniformis*, ali i lakaze iz *Streptomyces* vrsta – *S. coelicolor*, *S. cyaneus*, *S. bikiniensis* i *S. ipomoea* (Martins, Soares et al. 2002, Arias, Arenas et al. 2003, Eugenio, Hrenández et al. 2011, Sherif, Waung et al. 2013, Ihssen, Reiss et al. 2015, Kandasamy and Uthandi 2021). Kako poseduju veliki potencijal za primenu u različitim oblastima industrijske proizvodnje i zaštite životne sredine, unapređenje performansi ovih enzima je od velikog značaja. Na primer, imobilizacija lakaza je vrlo korisna tehnika koja smanjuje pokretljivost enzima, povećava njegovu stabilnost i otpornost i omogućava njegovu kontinuiranu upotrebu u biokatalizi. Performanse bakterijskih lakaza koje su u upotrebi u biotehnološkim procesima mogu se poboljšati različitim strategijama koje podrazumevaju upotrebu genetičkog inženjerstva (kloniranje u odgovarajućim heterologim domaćinima za proizvodnju enzima u dovoljnim količinama, optimizacija ekspresije), proteinskog inženjerstva (poboljšanje kinetike enzima) i dirigovane evolucije (poboljšanje aktivnosti i stabilnosti enzima). U sklopu bioremedijacije najviše se proučavaju načini za efikasno uklanjanje toksičnih nerazgradivih jedinjenja u otpadnim vodama industrijskih postrojenja, ali i zemljištu.

Istraživanja koja uključuju bakterijske lakaze, enzime izvanrednih karakteristika, otvaraju mogućnosti za proširenje i komercijalizaciju njihove upotrebe u budućnosti.

1.4.8. Primena lakaza u razgradnji boja

Do polovine 19. veka sve korišćene boje bile su prirodnog porekla, iz biljaka, insekata ili školjki. Nakon otkrića prve sintetičke boje, započela je proizvodnja boja na velikoj skali. Automatizacijom ovog procesa tekstilna industrija i industrija boja doživele su procvat (Hunger 2003). Tekstilna industrija obuhvata nekoliko proizvodnih procesa: tretiranje sirovih materijala, proizvodnju tekstila, proizvodnju odeće i završnu obradu i bojenje. Procesi u okviru završne obrade – izbeljivanje, bojenje i štampanje, kao i širok spektar boja i pomoćnih sredstava koji se koriste, glavni su izvor zagađivača u otpadnim vodama ove industrije (Lacasse and Baumann 2003, Savin and Butnaru 2008). Hemijski reagensi koji se koriste u obradi tekstila su vrlo različiti u pogledu sastava – od neorganskih i organskih jedinjenja, pa sve do polimera, i zavise od prirode početnih sirovina i tipa finalnog proizvoda (Mishra and Tripathy 1993). Tokom procesa bojenja do 60 % početne količine boje ili njenih derivata ne vezuje se za tekstil i ispušta se kao efluent (Hessel, Allegre et al. 2007). Prisustvo boja u vodenom ekosistemu smanjuje prodiranje sunčevih zraka u dublje slojeve, čime se onemogućuje fotosinteza, smanjuje kvalitet vode i rastvorljivost gasova. Boje kao zagađivači imaju toksični, kancerogeni i genotoksični efekat. Tekstilna industrija predstavlja jedan od glavnih izvora ozbiljnih ekoloških problema širom sveta, te se u zakonima Evropske unije koji se tiču industrijskih otpadnih voda neprestano donose nove uredbe koje obavezuju industriju na tretman otpadne vode (Vandevivere, Bianchi et al. 1998).

Boje se sastoje od hromofore (funkcionalne grupe odgovorne za boju) i elektron-privlačnih ili elektron-donorskih supstituentata koji se nazivaju auksohromi, koji pojačavaju boje i doprinose njihovoj rastvorljivosti u vodi. Neki auksohromi pojačavaju afinitet boje za vezivanje za tekstil. Najvažnije hromofore su azo, karbonil, metinska, nitro i hinoidna grupa, a auksohromne grupe su hidroksilna, sulfonatna, karboksilna i amino grupa. Na osnovu prisutne hromofore boje su klasifikovane kao azo, antrahinonske, trifenilmetanske, azinske, ksantenske, nitro i nitrozo boje, koje su uglavnom rastvorne u vodi. Metode za uklanjanje ovih ksenobiotika iz efluenta su različite – fizičke (adsorpcija na različite nosače, membranska filtracija), hemijske (koagulacija, fotohemijska oksidacija) i biološke (dejstvo mikroorganizama). Najefikasnija metoda za uklanjanje ksenobiotika iz boja je biološka metoda.

Dve grupe mikroorganizama sa velikim potencijalom za tretman obojenih voda su bakterije i gljive. Razni sojevi gljiva, među kojima najviše gljive koje izazivaju truljenje drveta, kao i njihovi enzimi, detaljno su proučeni u ovom pogledu. Gljive izazivači belog truljenja korišćene su za uklanjanje boja, međutim, postoje važna ograničenja njihove upotrebe. Neophodan je dodatak nutrijenata da bi se obezbedio njihov optimalan rast, a proizvodnja enzima nije konstatna. Takođe, različiti faktori poput koncentracije zagađivača (boje), početnog pH i temperature efluenta kao i prisustvo inhibitora koji se mogu naći u efluentima utiču na proces obezbojavanja (Durán and Esposito 2000). Da bi se prevazišli ovi problemi, istraživanja su preorijentisana na samostalne enzime, čijim se tretmanom toksična jedinjenja transformišu u manje toksične proizvode.

Kako je poznato da bakterijske lakaze mogu da razgrade različita organska jedinjenja, krenulo se u izolaciju aerobnih bakterijskih vrsta sposobnih za razgradnju različitih boja. Pokazano je da enzimi lakaze razgrađuju sintetičke boje različitih hemijskih struktura. Efikasnost razgradnje lakazom zavisi od vrste iz koje je enzim izolovan, redoks potencijala, specifičnosti za određeni supstrat, ali i od biorazgradivosti same boje. Bakterijske lakaze, uz prisustvo medijatora, imaju veliki potencijal za razgradnju različitih tekstilnih boja i pretvaranja ovih boja u manje toksična jedinjenja. (Durán and Esposito 2000, Rai, Bhattacharyya et al. 2005, Legerská, Chmelová et al. 2016). U prisustvu medijatora, lakaze bakterija iz rodova *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* i *Geobacillus* pokazale su se kao veoma efikasne u razgradnji boja otpornih na abiotičke (pH, temperatura, svetlost) i biotičke faktore (mikroorganizmi). Mogu da razgrađuju tekstilne boje poput Kongo crvene i bromfenol plave,

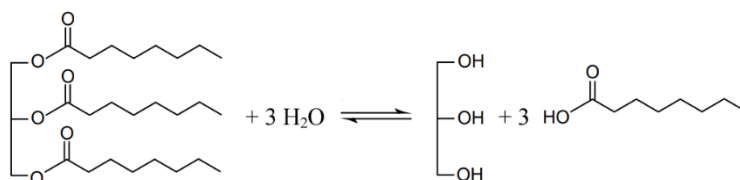
antrahinonske boje remazol brilijant plave R, trifenilmetan boje – malahit zelene, brilijant zelene i anilin plave, azo boje Sudan oranž G i metil oranž i druge (Chauhan, Goradia et al. 2017).

Strože regulative koje se odnose na otpadne vode iz tekstilne industrije podstiču razvoj novih tehnologija za njihovu bioremedijaciju, te je sasvim očekivano da u narednom periodu bakterijske lakaze dobiju širu primenu u ovoj oblasti.

1.5. Lipaze

1.5.1. Izvori i biološka uloga lipaza

Enzimi lipaze (triacilglicerol acil-hidrolaze, E.C. 3.1.1.3) katalizuju hidrolizu karboksilne estarske veze triacilglicerola pri čemu nastaju slobodne masne kiseline i glicerol (Slika 7). Ovi enzimi deluju na širok spektar supstrata. Supstrati za lipaze su nerastvorni u vodi, pa se enzimske reakcije odvijaju u dvofaznom sistemu, na granici između faza. Dvofazni sistem nastaje zbog nemešljivosti organske faze koja sadrži hidrofobni supstrat i vode unutar koje se ova organska faza nalazi (Casas-Godoy, Duquesne et al. 2012).



Slika 7. Hidroliza triacilglicerola na glicerol i masne kiseline. Slika je preuzeta iz rada Jegera i Rica (Jaeger and Reetz 1998)

U termodinamički povoljnim uslovima (smanjena aktivnost vode – a_w , *eng.* water activity) lipaze mogu katalizovati i veliki broj različitih reakcija sinteze, koje se mogu podeliti na dva osnovna tipa – reakcije esterifikacije i transesterifikacije (Kapoor and Gupta 2012). Esterifikacija je reakcija u kojoj se, pod dejstvom enzima, masne kiseline povezuju kovalentnom vezom sa alkoholom formirajući estar, uz oslobađanje jednog molekula vode. Reakcija transesterifikacije podrazumeva katalizovanu reakciju između triacilglicerola i alkohola, u kojoj nastaju estri i glicerol. Pojedine lipaze mogu ispoljiti katalitičku aktivnost karakterističnu za enzime fosfolipaze, lizofosfolipaze, holesterol esteraze, kutinaze ili amidaze (Bora, Gohain et al. 2013). Uz to, ovi enzimi mogu katalizovati reakcije Majklove adicije (Ghasemi, Heidary et al. 2014) i epoksidacije (Aouf, Durand et al. 2014).

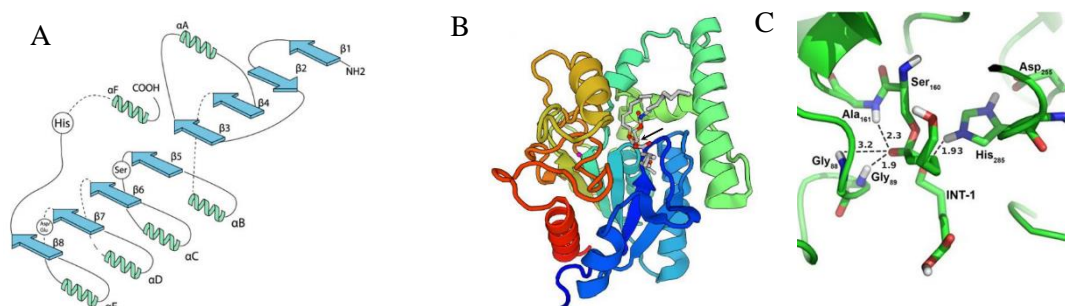
Osnovna biološka uloga lipaza je razgradnja masti. Ovi enzimi su široko rasprostranjeni među životinjama, biljkama i mikroorganizmima. Kod životinja lipaze predstavljaju ključne komponente lipidnog i lipoproteinskog metabolizma (Zechner, Zimmermann et al. 2012), dok u semenu biljaka hidrolizuju triacilglicerole koji služe kao izvor energije (Chapman, Dyer et al. 2012). Mikroorganizmi koriste vanćelijske lipaze da hidrolizuju triacilglicerole prisutne u spoljašnjoj sredini a proizvode razgradnje koriste u svom metabolizmu.

1.5.2. Struktura lipaza i mehanizam enzimske katalize

Prvi predstavnici lipaza čije su strukture razrešene devedesetih godina prošlog veka su lipaza iz gljive *Rhizomucor miehei* (Brady, Brzozowski et al. 1990) i humana pankreatična lipaza (Winkler, d'Arcy et al. 1990). Danas se u bazama podataka može naći skoro 200 trodimenzionalnih struktura ovih enzima iz oko 50 različitih organizama, jer mnoge lipaze mogu zauzimati nekoliko struktura, u

zavisnosti od konformacije ili supstrata na koji deluju. Pored lipaza iz gljiva *Candida antarctica*, *C. rugosa*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium camemberti*, *P. cyclopium*, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, u bazama podataka se mogu pronaći i strukture lipaza iz bakterija *Bacillus sp.*, *B. subtilis*, *Pseudomonas sp.*, *P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *B. glumae*, *Chromobacterium viscosum*, *G. thermocatenulatus*, *Photobacterium sp.*, *S. marcescens*, *Staphylococcus hyicus*, *S. exfoliatus* i druge (Casas-Godoy, Duquesne et al. 2012).

Enzime lipaze odlikuje prisustvo α/β hidrolaznog motiva koji je veoma rasprostranjen kod hidrolitičkih enzima i koji se može naći i u srodnim enzimima (karboksilesteraze, kutinaze, tioesteraze). α/β hidrolazna struktura sastoji se od centralne β -ploče i osam β -lanaca, od kojih je jedan suprotno orijentisan u odnosu na ostale (Slika 8A). Lanci $\beta 3$ – $\beta 8$ su povezani α -heliksima, koji su postavljeni bočno u odnosu na centralnu β ploču. Varijacije u ovom strukturnom lipaznom domenu između različitih vrsta potiču od različitog broja α -heliksa, β -ploča, od zakrivljenosti β -ploče, dužine petlji i arhitekture mesta za koje se vezuje supstrat (Pleiss, Fischer et al. 1998, Jaeger, Dijkstra et al. 1999). Lipaze takođe karakteriše prisustvo disulfidnih mostova koji su odgovorni za stabilnost enzima i njegovu katalitičku aktivnost (Le, Joo et al. 2012, Yu and Huang 2014). Mnoge lipaze poseduju i G-X1-S-X 2-G konsenzus sekvencu.

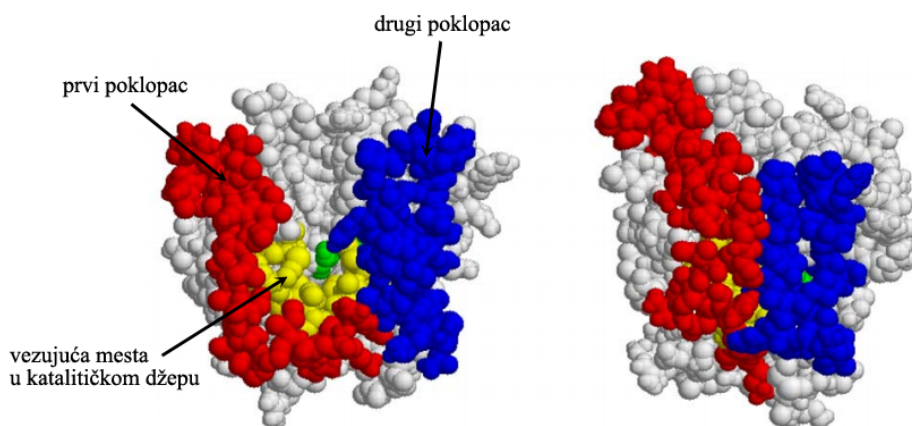


Slika 8. A: 3D α/β hidrolazna struktura karakteristična za lipaze; α -heliksi predstavljeni su spiralama, a β -ploče strelicama. Aminokiselinski ostaci katalitičke trijade prikazani su u krugovima. Slika je preuzeta iz rada Casas-Godoy i saradnika (Casas-Godoy, Duquesne et al. 2012); B: 3D struktura lipaze iz soja *P. aeruginosa* PAO1, strelicom je obeležena katalitička trijada. Slika je preuzeta iz rada Berdieva i saradnika (Berdiev, Ziyavitdinov et al. 2019); C: Katalitička trijada (Ser-Asp-His) i oksianjonsko udubljenje aktivnog mesta lipaze iz vrste *Archaeoglobus fulgidus* u kompleksu sa intermedijerom supstrata. Slika je preuzeta iz rada Alemide i saradnika (Almeida, Figueiredo et al. 2019)

Još jedna karakteristika enzima lipaza je prisustvo visoko očuvane kiselinsko-bazno-nukleofilne katalitičke trijade u okviru aktivnog mesta enzima (Slika 8B). Katalitičku trijadu čine aminokiseline serin (Ser, nukleofil), aspartat/glutamat (Asp/Glu, kiselina) i histidin (His, baza. Pored Ser-Asp/Glu-His aminokiselina, još dve aminokiseline u okviru aktivnog mesta lipaza učestvuju u formiranju kompleksa sa supstratom. Ove dve aminokiseline formiraju takozvano oksianjonsko udubljenje i vodoničnim vezama stabilizuju tetraedarni intermedijer supstrata (Slika 8C) (Pleiss, Fischer et al. 2000, Kumari and Gupta 2013).

Razrešenje prvih struktura lipaza omogućilo je identifikaciju još jednog mobilnog subdomena karakterističnog za lipaze, takozvanog poklopca, koji konformacionim promenama reguliše pristup molekula supstrata aktivnom mestu enzima (Anobom, Pinheiro et al. 2014). Poklopac čini amfifilni peptidni lanac, koji može biti različitog sastava, oblika i dužine u zavisnosti od porekla enzima. Kod nekih autora navodi se da je poklopac odgovaran za zaklanjanje aktivnog mesta enzima kada se on nalazi u vodenom rastvoru i da onemogućava prilaz supstrata. Smatra se da ova struktura utiče na aktivaciju enzima lipaze na granici između hidrofilne i hidrofobne faze, kao i na njegovu selektivnost (Cherukuvada, Seshasayee et al. 2005, Nagarajan 2012, Anobom, Pinheiro et al. 2014, Borrelli and Trono 2015). Međutim, neke lipaze, kao što su lipaze iz vrsta *B. subtilis*, *B. pumilis*, *B. licheniformis* ne poseduju strukturu poklopca pa tako ne podležu aktivaciji na granici faza (Mala and Takeuchi

2008), dok druge, kao lipaza iz vrste *P. aeruginosa* poseduju čak dva poklopca, od kojih jedan predstavlja okidač za aktivnost drugog poklopca (Slika 9) (Cherukuvada, Seshasayee et al. 2005).



Slika 9. Simulacija 3D strukture poklopca kod lipaze iz vrste *P. aeruginosa*. Levo: Konformacija sa otvorenim poklopcem i otkrivenim šupljinom koja predstavlja aktivno mesto enzima. Desno: Konformacija sa zatvorenim poklopcem, u kojoj je zona za pristup supstrata umanjena gotovo 100 %. Slika je preuzeta iz rada Čerukuvade i saradnika (Cherukuvada, Seshasayee et al. 2005).

Aktivno mesto enzima za koje se vezuje supstrat nalazi se unutar džepa, na vrhu centralne β -ploče proteina. Na granicama džepa nalaze se hidrofobni aminokiselinski ostaci koji interaguju sa hidrofobnim supstratom. Razlike u vezujućim mestima lipaza uočene su u zoni hidrofobnih interakcija, u obliku, veličini i dubini džepa, kao i u fizičko-hemijskim karakteristikama aminokiselina u njegovom sastavu (Pleiss, Fischer et al. 1998).

Katalitički mehanizam enzima lipaza započinje reakcijom acilacije. U prvom koraku vrši se transfer protona između aminokiselinskih ostataka aspartata, histidina i serina u katalitičkoj trijadi, čime se vrši aktivacija katalitičkog serina. Posledica ove reakcije je povećanje nukleofilnosti hidroksilne grupa serina, koja zatim vrši nukleofilni napad na karbonilnu grupu supstrata. Formira se tetraedarni intermedijer sa negativno naelektrisanim kiseonikom karbonilne grupe. Oksianjonsko udubljenje smanjuje energiju aktivacije intermedijera formiranjem bar dve vodonične veze sa njim. Sledi reakcija deacilacije, u kojoj se oslobađa finalni proizvod i regeneriše enzim. Nukleofilni napad vrši molekul vode (u reakciji hidrolize) ili alkohol (u reakciji alkoholize) (Casas-Godoy, Duquesne et al. 2012).

1.5.3. Bakterijske lipaze

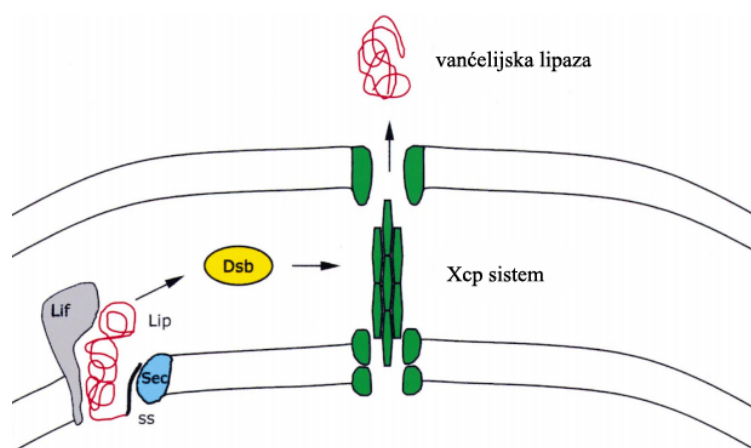
Lipolitička aktivnost mikroorganizama po prvi put je opisana u radu danskog Nobelovca Kristijana Eijkmana, pre više od jednog veka. Eijkman je gajeći različite bakterijske kulture na goveđem loju i agaru primetio pojavu sapuna, odnosno alkalnih soli viših masnih kiselina i glicerola. Zaključio je da su za lipolitičku aktivnost odgovorni enzimi poreklom iz bakterija i to iz: *B. pyocyaneus* (danas poznata kao *P. aeruginosa*), *S. pyogenes aureus* (danas *S. aureus*), *B. prodigiosus* (danas *Serratia marcescens*), i *B. fluorescens* (danas *P. fluorescens*). Kod *B. coli communis* (danas *E. coli*) nije detektovana aktivnost lipaza (Jaeger, Dijkstra et al. 1999).

Danas se zna da je ekspresija gena koji kodiraju lipaze kod bakterija uglavnom regulisana sredinskim faktorima i da predstavlja ćelijski odgovor na nedostatak nutrijenata. Kod većine mikroorganizama prisustvo lipida i masnih kiselina kao izvora ugljenika indukuje proizvodnju ovih vanćelijskih enzima, omogućavajući im da rastu u takvoj sredini. Širok spektar primene lipaza uticao je na razvoj metoda za izolaciju novih enzima iz različitih izvora. Bakterije koje poseduju lipaze izolovane su iz najrazličitijih sredina: pokvarenih mlečnih proizvoda, mulja, kanalizacija, deponija,

efluenata fabrika za proizvodnju ulja, voda i zemljišta zagađenih otpadnim uljem, ili zemljišta zagađenog plastičnim otpadom (Casas-Godoy, Duquesne et al. 2012). Direktna metoda izolacije nije efikasna kod vrsta koje se ne mogu kultivisati, pa su razvijene nove metode za detekciju gena koji kodiraju lipaze kod ovakvih mikroorganizama. Ove metode svode se na metagenomski pristup, koji obuhvata pretraživanje genomskih biblioteka mikroorganizama umnožavanjem gena koji kodiraju lipaze upotrebom prajmera koji sadrže sekvence očuvanih domena karakterističnih za lipaze. Alternativa ovoj metodi je funkcionalna metagenomska metoda, u kojoj se metagenom izolovan iz neke sredine klonira i eksprimira u domaćinu, a nakon toga se testira njegova lipolitička aktivnost (López-López, E Cerdan et al. 2014).

1.5.4. Mehanizmi sekrecije bakterijskih lipaza

Većina do sada ispitanih bakterijskih lipaza poreklom je iz vrsta rodova: *Bacillus*, *Geobacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Achromobacter*, *Arthobacter* i *Alcaligenes* (Contesini, Davanço et al. 2020). Bakterijske lipaze su većinom vanćelijski enzimi, a putevi njihove sekrecije najbolje su izučeni kod vrsta roda *Pseudomonas*. Lipaza iz vrste *P. aeruginosa* sekretuje se dvostepenim mehanizmom, dok *P. fluorescens* lipaza koristi jednostepeni mehanizam. Dvostepeni mehanizam podrazumeva postojanje periplazmatskog intermedijera. S obzirom da je lipaza iz soja *P. aeruginosa* PAO1 vanćelijski enzim, neophodno je da se transportuje kroz ćelijsku membranu u vanćelijski prostor da bi vršio svoju funkciju. Ekspresijom gena *lipA* koji kodira vanćelijsku lipazu A iz ovog soja dobija se proenzim za čiju je aktivaciju neophodno isecanje vodeće peptidne sekvence (Wohlfarth, Hoesche et al. 1992). Pored ove posttranslacione obrade polipeptida, neophodno je i dejstvo šaperona, enzima Lif foldaze (*eng. lipase-specific foldase*), kao i Dsb proteina (*eng. disulfide bond formation*) (Slika 10). Lif foldaza savija lipazu u aktivnu konformaciju, dok Dsb proteini učestvuju u formiranju disulfidnih veza. Ovi procesi odvijaju se u periplazmatskom prostoru pri transportu enzima u vanćelijsku sredinu (Jaeger and Rosenau 2004). Transport vanćelijske lipaze soja *P. aeruginosa* PAO1 vrši se Xcp sistemom koji je deo sekretornog puta tip II (Durand, Bernadac et al. 2003). Lipaza iz vrste *P. fluorescens* takođe poseduje signalnu sekvencu za transport van ćelije, ali za razliku od lipaze iz *P. aeruginosa* PAO1 ne formira periplazmatski intermedijer, te se sekrecija obavlja u jednom koraku (Jaeger, Dijkstra et al. 1999).



Slika 10. Dvostepeni mehanizam sekrecije vanćelijske lipaze iz vrste *P. aeruginosa*. Slika je preuzeta iz rada Rica i Jegera i prerađena (Reetz and Jaeger 1998).

1.5.5. Biohemijska karakterizacija lipaza

Biohemijska karakterizacija bilo kog enzima podrazumeva određivanje uslova u kojima je njegova katalitička aktivnost na najvišem nivou (Sangeetha, Arulpandi et al. 2011). Iako je mehanizam katalitičke reakcije kod većine lipaza isti, svojstva ovih enzima (specifičnost, temperaturni i pH profili) razlikuju se u zavisnosti od njihovog porekla. Lipaze biljnog i životinjskog porekla pokazuju najveću aktivnost u slabo alkalnim sredinama (pH 8–9), dok lipaze iz mikroorganizama mogu biti aktivne u širokom opsegu pH vrednosti (pH 3–12). Primeri lipaza koje su aktivne u kiselim uslovima su veoma retki i većinom se odnose na lipaze iz gljiva (*Aspergillus niger*), sa jednim izuzetkom među bakterijama – *P. gessardi* (Ramani, Chockalingam et al. 2010). Optimalna temperatura za aktivnost većine lipaza kreće se u opsegu 30 °C – 60 °C, mada postoje i značajna odstupanja. Primer je lipaza psihotrofnog soja *Pseudomonas* sp. KB700A, koja je aktivna i na temperaturi od –5 °C, dok se kod vrste *Pseudomonas* sp., izolovane iz komposta, kataliza hidrolize lipida može odvijati na temperaturi od 90 °C tokom 13 h (Rathi, Bradoo et al. 2000, Rashid, Shimada et al. 2001). Za ispoljavanje katalitičke aktivnosti lipaze ne zahtevaju prisustvo kofaktora. Divalentni katjoni kao što je Ca^{2+} obično imaju pozitivan uticaj na katalitičko dejstvo, dok joni metala Zn^{+2} i Mg^{+2} blago inhibiraju aktivnost ovih enzima. Joni teških metala kao što su Co^{+2} , Ni^{+2} , Hg^{+2} i Sn^{+2} značajno inhibiraju aktivnost lipaza (Macrae and Hammond 1985, Woolley 1994). Osim u vodenoj sredini, lipaze mogu biti aktivne i u organskim rastvaračima, što je vrlo povoljna osobina za upotrebu u biokatalizi (Kumar, Dhar et al. 2016). Lipaze otporne na organske rastvarače su efikasni biokatalizatori u biosintezi polimera, u reakcijama transesterifikacije, kao i u proizvodnji biodizela (Dizge, Aydiner et al. 2009, Singh, Singh et al. 2010). Osetljivost lipaza na rastvarače zavisi od njihove polarnosti. Polarniji rastvarači destabilizuju lipaze (Ahmed, Raghavendra et al. 2010). Lipaze iz različitih izvora pokazuju različit nivo tolerancije na organske rastvarače, stoga je veoma važno ispitati ovo svojstvo pre komercijalne upotrebe enzima (Sangeetha, Arulpandi et al. 2011). Surfaktatni povećavaju površinu vodeno-lipidne interfeze u kojoj se odvija katalitička reakcija i na taj način podstiču hidrolizu supstrata. Međutim, ovaj uticaj zavisi od tipa i koncentracije surfaktanta. Postoje surfaktanti, kao što je Tween-80, koji imaju dvojako dejstvo – u niskim koncentracijama mogu indukovati dejstvo lipaza, dok ih u visokim koncentracijama inhibiraju (Zhang, Zhang et al. 2009).

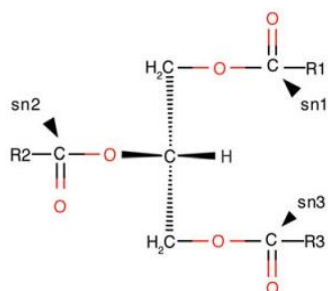
1.5.6. Selektivnost lipaza

Selektivnost enzima je veoma važna osobina na kojoj se zasniva njegova primena. Pravilnim izborom enzima može se usmeriti tok reakcije i dobiti čist proizvod u velikom prinosu. Postoje tri tipa selektivnosti: selektivnost u izboru supstrata, regioselektivnost i enantioselektivnost (Casas-Godoy, Duquesne et al. 2012).

Na osnovu selektivnosti u izboru supstrata, koja podrazumeva dejstvo na tačno određen tip jedinjenja, recimo, tri-, di- ili monoacilglicerol, lipaze se mogu podeliti na tri-, di- ili monoacilglicerol lipaze. Monoacilglicerol lipaze su česte kod bakterija, jer je za njih ovo jedinjenje veoma toksično (Rengachari, Aschauer et al. 2013). Oblik vezujućeg mesta, kao i aminokiseline koje ga čine, određuju afinitet lipaza ka određenom supstratu. Takođe, hemoselektivnost lipaza određuje sklonost ovih enzima ka specifičnoj funkcionalnoj grupi supstrata.

Regioselektivnost se definiše kao afinitet lipaza da napadaju estarsku vezu na tačno određenoj poziciji (primarnu ili sekundarnu) i zavisi od odnosa hidrofobnih i hidrofilnih aminokiselinskih ostataka u džepu aktivnog mesta enzima. Na osnovu regioselektivnosti lipaze se mogu podeliti na sn-1,3 specifične, koje deluju na primarnu estarsku vezu u molekulu triacilglicerola i sn-2 specifične lipaze, koje deluju na sekundarnu estarsku vezu (Slika 11). Većina lipaza poreklom iz mikroorganizama pripada sn-1,3 specifičnim lipazama (lipaze iz *R. oryzae*, *A. niger*, *Y. lipolytica*, *R. miehei*, *R. endophyticus*, *R. delemar*, *T. lanuginosus*, *C. antarctica*), dok su sn-2 specifične lipaze

veoma retke, a primeri su lipaze iz sojeva roda *Staphylococcus* i soja *Geotrichum* sp. FO401B. Postoje i nespecifične lipaze, koje nasumično isecaju estarske veze u triacilglicerolu, proizvodeći molekul glicerola i tri masne kiseline. U ovu grupu enzima spadaju lipaze iz *C. rugosa*, *C. viscosum*, *S. aureus*, *P. fluorescens*, *B. glumae* i *B. cepacia* (Casas-Godoy, Duquesne et al. 2012).



Slika 11. Estarske tarske veze na sn-1, sn-2 i sn-3 pozicijama u molekulu triacilglicerola

Enantioselektivnost enzima lipaza podrazumeva afinitet lipaza ka specifičnom enantiomernom obliku (R ili S) hiralnog molekula prisutnog u racemskoj smeši. Razrešavanje kristalne strukture kompleksa enzim-supstrat, molekulsko modelovanje tetraedarnog intermedijera i molekularno usidravanje supstrata na aktivno mesto enzima pomogli su u razumevanju enantioselektivnosti enzima lipaza (Bordes, Cambon et al. 2009). Jedan enantiomerni oblik određenog hiralnog molekula može imati terapeutsko dejstvo, dok drugi može biti neaktivan ili čak toksičan (Kasprzyk-Hordern and Baker 2012), stoga je veoma važno poznavati enantioselektivnost enzima koji se primenjuje.

1.5.7. Značaj enzima lipaza u biotehnologiji i bioremedijaciji

Lipaze predstavljaju grupu biotehnološki veoma značajnih enzima. Širok spektar korisnih svojstava omogućava primenu ovih enzima u biokatalizi, bioremedijaciji i industriji. Gledano iz ugla industrije, svojstva kao što su efikasna kataliza velikog broja različitih reakcija, raznovrsnost supstrata na koje deluju, kao i činjenica da za njihovu aktivnost nisu nepodni skupi kofaktori, čine ove enzime veoma poželjnim za upotrebu u različitim procesima (Casas-Godoy, Duquesne et al. 2012). Bakterijske lipaze odlikuje stabilnost u širokom pH i temperaturnom opsegu, termostabilnost, otpornost na organske rastvarače, izuzetna hemo-, regio- i enantioselektivnost, visok prinos i jednostavnost genetičke manipulacije (Reetz 2013). Pored toga, ovi enzimi imaju visoku aktivnost u blagim reakcionim uslovima, netoksični su i ekološki prihvatljivi, te su pogodniji za upotrebu od hemijskih ili sintetičkih katalizatora (Javed, Azeem et al. 2018).

Enzimi koji se u današnje najviše upotrebljavaju u industrijskim procesima su hidrolaze, među kojima su proteaze i lipaze, a većina potiče iz mikroorganizama. U prehrambenoj industriji lipaze su našle primenu u proizvodnji mlečnih proizvoda, sira, butera i margarina (modifikacija masti i ulja), formula za bebe i hrane za bebe (Ferreira-Dias, Sandoval et al. 2013, Peng, Wang et al. 2014, Chaurasia, Bhandaria et al. 2016). Takođe se koriste kao emulgatori, za poboljšanje ukusa i mirisa namirnica (Melim Miguel, Martins-Meyer et al. 2013). Visoka termostabilnost i pH stabilnost omogućile su upotrebu lipaza kao aditiva u proizvodnji deterdženata i rastvora za hemijsko čišćenje. U farmaceutskoj industriji lipaze se koriste za dobijanje čistih enantiomera delovanjem na racemske smeše (prostaglandini, cefalosporini, penicilini, nesteroidni antiinflamatorni lekovi), u proizvodnji surfaktanata i emolijentnih krema. Lipaze su našle svoju primenu kao biosenzori, u medicinskoj industriji, tekstilnoj industriji, industriji papira i pulpe, kao i u proizvodnji biodizela (Sumner, Krause et al. 2001, Li, Du et al. 2007, Sharma and Kanwar 2014). U bioremedijaciji se ovi enzimi koriste u tretmanu voda sa organskim ostacima i ostacima ulja, kao i otpadnih voda iz različitih industrija (Salihu and Alam 2015). Još jedna interesantna upotreba lipaza uključuje proizvodnju biopolimera

(polihidroksialkanoata, polilaktida) (Matsumoto and Taguchi 2013), ali i njihovu razgradnju (Gan, Yu et al. 1999, Rodríguez-Contreras, Calafell-Monfort et al. 2012).

Poznato je da većina Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterijskih vrsta poseduje enzime lipaze (Jaeger 1993). Enzimi koji su najviše u upotrebi poreklom su iz vrsta roda *Pseudomonas* – *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. alcaligenes*, roda *Bacillus* – *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. alcalophilus*, *B. coagulans* i roda *Burkholderia* (Melani, Tambourgi et al. 2020). Termostabilne lipaze iz vrsta *P. alcaligenes* (Lipomax®) i *P. mendocina* (Lumafast®) upotrebljavaju su kao aditivi deterdženata, dok se lipaze iz vrsta *P. aeruginosa*, *P. cepacia* and *P. fluorescens* intenzivno koriste u reakcijama sinteze u organskoj hemiji, prevashodno za proizvodnju hiralnih molekula iz racemskih smeša (Coffen 1997). Takođe, veoma važnu ulogu u biokatalizi imaju i lipaze iz sojeva roda *Streptomyces* (Spasić, Mandić et al. 2018). Lipaze iz ovih sojeva pokazuju visoku aktivnost na različitim temperaturama i pH vrednostima, kao i visoku enantioselektivnost.

Rastući zahtevi za održivim upravljanjem otpadom otvorili su novo polje istraživanja sa fokusom na biorazgradnju polimernih materijala. Bakterije iz rodova *Pseudomonas* i *Streptomyces* poseduju enzime lipaze koji efikasno razgrađuju biopolimere i pokazuju veliki potencijal za biorazgradnju polikaprolaktona i polihidroksialkanoata kratkih i srednjih lanaca u laboratorijskim uslovima. Ove vrste, kao i njihovi enzimi mogu se primeniti u sredinama u kojima je neophodno ubrzati proces biorazgradnje polimera, kao što su kućni, ali i industrijski kompost sistemi (Jaeger and Rosenau 2004, Chua, Tseng et al. 2013, Ponjavic, Nikolic et al. 2017, Spasić, Mandić et al. 2018).

Primena lipaza u biotehnološkim i industrijskim procesima zahteva proizvodnju enzima u velikim količinama, što se uglavnom postiže procesom fermentacije. Metode za prečišćavanje enzima zavise od oblasti njegove primene. Poželjno je da ove metode budu brze i efikasne, jeftine i da daju visok prinos. Taloženje, odnosno koncentrovanje proteina amonijum sulfatom, ultrafiltracija i ekstrakcija organskim rastvaračima su najčešće korišćene metode za prečišćavanje enzima. Na ovaj način prečišćeni enzimi zadovoljavaju kriterijume većine proizvodnih procesa. Međutim, u farmaceutskoj industriji koriste se enzimi visoke čistoće, te su neophodni dalji koraci prečišćavanja koji podrazumevaju afinitetnu hromatografiju i gel filtraciju (Casas-Godoy, Duquesne et al. 2012). Jedan od načina da se poveća stabilnost i aktivnost enzima u biokatalitičkim procesima je njegova imobilizacija. Imobilizacija omogućava da se enzim reciklira i ponovo upotrebljava, što smanjuje troškove proizvodnje (Liu, Lin et al. 2009, Homaei, Sariri et al. 2013). Enzimi lipaze se mogu imobilisati na različitim hidrofobnim i hidrofilnim nosačima kao što su silika, alginat, polietilen, polipropilen, polimetakrilat (Minovska, Winkelhausen et al. 2005, Cheirsilp, Jeamjounkhwat et al. 2009, Salis, Bhattacharyya et al. 2009). Imobilisane lipaze iz vrsta *P. fluorescens*, *P. cepacia* i *P. aeruginosa* pokazale su znatno bolju aktivnost u katalitičkim reakcijama u odnosu na slobodne enzime (Vishwe and Chowdhary, Cao, Huang et al. 2016, Han, Zhou et al. 2016).

Rekombinantni enzimi koji se koriste u industrijskim procesima uglavnom su poreklom iz mikroorganizama. Razlog za to je povećan broj sekvenciranih genoma mikroorganizama koji su omogućili identifikaciju gena za nove varijante enzima. Rekombinantnom ekspresijom povećan je prinos enzima, ali i ponovljivost procesa njihove proizvodnje, čime su prevaziđene glavne prepreke za upotrebu enzima lipaza u industriji. Više od polovine rekombinantnih bakterijskih lipaza iz rodova *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Serratia* i *Burkholderia* eksprimirano je u *E. coli* domaćinu (Borrelli and Trono 2015). Poteškoće koje se javljaju kod ovog pristupa su nakupljanje inkluzionih tela u ćeliji heterologog domaćina, formiranje neadekvatnih disulfidnih veza unutar proteina, odnosno savijanje proteina u konformaciju koja onemogućava njegovu enzimsku aktivnost (Akbari, Khajeh et al. 2010, Narayanan, Khan et al. 2010, Bhatwa, Wang et al. 2021). Sa druge strane, enzimi lipaze mogu se eksprimirati i homologo, međutim, komplikovani mehanizmi sekrecije lipaza iziskuju dodatne napore za optimizaciju ovog procesa (Gerritse, Hommes et al. 1998, Ahn, Pan et al. 2001).

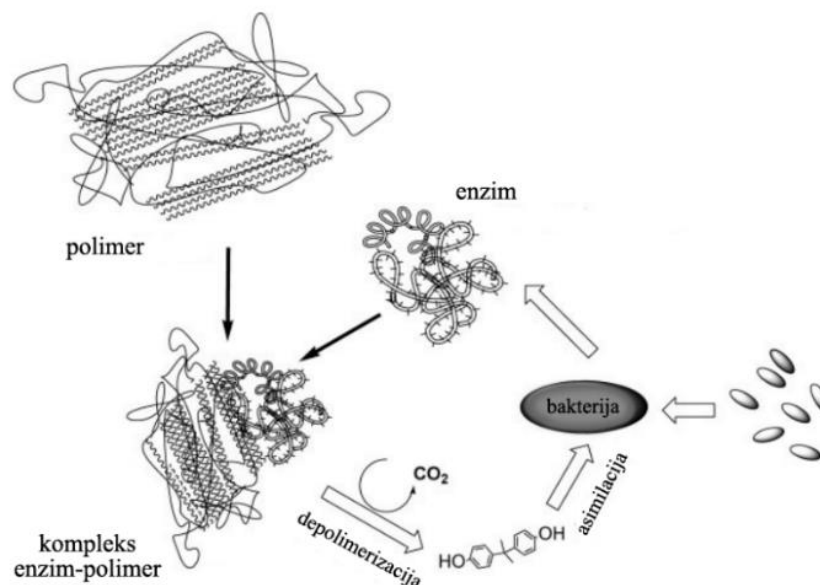
1.5.8. Primena lipaza u biorazgradnji polimera

1.5.8.1. Biorazgradivi polimeri kao alternativni plastici

Tehnološki napredak omogućio je razvoj petrohemijske plastike, jeftine, lagane, čvrste i izdržljive, univerzalne sirovine koja je potisnula upotrebu tradicionalno korišćenih materijala kao što su metal, koža i drvo. Svakodnevna upotreba plastike je veoma rasprostranjena, a njena najpoželjnija svojstva, izdržljivost i otpornost na spoljašnje uticaje, ujedno predstavljaju i najveću opasnost za životnu sredinu (Sivan 2011, Prieto 2016). Većina iskorišćene plastike se odbacuje nakon samo jedne upotrebe, a neadekvatno upravljanje ovim akumuliranim otpadom stvorilo je trajnu kontaminaciju vodenih i zemljišnih ekosistema (Avérous and Pollet 2012, Bhardwaj, Gupta et al. 2013, Chamas, Moon et al. 2020). Kada jednom uđe u životnu sredinu, plastični otpad se u njoj može zadržati stotinama, pa i hiljadama godina. Prirodni procesi mehaničke i fotohemijske fragmentacije krupnijih komada raspadnute plastike stvaraju lagane, plutajuće, neuništive čestice mikroplastike (< 5 mm) i nanoplastike (< 1 µm), veoma opasne za sve žive organizme (Espinosa, Esteban et al. 2016). Novije studije govore o potencijalnom štetnom uticaju mikroplastike i nanoplastike na ćelijskom, pa čak i molekularnom nivou (Prata, da Costa et al. 2020, Rahman, Sarkar et al. 2021, Yee, Hii et al. 2021).

U cilju smanjenja štetnog uticaja nerastvornog plastičnog otpada na životnu sredinu i zdravlje ljudi, razvijene su strategije za proizvodnju novih, biorazgradivih polimernih materijala. Glavni izazov pri dizajniranju ekološki prihvatljivih polimera je optimizacija njihovih hemijskih, fizičkih i mehaničkih svojstava, kao i svojstva biorazgradivosti (Leja and Lewandowicz 2010). Biorazgradivi polimeri se u današnje vreme upotrebljavaju kao ekološka alternativa plastici u izradi ambalaže, pribora za jelo za jednokratnu upotrebu, ali i u poljoprivredi (Banerjee, Chatterjee et al. 2014, Albuquerque and Malafaia 2018). Na osnovu porekla, biorazgradivi polimerni materijali se mogu podeliti na prirodne – polihidroksialkanoati (PHA), polilaktid (PLA), termoplastični škrob (TPS) i celuloza, koji se dobijaju iz biomase ili obnovljivih izvora, i sintetičke – polikaprolakton (PCL), poli(butilen-sukcinat) (PBS) i poli(butilen-adipat/tereftalat) (PBAT). Sintetički polimeri nastaju iz fosilnih goriva, najčešće nafte. U današnje vreme termini „biopolimer“ i „bioplastika“ često se tumače pogrešno. Činjenica da je polimer dobijen iz obnovljivih izvora ne mora nužno da znači da je biorazgradiv (primer je nerazgradivi visoko supstituisani celulozni acetat). Sa druge strane, određeni sintetički polimeri na bazi nafte, kao što je PCL, mogu se razgraditi dejstvom enzima nekih mikroorganizama (Tokiwa, Calabria et al. 2009, Folino, Karageorgiou et al. 2020, Meereboer, Misra et al. 2020).

Biorazgradnja je dvostepeni proces koji obuhvata fragmentaciju polimera na komponente manje molekulske mase i mineralizaciju. Fragmentacija polimera odvija se pod dejstvom abiotičkih (oksidacija, fotoliza i hidroliza) ili biotičkih faktora (enzimska razgradnja). Mehanizam enzimske razgradnje podrazumeva prijanjanje mikroorganizama za površinu polimera i sekretovanje enzima koji se vezuju za polimerni supstrat i katalizuju njegovu hidrolizu na oligomere, dimere i monomere koji mikroorganizmima služe kao izvor hranljivih materija (Slika 12) (Tokiwa, Calabria et al. 2009, Vroman and Tighzert 2009, Mohanan, Montazer et al. 2020). Proces konverzije biorazgradivih materijala u gasove, vodu, soli i minerale naziva se mineralizacija. Mineralizacija je potpuna onda kada su svi dostupni izvori ugljenika pretvoreni u ugljen-dioksid ili metan, u zavisnosti od toga da li se odvija u aerobnim ili anaerobnim uslovima (Kyrikou and Briassoulis 2007). Ukoliko se odvija u prisustvu kiseonika, proizvodi reakcije su ugljen-dioksid i voda, dok se u nedostatku kiseonika kao proizvodi reakcije mineralizacije izdvajaju metan i voda (Leja and Lewandowicz 2010, Iwańczuk, Kozłowski et al. 2015).

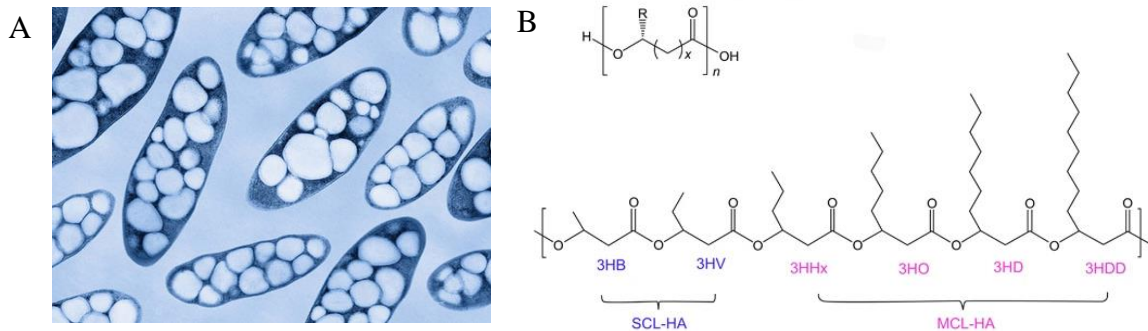


Slika 12. Mehanizam razgradnje polimera enzimima mikroorganizama. Slika preuzeta iz rada Artama i Dobra i prerađena (Artham and Doble 2008).

Mehanizam biorazgradnje polimera zavisi od fizičkih i hemijskih svojstava materijala i sredinskih uslova u kojima se ovaj proces odvija. Fizičko-hemijska svojstva materijala koja utiču na njegovu biorazgradivost su površina polimera (površinska morfologija, hidrofilna i hidrofobna svojstva), strukturna uređenost (hemijska struktura, molekulska masa i njena distribucija u okviru materijala) i visoka strukturna uređenost (temperatura ostakljivanja, temperatura topljenja, modul elastičnosti, kristalinitet i kristalna uređenost). Poliestri sa bočnim lancima su uglavnom manje rastvorljivi od poliestara bez bočnih lanaca. Takođe, ono što otežava proces biorazgradnje su velika molekulska masa, visok kristalinitet i visoka temperatura topljenja polimera. Stepenn kristaliniteta je ključni faktor za biorazgradivost polimera, jer enzimi prvenstveno napadaju amorfne regione u njegovom sastavu. Molekuli su u amorfnom regionu „labavo“ upakovani, što ih čini podložnijim za razgradnju u odnosu na kristalni deo. Brzina razgradnje polimera opada sa povećanjem stepena kristaliniteta (Tokiwa, Calabria et al. 2009, Vroman and Tighzert 2009, Mohanan, Montazer et al 2020).

1.5.8.2. PHA polimeri

Polihidroksialkanoati (PHA) su grupa prirodnih, alifatičnih poliestara, koje bakterije proizvode u nedostatku nutrijenata – azota, fosfora, sumpora, kiseonika ili magnezijuma, elemenata neophodnih za rast, kao i uz višak ugljenika (Steinbüchel 1991, Yu 2001, Du and Yu 2002, Berlanga, Montero et al. 2006, Samantaray and Mallick 2012). Ovi polimeri nalaze se u obliku unutarćelijskih hidrofobnih granula veličine 0,2 μm – 0,5 μm , koje skladište ugljenik i energiju. PHA mogu činiti čak 90 % suve ćelijske mase bakterija (Slika 13A) (Janes, Hollar et al. 1990, Madison and Huisman 1999, Muhammadi, Shabina et al. 2015). Po ponovnom uspostavljanju uslova pogodnih za rast bakterije akumulirani polihidroksialkanoati se razgrađuju unutarćelijskim enzimima depolimerazama i koriste kao izvor ugljenika i energije (Steinbüchel, Hustede et al. 1992, Byrom 1994).



Slika 13. A: Bakterije akumuliraju PHA (bele granule) u citoplazmi kao skladište ugljenika i energije u uslovima nutritivnog stresa. Slika je preuzeta sa internet stranice <http://www.plastix.it/al-via-la-partnership-tra-gammarad-italia-e-bio-on/>; B: gore – uopštena hemijska formula PHA, $x=1-8$, $n=100-1000$; dole – tipični predstavnici scl-PHA monomera (scl-HA): 3-hidroksibutirat (3HB) i 3-hidroksivalerat (3HV), kao i mcl-PHA monomera: 3-hidroksiheksanoat (3HHx), 3-hidroksioktanoat (3HO), 3-hidroksidekanoat (3HD) i (3HDD) 3-hidroksidodekanoat. Slika je preuzeta iz rada Lija i saradnika i prerađena (Li, Yang et al. 2016).

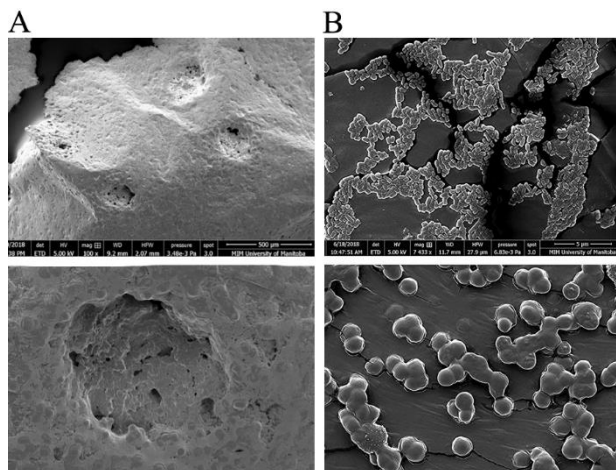
Većina do danas izolovanih PHA su primarno linearni poliestri sastavljeni od monomernih jedinica – estara trihidroksi-alkohola i masnih kiselina, koji u svom sastavu mogu imati 3–5 atoma ugljenika (PHA kratkog lanca – scl-PHA, *eng.* short chain length PHA), 6–14 atoma ugljenika (PHA srednjeg lanca – mcl-PHA, *eng.* medium chain length PHA) i preko 14 atoma ugljenika (PHA dugog lanca – lcl-PHA, *eng.* ledium chain length PHA) (Slika 13B). PHA kratkog lanca su široko rasprostranjeni i njihov tipični predstavnik je polihidroksibutirat (PHB). Sa druge strane, PHA srednjeg lanca su mnogo ređi, sintetišu ih bakterije iz samo nekoliko rodova, a u njihove predstavnike spadaju polihidroksioktanoat (PHO) i polihidroksidekanoat (PHD) (Wecker, Moppert et al. 2015).

U zavisnosti od tipa monomernih jedinica u sastavu polihidroksialkanoata, kao i njihovog broja, razlikuju se i fizičko-hemijska svojstva ovih polimera (Van der Walle, De Koning et al. 2001, Steinbüchel and Lütke-Eversloh 2003). Kada se izoluju iz bakterijskih ćelija PHA kratkih lanaca imaju strukturu nalik na kristale i podsećaju na konvencionalnu plastiku, dok su PHA srednjih lanaca elastomeri (Suriyamongkol, Weselake et al. 2007).

1.5.8.3. Biorazgradnja PHA polimera

Veoma važno svojstvo polihidroksialkanoata je biorazgradivost, što ih čini odličnom alterantivom za konvencionalnu, petrohemijsku plastiku (Lee 1996, Philip, Keshavarz et al. 2007). Biorazgradnja podrazumeva niz hemijskih reakcija u kojima različiti mikroorganizmi vrše enzimsku hidrolizu makromolekula do manjih molekula. U enzimskoj razgradnji PHA učestvuju dva tipa mikroorganizama: oni koji fizički razgrađuju polimer i oni koji sporedne proizvode nastale razgradnjom koriste kao izvor hranljivih materija (buterna kiselina, valerična kiselina i druge) (Meereboer, Misra et al. 2020). Biorazgradnja PHA polimera zavisi od svojstava samog polimera, ali i od sredinskih uslova kao što su temperatura, pH, vlažnost, salinitet, izloženost UV zracima, prisustvo kiseonika i nutrijenata, vrste prisutnih mikroorganizama itd. Optimalna temperatura za razgradnju PHA je temperatura koja odgovara mezofilnim mikroorganizmima, nezavisno od toga da li se razgradnja odvija u aerobnim ili anaerobnim uslovima (Tokiwa, Calabria et al. 2009, Meereboer, Misra et al. 2020). Kad su pitanju svojstva polimera, posmatraju se morfološke karakteristike, hemijska struktura (prisustvo različitih funkcionalnih grupa i njihov odnos hidrofilnosti i hidrofobnosti) i kristalinitet (Mochizuki and Hirami 1997, Philip, Keshavarz et al. 2007). Odnos kristalnih i amornih regiona u PHA polimeru vrlo je bitan za proces biorazgradnje. PHA polimer je delimično kristalizovan (prosečni kristalinitet se kreće 50 % – 60 %), a poseduje i amorfni region (Jendrossek and Handrick 2002). U prvom koraku biorazgradnje enzimi preferencijalno deluju na amorfni region PHA polimera. Dejstvom enzima depolimeraza na površinu polimernog materijala

oslobađaju se monomeri ili oligomeri, nakon čega se preostali oligomeri razlažu enzimom oligomer hidrolazom (Lu, Takahashi et al. 2014). Enzimi koji katalizuju hidrolizu estarskih veza zbog svoje veličine ne mogu da prođu u unutrašnjost polimera, već izazivaju isključivo površinsku eroziju (Slika 14A) (Meereboer, Misra et al. 2020). Bakterije koje kolonizuju površinu PHA polimera (Slika 14B) metabolišu nastale monomerne jedinice i usvajaju ih (Delafield, Doudoroff et al. 1965).



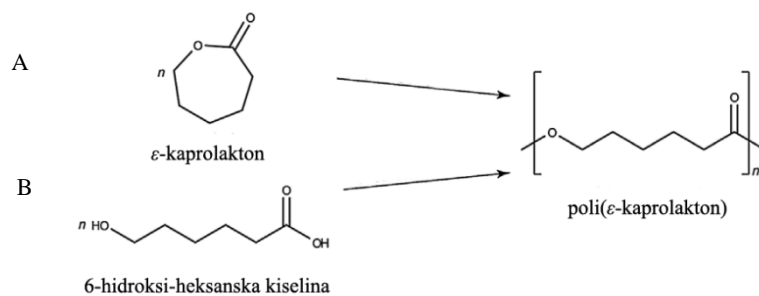
Slika 14. Skenirajuća elektronska mikroskopija: A: PHO polimerni film nakon sedam dana razgradnje bakterijskom kulturom *P. chlororaphis* PA23-63-1, 100x i 500x uvećanje; B – Kolonizacija površine PHO polimera sojevima *P. chlororaphis* PA23-63-1 and *Acinetobacter lwoffii*. Slika preuzeta iz rada Šarme i saradnika (Sharma, Mohanan et al. 2019)

Polihidroksialkanoati su podložniji procesu razgradnje od drugih biopolimera (PLA, PBS, PBAT) u aerobnim sredinama (zemljište, kompost, morski ekosistem) i pokazuju dobar potencijal za razgradnju u anaerobnim sredinama (kanalizacioni mulj, digestori i deponije) (Meereboer, Misra et al. 2020). Stopa degradacije komada materijala poli(3-hidroksi-butirata) se kreće od nekoliko meseci (u kanalizacionom mulju), do nekoliko godina (u morskoj vodi) (Madison and Huisman 1999).

Do sada je pokazano da nekoliko prokariotskih lipaza ima sposobnost razgradnje PHB i PHA polimera na bazi ω -hidroksialkanoične kiseline, kao što su poli(6-hidroksiheksanoat), poli(4-hidroksibutirat) i njihove blende (Tarazona, Machatschek et al. 2020). Komercijalne lipaze prečišćene iz gljivica *C. antarctica*, *C. rugosa*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus arrhizus*, *R. niveus*, *R. oryzae* i bakterija *P. cepacia*, *P. fluorescens* razgrađuju PHA polimere (Chang and Sudesh 2013, Mok, Chang et al. 2016), kao i lipaze iz bakterijskih sojeva *P. chlororaphis* PA23 i *A. lwoffii* (Sharma, Mohanan et al. 2019). Rekombinantna lipaza iz soja *B. subtilis* DI2 takođe je pokazala sposobnost razgradnje PHA polimera.

1.5.8.4. PCL polimeri

Iako su polimerni materijali koji se sintetišu iz fosilnih sirovina uglavnom nerazgradivi, postoje izuzeci, poput polikaprolaktona (poli(ϵ -kaprolakton), PCL), koji je biorazgradiv, netoksičan i biokompatibilan polimer. Ovaj alifatični poliestar može se dobiti na dva načina: polikondenzacijom 6-hidroksi-heksanske kiseline i polimerizacijom otvaranja prstena monomera ϵ -kaprolaktona (Slika 15). PCL je semikristalan (prosečnog kristaliniteta ~50 %), lako obradiv polimer koji se rastvara u širokom spektru organskih rastvarača (Nair and Laurencin 2007). U poređenju sa drugim alifatičnim poliestrima odlikuje ga izuzetno niska temperatura ostakljivanja ($T_g = -60$ °C), niska temperatura topljenja ($T_m = 55-60$ °C) i visoka temperatura razgradnje ($T_d = 350$ °C). Na sobnoj temperaturi PCL polimer se nalazi u viskoelastičnom, gumastom stanju (Nair and Laurencin 2007, Ghanbarzadeh and Almasi 2013).

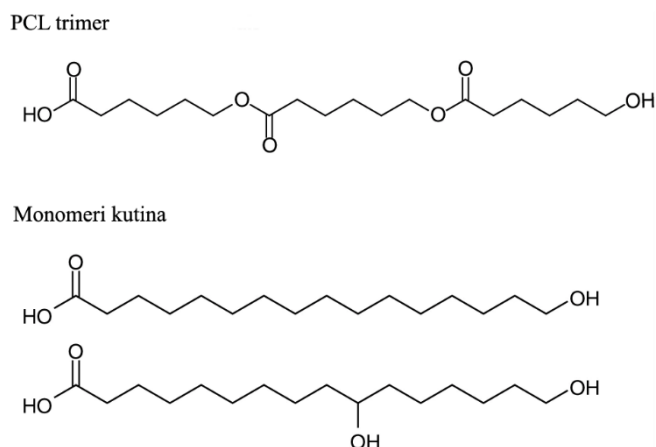


Slika 15. Sinteza PCL od A: ϵ -kaprolaktona i B: 6-hidroksi-heksanske kiseline. Slika je preuzeta iz rada Bartnikovskog i saradnika i prerađena (Bartnikowski, Dargaville et al. 2019).

Mehanička svojstva polikaprolaktona slična su svojstvima konvencionalnih, nerazgradivih sintetičkih polimera, a mogu se poboljšati mešanjem sa drugim polimerima kao što su poli(hidroksi-butirat) (PCL/PHB), skrob (PCL/skrob) ili polilaktid (PCL/PLA) (Avérous, Moro et al. 2000, Liu, Li et al. 2000, Lovera, Márquez et al. 2007). Zbog mnogih korisnih svojstava ovaj polimer je našao svoju primenu u medicini, izradi biorazgradive jednokratne ambalaže i proizvoda za domaćinstvo (Mondrinos, Dembznski et al. 2006, Vroman and Tighzert 2009).

1.5.8.5. Biorazgradnja PCL polimera

Biorazgradivost polimernog materijala prvenstveno zavisi od tipa ponavljajuće, monomerne jedinice, kao i vrste hemijske veze koje one ostvaruju unutar polimernog lanca. Monomerne jedinice u polikaprolaktonu povezane su slabim estarskim vezama koje podležu abiotičkoj hidrolizi, ali je usled semikristalne i hidrofobne prirode polimera ovaj vid razgradnje relativno spor i može trajati i do nekoliko godina (Arakawa and DeForest 2017). Sa druge strane, u prisustvu enzima hidrolaza, u koje spadaju proteaze, esteraze, glikozidaze i fosfataze proces razgradnje se znatno ubrzava (Azevedo and Reis 2005). Mikroorganizmi mogu prepoznati PCL polimer kao analog prirodnog polimernog jedinjenja kutina (Slika 16) (Murphy, Cameron et al. 1996).



Slika 16. Hemijska struktura PCL trimera i monomera kutina. Slika je preuzeta iz rada Suzukija i saradnika (Suzuki, Tachibana et al. 2020)

Glavni ograničavajući faktor za biorazgradnju je visok procenat kristaliniteta polimera. Da bi se odigrala enzimaska hidroliza, polimerni lanci unutar PCL moraju biti dovoljno pokretljivi da bi prišli aktivnom mestu enzima. Lanci koji se nalaze u amorfnom regionu polimera mogu pristupiti aktivnom mestu enzima, a reakcije koje se odigravaju na višim temperaturama podstiču njihovu

fleksibilnost. Zbog toga je veoma važno da enzim koji vrši hidrolizu bude termostabilan. Početni korak biorazgradnje je adsorpcija enzima na površinu polimera i formiranje kompleksa enzim-supstrat (Slika 12). Nakon toga vrši se nasumično isecanje estarskih veza unutar amorfnog regiona što rezultuje selektivnom površinskom erozijom polimera (Mochizuki, Hirano et al. 1995, Almeida, Figueiredo et al. 2019). Danas se zna da enzimi sa esteraznom aktivnošću – kutinaze i lipaze imaju veliki potencijal za upotrebu u enzimskoj hidrolizi PCL polimernog materijala. Pre svega lipaze, ali i kutinaze mnogih gljiva (*A. melleus*, *P. funiculosum*, *C. antarctica*, *C. rugosa*, *Fusarium solani*) i bakterija (*B. pumilus*, *Lactobacillus plantarum*, *P. fluorescens*, *P. cepacia*, *Thermobifida cellulosilytica*) iz različitih sredina svojim dejstvom ubrzavaju proces razgradnje polimera polikaprolaktona (Eldsäter, Erlandsson et al. 2000, Liu, Li et al. 2000, Pastorino, Pioli et al. 2004, Vidaurre, Duenas et al. 2008, Blackwell, Haernvall et al. 2018, Khan, Nagarjuna et al. 2019, Shi, Jing et al. 2020).

Mehanizam i stepen razgradnje polikaprolaktona razlikuje se u zavisnosti od enzima koji na njega deluje. Iako i lipaze i kutinaze razgrađuju ovaj polimer, mehanizmi ovog procesa se razlikuju. Ovi enzimi imaju različit pristup lancima unutar polimernog supstrata (Zumstein, Rechsteiner et al. 2017). Jedan od najbolje proučenih enzima koji razgrađuju polikaprolakton je komercijalna *Pseudomonas* lipaza. Ova lipaza pokazala je visok stepen hidrolize kako PCL homopolimera, tako i njegovih blendi (Gan, Yu et al. 1999, Liu, Li et al. 2000, Spearman, Irin et al. 2019). Ono što je sigurno je da se biotička, odnosno enzimska hidroliza odvija mehanizmom površinske erozije, heterogenim procesom koji podrazumeva veliki gubitak mase PCL polimera (Göpferich 1996, Hakkarainen 2002).

1.5.8.6. Kompostiranje

Kompostiranje je jedno od najefikasnijih rešenja za skladištenje biorazgradivog otpada. Za razliku od razgradnje u prirodno prisutnim uslovima, razgradnja u kompostu predstavlja proces u kontrolisanim uslovima, što podrazumeva praćenje i održavanje temperature, vlažnosti i zasićenosti sistema kiseonikom. Kompostabilni polimeri nisu nužno biorazgradivi u drugim sredinama – zemljištu, morskim ekosistemima, deponijama. Takođe, ni svi biorazgradivi materijali nisu nužno kompostabilni. Kompostiranje se može podeliti na industrijsko i kompostiranje u domaćinstvu. Biopolimeri se uglavnom kompostiraju u industrijskim uslovima, gde se procesiraju velike količine otpada (Meereboer, Misra et al. 2020). Dejstvom mikroorganizama, u aerobnim uslovima, na temperaturi koja ne premašuje 65 °C –70 °C i vlažnosti ~60 % odvija se enzimska razgradnja biopolimera, a finalni proizvodi su ugljen-dioksid, voda i biomasa. Kontrolisanje temperature važno je iz više razloga – na temperaturi ispod 55 °C omogućeno je prisustvo patogena, dok se na temperaturama višim od 65 °C uglavnom deaktiviraju enzimi mikroorganizama. Aeracija kompost sistema veoma je bitna za održavanje njegovog kvaliteta, za mikrobiološku aktivnost, kontrolisanje mirisa i uklanjanje viška vlage (Bhave and Kulkarni 2019). Višak vlage može poremetiti protok gasova i vezivanje kiseonika, što dalje remeti metabolizam mikroorganizama, dok njen nedostatak dovodi do dehidracije supstrata i narušavanja aktivnosti enzima (Onwosi, Igbokwe et al. 2017).

Kompostiranje u kućnim uslovima je trend kome se u poslednje vreme pridaje sve veći značaj u razvijenijim zemljama. Ovaj vid kompostiranja predstavlja održivo upravljanje organskim otpadom nastalim u kući, baštama i povrtnjacima. Osim ekoloških benefita, biorazgradnja otpadnog materijala u kućnim uslovima predstavlja vid uštede – dobijeni kompost može se ponovo iskoristiti kao đubrivo odličnog kvaliteta (Vázquez and Soto 2017).

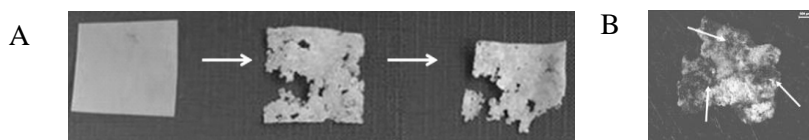
1.5.8.7. Kompostiranje PHA i PCL materijala

Većina studija koja je testirala biorazgradnju PHA polimera u kompostu odvijala se u uslovima industrijskog kompostiranja (na 58 °C), jer je u domaćinstvu nemoguće uspostaviti ovako kontrolisane uslove. Po standardu ISO 14855 (Određivanje krajnje aerobne biorazgradivosti plastičnih materijala u kontrolisanim uslovima kompostiranja – metoda analize nastalog ugljen-dioksida), celuloza se razgrađuje 92 % za 45 dana, dok se po istom standardu kesa sačinjena od PHA polimernog materijala razgradi 94 % za 180 dana i nadmašuje biorazgradnju sintetičkih polimera na bazi nafte, kao što je PCL (Rosa, Filho et al. 2003, Noda, Green et al. 2005, Seggiani, Cinelli et al. 2015). Iako se industrijsko kompostiranje smatra kontrolisanim, i dalje postoje razlike u podacima o biorazgradnji PHBV (poli(3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksivalerat) filmova, u kojima se navodi da je potrebno od 45–200 dana za 90 % – 95 % razgradnje ovog polimera (Chen 2012, Muniyasamy, Ofosu et al. 2016). Ove razlike su možda uzrokovane razlikama u izvoru inokuluma (materijala koji u kompost uvodi mikroorganizme koji će vršiti razgradnju) (Meereboer, Misra et al. 2020). U ispitivanju biorazgradnje PHA materijala u kompostu korišćeni su različiti inokulumi, ali su se usled nedostatka definisanih standarda o početnim uslovima (pH, odnos ugljenik/azot) javile značajne razlike između studija. Nekomercijalno kompostiranje u domaćinstvu je prirodnija metoda, u kojoj temperatura i vlažnost nisu kontrolisani, te se kompostiranje odvija sporije nego u industrijskim i komercijalnim kompost sistemima. Bez obzira da li se biorazgradnja PHA polimera odvija u domaćinstvu ili u industrijskom kompostu, mehanizmi biorazgradnje polimernih materijala su isti ako se ovaj proces odvija u istim uslovima (ista temperatura, pH i populacija mikroorganizama). PHA polimeri kompostirani u domaćinstvu pokazuju minimalan stepen biorazgradnje usled nedovoljno visoke temperature. Sa druge strane, visoke temperature koje se mogu postići u industrijskom kompostiranju poboljšavaju biorazgradnju, podstičući neenzimsku i enzimsku hidrolizu. Nestabilnost uslova u kompost sistemu u domaćinstvu otežava proučavanje biorazgradnje PHA polimera i daje velike razlike u rezultatima između studija (Meereboer, Misra et al. 2020). Na Slici 17 dat je prikaz biorazgradnje PHB polimera u kontrolisanim uslovima u kompostu, po standardu ISO 20200.



Slika 17. Biorazgradnja PHB polimera u kompostu (po standardu ISO 20200); Prikazan je PHB polimer nakon (sleva na desno): 7 dana, 19 dana, 28 dana i 33 dana. Slika je preuzeta iz rada Sančez-Safont i saradnika (Sánchez-Safont, Aldureid et al. 2020)

Polikaprolakton i njegovi kopolimeri se pod dejstvom mikroorganizama mogu lako razgraditi u različitim sredinama. Već nakon tri nedelje biorazgradnje ovog polimera u sistemu komposta optimalne vlažnosti (50 % –70 %), na temperaturi od 40 °C primećuju se značajne promene. Delovi PCL filma su potpuno dezintegrisani (Slika 18A).



Slika 18. Biorazgradnja PCL polimera, A: fotografija, sleva na desno: polimer pre početka razgradnje, nakon tri nedelje i nakon četiri nedelje u kompostu. B: mikrografija, PCL polimer nakon šest nedelja u kompostu. Slike su preuzeta iz rada Fukušime i saradnika (Fukushima, Abbate et al. 2010)

Mehanizam razgradnje PCL polimera u kompostu ne razlikuje se od već ranije opisanog mehanizma biorazgradnje – površinska erozija, sa nejednako razgrađenim delovima polimera (Slika 18B). Nehomogena biorazgradnja je posledica afiniteta enzima ka amorfnim regionima unutar

PCL polimera. Kristalni delovi podležu razgradnji kasnije, mada postoje dokazi i o istovremenom odvijanju razgradnje u oba regiona. Biorazgradnja PCL polimera u kompost sistemu zavisi i od površine na kojoj je ostvaren kontakt enzim–supstrat, odnosno populacija mikroorganizama–supstrat (Fukushima, Abbate et al. 2010, Fukushima, Tabuani et al. 2010) Stopu biorazgradnje određuje i temperatura u kompost sistemu. Razgradnja PCL polimera na sobnoj temperaturi je veoma spora, pa se ovaj polimer ne razgrađuje ni nakon 300 dana u kompostu. Na nešto višoj temperaturi od 46 °C PCL polimer gubi 36 % svoje mase nakon 120 dana. Ova pojava objašnjava se neenzimskom hidrolizom estarskih veza unutar polimera usled povećanja temperature i istovremenim aktiviranjem mikroorganizama koji usvajaju nutrijente nastale na ovaj način (Kodama 2013). Kada se posmatra uticaj površine PCL polimera na brzinu enzimske razgradnje u kompostu, može se reći da se u početnim fazama manje čestice (polimer u obliku praha) mnogo brže razgrađuju, jer je površina kontakta između enzima i supstrata mnogo veća nego kada je supstrat u obliku filma. Međutim, u kasnijim fazama biorazgradnje brzina razgradnje postaje potpuno nezavisna od oblika kompostiranog polimera, jer se početna fragmentacija polimera pod dejstvom enzima dešava dovoljno brzo da izloži veću površinu supstrata daljem dejstvu enzima (Yang, Yoon et al. 2005).

2. CILJEVI

Ekonomski napredak čovečanstva oslanja se na razvoj različitih grana industrije, što za posledicu ima stvaranje kompleksnih zagađenja u kopnenim i vodenim ekosistemima. Velike količine otpada, koje se svakodnevno talože, predstavljaju dugoročnu opasnost za životnu sredinu i zdravlje ljudi. Bioremedijacija, koja podrazumeva uključivanje mikroorganizama i njihovih enzima u procese uklanjanja zagađivača iz životne sredine, može predstavljati efikasno rešenje za probleme zagađenja hemijskim jedinjenjima i polimernim materijalima koji se ne mogu spontano razgraditi. Ovaj način remedijacije veoma je značajan, kako sa ekološkog, tako i sa ekonomskog stanovišta. Većina enzima koja je do danas izolovana, okarakterisana i koja se primenjuje u biotehnološkim procesima i bioremedijaciji poreklom je iz gljiva. Međutim, primena enzima iz gljiva nosi sa sobom i mnoga ograničenja, koja mogu biti prevaziđena upotrebom bakterija i/ili njihovih enzima, te se danas biotehnološki procesi i bioremedijacija znatno više oslanjaju na potencijal bakterijskih enzima.

Enzimi lakaze i lipaze se ističu kao veoma dobri biokatalizatori sa širokom primenom u različitim granama industrije, ali i u procesima bioremedijacije. Lakaze oksiduju širok spektar različitih aromatičnih jedinjenja, dok lipaze katalizuju hidrolizu lipidnih supstrata. Ovi enzimi za katalitičku aktivnost ne zahtevaju skupe kofaktore i stabilni su u organskim rastvaračima.

Sveobuhvatni cilj ovog rada je identifikacija i rekombinantna ekspresija novih bakterijskih enzima, lakaza i lipaza iz sojeva roda *Pseudomonas* i analiza njihovog potencijala za primenu u bioremedijaciji zagađenih zemljišta i voda.

2.1. Specifični ciljevi

Lakaze

- Odabir bakterija sa oksidativnom aktivnošću karakterističnom za enzime lakaze iz laboratorijske kolekcije sojeva roda *Pseudomonas*
- *In silico* analiza poznatih sekvenci gena koji kodiraju lakaze u sojevima roda *Pseudomonas* i dizajniranje prajmera za njihovo umnožavanje
- Kloniranje i optimizacija rekombinantne ekspresije lakaza odabranih sojeva roda *Pseudomonas* u heterologom domaćinu
- Izolovanje, prečišćavanje i karakterizacija rekombinantnih enzima
- Ispitivanje aplikativnog potencijala rekombinantnih lakaza u testovima razgradnje industrijskih zagađivača životne sredine

Lipaze

- Analiza lipolitičke aktivnosti sojeva roda *Pseudomonas* iz laboratorijske kolekcije
- Analiza aplikativnog potencijala enzima odabranih sojeva za razgradnju prirodnih i sintetičkih polimernih materijala u puferu i u kompostu
- Bioinformatička analiza poznatih sekvenci gena koji kodiraju lipaze u sojevima roda *Pseudomonas* i dizajniranje prajmera za njihovo umnožavanje
- Identifikacija gena koji kodiraju lipaze u odabranim sojevima roda *Pseudomonas*
- Kloniranje i optimizacija rekombinantne ekspresije lipaza u homologom domaćinu

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Bakterijski sojevi

Tokom izrade ove teze korišćeni su sojevi roda *Pseudomonas* iz kolekcije Laboratorije za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama, koja je deo Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu, kao i referentni sojevi nabavljeni iz kolekcija ATCC (American Type Culture Collection) i NCIMB (National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria). Pored njih korišćene su i komercijalne *Escherichia coli* kompetentne ćelije. Spisak svih korišćenih bakterijskih sojeva prikazan je u Tabeli 1. Priprema kompetentnih ćelija i protokoli za njihovu transformaciju objašnjeni su u odeljcima 3.5.6 i 3.5.7.

Tabela 1. Divlji i komercijalni bakterijski sojevi korišćeni u radu

Bakterijski soj		Karakteristike soja	Oznaka soja	Referenca
<i>Pseudomonas putida</i>	CA-3	izolovan iz bioreaktora, razgrađuje stiren, akumulira biorazgradive polimere polihidroksialkanoate srednjeg lanca (mcl-PHA)	NCIMB41162	(O'Connor, Buckley et al. 1995) (Nikodinovic-Runic, Flanagan et al. 2009),
	F6	izolovan iz zemljišta, poseduje enzime fenol oksidaze kojima oksiduje aromatična jedinjenja		(O'Connor, Witholt et al. 2001), (McMahon, Doyle et al. 2007)
	S12	izolovan gajenjem na stirenu (jedini izvor ugljenika), otporan na toksične organske rastvarače (stiren, toluen i oktanol), sekvenca genoma poznata	ATCC 700801	(Tao, Shen et al. 2012), (Kuepper, Ruijssenaars et al. 2015)

	mt-2	izolovan iz zemljišta, poseduje pWW0 plazmid, razgrađuje toluen, <i>m</i> -ksilen i <i>p</i> -ksilen, akumulira mcl-PHA	NCIMB10432	(Inouye, Nakazawa et al. 1987), (Nikodinovic, Kenny et al. 2008)
	KT2440	derivat soja <i>P. putida</i> mt-2 bez pWW0 plazmida. Nema faktora virulencije, biološki bezbedan za ubacivanje stranih gena, sekvenca genoma poznata, akumulira mcl-PHA	ATCC 47054	(Nelson, Weinel et al. 2002), (Prieto, de Eugenio et al. 2007), (Nikel and de Lorenzo 2018)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1	oportunistički patogen, spontani mutant originalnog soja PAO, rezistentan na hloramfenikol, sekvenca genoma poznata. Lipolitički enzimi, esteraze i lipaze, koje sekretuje u vanćelijsku sredinu pogodni za upotrebu u biotehnologiji.	ATCC 15692	(Wilhelm, Tommassen et al. 1999), (Klockgether, Munder et al. 2010)
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	B-561	bezbedan za upotrebu, može da se gaji na biljnom ulju, akumulira mcl-PHA	ATCC 19523	(Walsh, O'Connor et al. 2015, Ruiz, Kenny et al. 2019)
<i>Escherichia coli</i>	XL10-GOLD	komercijalne, ultrakompetentne ćelije Tet ^r Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173, <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lacIqZΔM15 Tn10</i> (Tet ^r) Amy Cam ^r]		Agilent, SAD

DH5 α	komercijalne, hemijski kompetentne ćelije F ⁻ , Δlac , U169 ($\Phi 80$ lacZ $\Delta M15$), supE44, hsdR17, recA1, gyrA96, endA1, thi-1, relA1		Invitrogen, Nemačka
BL21[DE3]	komercijalne, hemijski kompetentne ćelije F ⁻ , ompT, hsdS _B , (r _B ⁻ , m _B ⁻), gal, dcm (DE3)	XL10-GOLD 55962	Invitrogen, Nemačka

3.2. Vektori i konstrukti

Svi komercijalni vektori, kao i konstrukti koji su korišćeni u ovom radu prikazani su u Tabeli 2 i Tabeli 3.

Tabela 2. Vektori korišćeni u radu

Vektor	Veličina vektora	Relevantne karakteristike	Referenca
pGEM-T Easy	3015 bp	Amp ^{r*} , vektor za direkciono kloniranje PCR produkata	Promega, SAD
pRSET B	2940 bp	Amp ^r , vektor za kloniranje i ekspresiju rekombinantnih proteina	Invitrogen, Nemačka
pJB861	7243 bp	Km ^{r**} , vektor za kloniranje i ekspresiju rekombinantnih proteina	(Blatny, Brautaset et al. 1997)

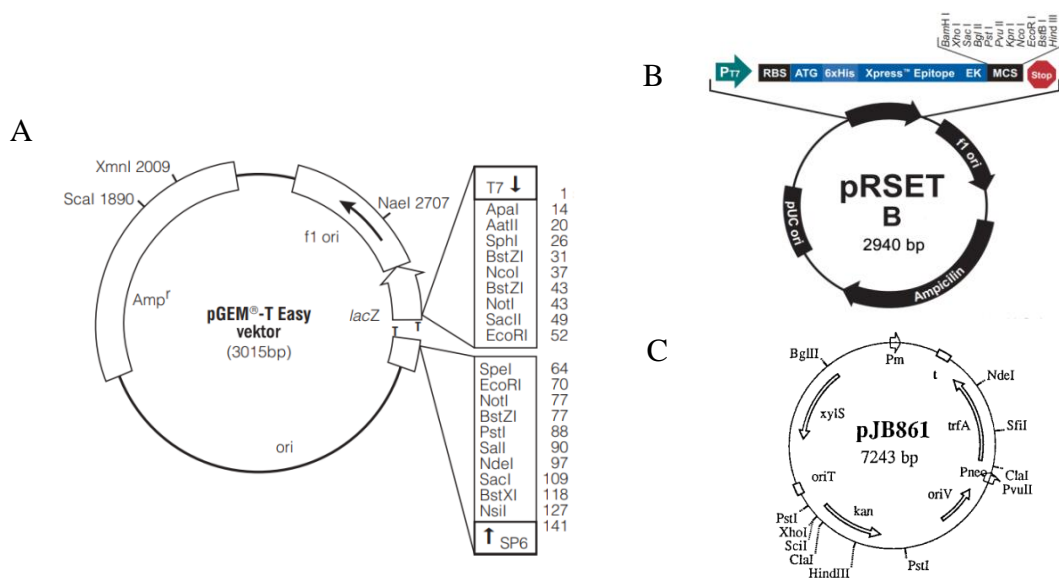
*Amp^r, rezistencija na ampicilin

**Km^r, rezistencija na kanamicin

Tabela 3. Konstrukti korišćeni u radu

Plazmid	Uklonirani gen	Referenca
pGEM-mcoCA3	738 bp <i>mco</i> gen za multi-bakar polifenol oksidoreduktazu – lakazu iz soja <i>P. putida</i> CA-3	ovaj rad
pGEM-mcoKT	741 bp <i>mco</i> gen za multi-bakar polifenol oksidoreduktazu – lakazu iz soja <i>P. putida</i> KT2440	ovaj rad
pGEM-cbp	348 bp <i>cbp</i> gen za protein koji sadrži jezgro od 4 zavojnice i vezuje bakar, iz soja <i>P. putida</i> F6	ovaj rad
pGEM-copA	896 bp <i>copA</i> gen za multi-bakar oksidazu sa sistemom za rezistenciju na bakar, iz soja <i>P. putida</i> F6	ovaj rad
pGEM-lipA_561	891 bp <i>lipA</i> gen za lipazu A, iz soja <i>P. chlororaphis</i> B-561	ovaj rad
pGEM-lipA_PAO1	936 bp <i>lipA</i> gen za lipazu A, iz soja <i>P. aeruginosa</i> PAO1	ovaj rad
pGEM-plcB	987 bp <i>plcB</i> gen za fosfolipazu C, iz soja <i>P. aeruginosa</i> PAO1	ovaj rad
pRSETB-mcoCA3	738 bp <i>mco</i> gen za multi-bakar polifenol oksidoreduktazu – lakazu iz soja <i>P. putida</i> CA-3	ovaj rad
pRSETB-mcoKT	741 bp <i>mco</i> gen za multi-bakar polifenol oksidoreduktazu – lakazu iz soja <i>P. putida</i> KT2440	ovaj rad
pRSETB-cbp	348 bp <i>cbp</i> gen za protein koji sadrži jezgro od 4 zavojnice i vezuje bakar, iz soja <i>P. putida</i> F6	ovaj rad
pRSETB-copA	1896 bp <i>copA</i> gen za multi-bakar oksidazu sa sistemom za rezistenciju na bakar, iz soja <i>P. putida</i> F6	ovaj rad
pJB861-lipA_561	891 bp <i>lipA</i> gen za lipazu A, iz soja <i>P. chlororaphis</i> B-561	ovaj rad
pJB861-lipA_PAO1	936 bp <i>lipA</i> gen za lipazu A, iz soja <i>P. aeruginosa</i> PAO1	ovaj rad
pJB861-plcB	987 bp <i>plcB</i> gen za fosfolipazu C, iz soja <i>P. aeruginosa</i> PAO1	ovaj rad

pGEM-T Easy vektor sistem (Promega, Medison, Viskonsin, SAD) prilagođen je za direkciono kloniranje PCR proizvoda procesom „TA ligacije”. Upotrebom polimeraza koje nemaju 3’ – 5’ egzonukleaznu aktivnost dobijaju se PCR proizvodi na čijim se 3’ krajevima nalaze nesparesni dezoksiadenozini (White 1997). Linearizovani vektor poseduje nesparesne dezoksitimidine na 3’ krajevima oba DNK lanca i na taj način osigurano je sparivanje vektora i fragmenta umnoženog PCR metodom. Takođe, vektor poseduje T7 promotor, *lac* operon, mesto za vezivanje M13 prajmera (Tabela 5), region za višestruko kloniranje (*eng. multiple cloning site*, MCS), niz ciljnih sekvenci za restrikcione enzime, kao i gen za otpornost na antibiotik ampicilin. Mapa cirkularnog vektora prikazana je na Slici 19A.



Slika 19. A: pGEM-T Easy vektor, slika je preuzeta sa stranice www.promega.com i prerađena, B: pRSET B vektor, slika je preuzeta sa internet stranice www.thermofisher.com i prerađena) C: pJB861 vektor, slika je preuzeta iz rada Blatnija i saradnika (Blatny, Brautaset et al. 1997)

Za ekspresiju gena koji kodiraju enzime lakaze korišćen je vektor pRSET B. pRSET B vektor poseduje T7 promotor, DNK sekvencu koja kodira šest uzastopnih aminokiselina histidina na N-terminalnom domenu rekombinantnog proteina za olakšano prečišćavanje, MCS, T7 terminator, kao i gen za otpornost na antibiotik ampicilin (Slika 19B).

Geni koji kodiraju enzime lipaze klonirani su u ekspresioni vektor pJB861 (Slika 19C) koji u svom sastavu ima Pm promotor, MCS i gen za otpornost na antibiotik kanamicin (Blatny, Brautaset et al. 1997).

Procesi izolacije, ligacije, transformacije, i restrikcione analize plazmida opisani su u odeljcima 3.5.2, 3.5.5, 3.5.7 i 3.5.8.

3.3. Reagensi i kitovi

Hemikalije: Soli, kao što su NaCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, MgSO₄, CaCl₂, NH₄Cl, CuSO₄, vitamini B grupe, antibiotici (ampicilin, kanamicin), boje (rodamin B, komazi brilijant plava, bromfenol plava), hidrolizat kazeina, kao i gvajakol, ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)), fenilsirćetna kiselina i *m*-toluična kiselina, kupljeni su od kompanije „Sigma-Aldrich“ (Sent Luis, Misuri, SAD). Reagensi X-Gal (5-bromo-4-hloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid) i IPTG (izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid) kupljeni su od kompanije „Thermo Scientific“ (Vubern, Masačusets, SAD), a *p*-NPP (*p*-nitrofenil palmitat) od „Alfa Aesar“ (Hejvril, Masačusets, SAD). Bakto-tripton,

kvašćev ekstrakt, glukoza, bakteriološki agar i druge komponente za medijume kupljeni su od kompanije „Becton Dickinson“ (Sparks, Merilend, SAD). Agarozna je kupljena od kompanije „SERVA Electrophoresis GmbH“ (Hajdelberg, Nemačka). U eksperimentima je korišćeno ekstra devičansko, hladno ceđeno maslinovo ulje „Altis“ kiselosti 0 – 0,8 % (Grčka).

Kitovi, oligonukleotidi i enzimi: „KAPA Taq“, „KAPA LongRange HotStart“ i drugi kitovi za PCR kupljeni su od „KAPA Biosystems“ (Vubern, Masačusets, SAD). Oligonukleotidi (prajmeri) su kupljeni od kompanije „Invitrogen“ (Darmštat, Nemačka), a nukleotidi, odnosno dNTP smeša od kompanije „Applied Biosystems“ (Foster Siti, Kalifornija, SAD). „QIAprep Spin Miniprep“, „QIAEX II Gel Extraction“ i „QIAquick PCR purification“ kitovi su kupljeni od kompanije „QIAGEN“ (Hilden, Nemačka). Restrikcioni enzimi korišćeni u ovom radu su kupljeni od kompanije „Fermentas“ (Voltam, Masačusets, SAD). „pGEM-T Easy Vector System“ kit za ligaciju kupljen je od kompanije „Promega“ (Medison, Viskonsin, SAD).

Hromatografske kolone kupljene su od proizvođača „GE Healthcare“ (Bakinhemšir, Engleska).

3.4. Kultivacija bakterijskih sojeva

3.4.1. Hranljive podloge

LB (eng. Luria Broth): Za pravljenje bogate tečne hranljive podloge u destilovanu vodu su dodati sledeći sastojci: 10 g l⁻¹ bakto-triptona, 10 g l⁻¹ NaCl i 5 g l⁻¹ kvašćevog ekstrakta, a sterilizacija je vršena u autoklavu 15 min na 121 °C. LB podloga je u ovom radu korišćena za gajenje prekonocnih kultura sojeva, pripremu stokova za dugoročno čuvanje na -80 °C, „oživljavanje“ ćelija u procesu transformacije. Dodavanjem antibiotika ampicilina (100 µg ml⁻¹) i kanamicina (30 µg ml⁻¹) vršena je selekcija sojeva sa odgovarajućim vektorima (odeljak 3.2.).

LA podloga (eng. Luria Agar): Ova čvrsta podloga pravljen je od istih sastojaka kao i LB tečna podloga uz dodavanje 15 g l⁻¹ agara. Medijum je sterilisan 15 min na 121 °C. LA podloga korišćena je za rast i održavanje bakterija u Petri šoljama. Selekcija rekombinantnih sojeva vršena je dodavanjem različitih antibiotika (u zavisnosti od soja): ampicilina (100 µg ml⁻¹), odnosno kanamicina (30 µg ml⁻¹), X-Gal (5-bromo-4-hloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid, 40 µg ml⁻¹) i IPTG (izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid) 1 mM, finalno,. Hranljiva čvrsta podloga je uz dodavanje odgovarajućeg supstrata korišćena i u eksperimentima u kojima je vršen odabir sojeva na osnovu enzimske aktivnosti (odeljci 3.7.9.1 i 3.7.10.1).

Minimalni medijum MSM (eng. Mineral Salts Medium): Za pripremu ovog medijuma u destilovanoj vodi se rastvarano je 9 g l⁻¹ Na₂HPO₄×12 H₂O, 1,5 g l⁻¹ KH₂PO₄, 1 g l⁻¹ NH₄Cl i 5 g l⁻¹ hidrolizata kazeina, nakon čega je vršena sterilizacija u trajanju od 15 min na 121 °C. Pre inokulacije bakterijskim kulturama medijumu su dodavane sledeće komponente (prikazane su finalne koncentracije): 2 % glukoza (w/v) (osim u slučaju dodavanja drugog izvora ugljenika), 1 mM MgSO₄, 0,25 mM CaCl₂, 1 mM rastvor elemenata u tragovima (eng. Trace element solution, (Schlegel, Kaltwasser et al. 1961)) i rastvor vitamina. **Rastvor vitamina (eng. Vitamin solution)** sadržao je: biotin (1,1 mg l⁻¹), folnu kiselinu (1,1 mg l⁻¹), 4-amino-benzoevu kiselinu (110 mg l⁻¹), riboflavin (110 mg l⁻¹), pantotensku kiselinu (220 mg l⁻¹), piridoksin hidrohlorid (220 mg l⁻¹), tiamin hidrohlorid (220 mg l⁻¹) i nikotinamid (220 mg l⁻¹). Ovaj rastvor pripreman je u mešavini 0,5 l destilovane vode i 0,5 l etanola visoke čistoće i čuvan je na temperaturi -20 °C.

Minimalni medijum M9 (eng. M9 mineral medium): Za pravljenje ove podloge je u destilovanoj vodi rastvarano 5 g l⁻¹ hidrolizata kazeina. Nakon sterilizacije 15 min na 121 °C, medijum je kompletiran sa sledećim komponentama (prikazane su finalne koncentracije): 1× koncentrovani rastvor M9 soli, 1 % glukoza (w/v) (osim u slučaju dodavanja drugog izvora ugljenika), 2 mM MgSO₄, 0,25 mM CaCl₂, 1 mM rastvor elemenata u tragovima (eng. Trace element solution, (Schlegel, Kaltwasser et al. 1961) i 1 mM rastvor vitamina (sastav rastvora vitamina dat je u prethodnom pasusu). Sterilisan stok rastvor M9 soli (5× koncentrovan rastvor) sadržao je: 192 g l⁻¹ Na₂HPO₄×7 H₂O, 45 g l⁻¹ KH₂PO₄, 2,5 g l⁻¹ NaCl i 5 g l⁻¹ NH₄Cl u destilovanoj vodi.

3.4.2. Uslovi gajenja bakterijskih sojeva i indukcija ekspresije enzima lakaza i lipaza

Minimalni medijumi korišćeni su za kultivaciju sojeva kojima su za rast umesto bogate hranljive podloge nuđeni specifični izvori ugljenika, kao što je 1 % maslinovo ulje (v/v). Takođe, u ovim podlogama gajeni su divlji i rekombinantni sojevi kojima je odgovarajućim reagensima indukovana ekspresija željenih enzima – lakaza i lipaza.

Ekspresija enzima lakaza u divljim sojevima podsticana je dodavanjem fenolnog jedinjenja 5 mM fenilsirćetne kiseline, kao i 0,35 mM CuSO₄ (finalno) u kompletiran medijum, dok je za indukciju ekspresije lipaza korišćeno 1 % maslinovo ulje (finalno). Sojevi su gajeni 72 h na temperaturi 30 °C, uz intenzivnu aeraciju na 180 obrt min⁻¹.

Dodavanjem antibiotika ampicilina (100 µg ml⁻¹, finalno) u podloge vršena je selekcija sojeva transformisanih pGEM-T Easy vektorima i rekombinantnim pRSET B vektorima, dok je kod rekombinantnih pJB861 vektora dodavan kanamicin (30 µg ml⁻¹, finalno). Prekonoćna kultura rekombinantnih sojeva razblaživana je do 1 % u kompletiranim tečnim medijumima, a gajenje se odvijalo na temperaturi od 30 °C za *Pseudomonas* sp. sojeve i 37 °C za *E. coli*, uz intenzivnu aeraciju na 180 obrt min⁻¹ do optičke gustine kulture od 0,5 na 540 nm (*Pseudomonas* sp.) i 600 nm (*E. coli*). Nakon toga, držani su 5 min na temperaturi od 4 °C. Indukcija ekspresije lakaza vršena je dodavanjem 1 mM IPTG, finalno, dok je za indukciju lipaza korišćen rastvor 2 mM *m*-toluične kiseline u 70 % etanolu (v/v), finalno. Gajenje je nastavljeno na temperaturi od 17 °C sledećih 48 h. Izolacija ukupnih proteina iz bakterijskih kultura opisana je u odeljku 3.7.1.

3.4.3. Čuvanje i održavanje bakterijskih kultura

Za dugoročno čuvanje kultura pripremani su 20 % glicerolski stokovi. Divlji sojevi su preko noći gajeni u LB podlozi, dok je za gajenje rekombinantnih sojeva bilo neophodno dodati odgovarajući antibiotik (odeljak 3.4.2). Prekonoćna kultura (0,8 ml) mešana je sa 0,2 ml sterilnog 80 % glicerola (v/v). Stokovi su čuvani na -80 °C. Za potrebe eksperimenata bakterijske kulture su vađene iz stoka, zasejavane na čvrstu LA podlogu (uz odgovarajući antibiotik za rekombinantne sojeve), inkubirane u toku noći na odgovarajućoj temperaturi (30 °C za *Pseudomonas* sojeve i 37 °C za *E. coli* sojeve) i čuvane na temperaturi 4 °C. Presejavanje sojeva vršeno je u intervalima od dve nedelje, u trajanju od nekoliko meseci. Nakon toga, sojevi su ponovo vađeni iz stokova na sveže podloge.

3.5. Molekularno biološke metode

3.5.1. Izolacija ukupne DNK iz bakterijskih sojeva

Izolacija ukupne DNK iz bakterijskih sojeva rađena je po metodi Nikodinović i saradnika (Nikodinovic, Barrow et al. 2003). Ova metoda je razvijena najpre za bakterije roda *Streptomyces*, ali se pokazala kao veoma efikasna za izolaciju DNK iz različitih bakterijskih rodova. Čelije su gajene u LB medijumu preko noći na 30 °C uz aeraciju od 180 obrt min⁻¹. Čelijski talog dobijen centrifugiranjem 5 min na 4000 × g (Eppendorf Centrifuge 5804R, Hamburg, Nemačka) resuspendovan je u rastvoru za lizu (0,3 M saharoza, 25 mM EDTA (*eng.* Ethylenediaminetetraacetic acid) i 25 mM Tris-HCl pH 7,5) nakon čega mu je dodato 2 U RNaze A (Fermentas, Voltam, Masačusets, SAD) i lizozim (Sigma, Sent Luis, Misuri, SAD) u koncentraciji od 1 mg ml⁻¹. Liza je vršena inkubiranjem 30 min na 37 °C. Potom je reakciji dodavana desetina njene zapremine 10 % (w/v) SDS (*eng.* sodium dodecyl sulfate) deterdženta i 0,5 mg ml⁻¹ Proteinaze K (Fermentas, Voltam, Masačusets, SAD). Inkubacija je nastavljena 90 min na 55 °C uz povremeno mešanje inverzijom. Na kraju je dodavana trećina zapremine reakcije 5 M NaCl i jedna zapremina hloroforma (Lachner, Neratovice, Češka) nakon čega je uzorak inkubiran 30 min na 25 °C uz čestu inverziju. Nakon centrifugiranja (20 min, 5000 × g, Eppendorf Centrifuge 5804R, Hamburg, Nemačka) gornja, vodena faza je prebacivana pipetom sa širokim vrhom u čistu epruvetu i dodavana je jedna zapremina izopropanola (Macron Fine Chemicals™, VWR International, Radnor, Pensilvanija, SAD). DNK je namotavana na zatopljenu Pasterovu pipetu, prebacivana u čistu epruvetu zapremine 1,5 ml i prana 70 % (v/v) etanolom. Nakon pranja i sušenja taloga, DNK je rastvarana u 10 % EB puferu (10 mM Tris-HCl pH 8,5). Kvalitet i kvantitet izolovane DNK utvrđivani su spektroskopski očitavanjem A_{260/280} (NanoVue, GE Healthcare, Bakinhemšir, Engleska), kao i agaroznom gel elektroforezom (odjeljak 3.5.4).

3.5.2. Izolacija plazmida

Izolacija plazmida vršena je iz 2 ml čelijske kulture transformisanih sojeva gajenih preko noći na 30 °C (*Pseudomonas* sp.) i 37 °C (*E. coli*) u tečnoj LB podlozi s dodatkom odgovarajućih antibiotika (odjeljak 3.4.2).

Plazmidna DNK izolovana je pomoću QIAprep Spin Miniprep kita (QIAGEN, Hilden, Nemačka) prema uputstvu proizvođača. Za proveru uspešnosti izolacije plazmida korišćena je metoda agarozne gel elektroforeze (3.5.4). Izolovani plazmidi korišćeni su u metodama ligacije (3.5.5), transformacije (3.5.7), restrikcione digestije (3.5.8) i sekvenciranja (3.5.9).

3.5.3. Sinteza DNK u lančanoj reakciji polimeraze (PCR)

Lančana reakcija polimeraze (*eng.* Polymerase Chain Reaction, PCR) zasniva se na tri procesa koji se sukcesivno ponavljaju (White 1997):

- *in vitro* denaturacija dvolančane DNK matrice,
- hibridizacija (aniling od *eng.* annealing) prajmera sa matricom na osnovu komplementarnosti baza
- elongacija prajmera, odnosno umnožavanje ostatka ciljne sekvence aktivnošću DNK polimeraze.

Za umnožavanje gena koji kodiraju lakazu iz divljih sojeva roda *Pseudomonas* korišćeni su izrođeni prajmeri i „touchdown“ PCR metoda. U ovoj metodi se u prvih nekoliko ciklusa temperatura povećava malo iznad pretpostavljene temperature hibridizacije, a onda sledi postepeno spuštanje (najčešće za 1 °C) u narednim ciklusima, sve do zadate „touchdown“ temperature, na kojoj se odvija sledećih 10 – 15 ciklusa (Don, Cox et al. 1991).

Sva umnožavanja su vršena u reakcijama zapremine 50 µl na aparatu GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster Siti, Kalifornija, SAD). Korišćeni prajmeri prikazani su u Tabeli 5, a PCR programi u Tabeli 4.

Tabela 4. Programi korišćeni za PCR

Gen	Temperatura	Vreme	Faza reakcije	Broj ciklusa
lakaza (svi sojevi roda <i>Pseudomonas</i>)	95 °C	5 min	Denaturacija DNK	1
	95 °C	30 s		
	55 °C	30 s	$\Delta=1^{\circ}\text{C}^*$ Umnožavanje DNK**	8
	72 °C	1 min		
	95 °C	30 s		
	47 °C	30 s	Umnožavanje DNK	25
	72 °C	1 min		
<i>mcoCA3</i> iz <i>P. putida</i> CA-3 i <i>mcoKT</i> iz <i>P. putida</i> KT2440	72 °C	5 min	Finalna elongacija	1
	95 °C	2 min	Denaturacija DNK	1
	95 °C	15 s		
	55 °C	15 s	Umnožavanje DNK	35
	72 °C	1 min		
<i>cbp</i> iz <i>P. putida</i> F6	72 °C	10 min	Finalna elongacija	1
	95 °C	5 min	Denaturacija DNK	1
	95 °C	30 s		
	55 °C	30 s	Umnožavanje DNK	35
	72 °C	30 s		
<i>copA</i> iz <i>P. putida</i> F6	72 °C	5 min	Finalna elongacija	1
	94 °C	3 min	Denaturacija DNK	1
	94 °C	25 s		
	50 °C	15 s	Umnožavanje DNK	35
	72 °C	7 min		
	72 °C	7 min	Finalna elongacija	1

<i>lipA</i> iz <i>P. chlororaphis</i> B-561	95 °C	2 min	Denaturacija DNK	1
	55 °C	15 s		
	72 °C	15 s	Umnožavanje DNK	35
	72 °C	10 min		
	72 °C	5 min	Finalna elongacija	1
<i>lipA</i> iz <i>P. aeruginosa</i> PAO1	95 °C	7 min	Denaturacija DNK	1
	95 °C	1 min		
	55 °C	30 s	Umnožavanje DNK	35
	72 °C	1 min		
	72 °C	5 min	Finalna elongacija	1
<i>plcB</i> iz <i>P. aeruginosa</i> PAO1	95 °C	3 min	Denaturacija DNK	1
	95 °C	30 s		
	65 °C	30 s	Umnožavanje DNK	35
	72 °C	1 min		
	72 °C	5 min	Finalna elongacija	1

*Korišćena je „touchdown“ PCR metoda

**Pod umnožavanjem DNK se podrazumeva denaturacija DNK, aniling prajmera i elongacija.

3.5.3.1. Umnožavanje gena koji kodiraju lakaze

Geni koji kodiraju lakaze kod sojeva roda *Pseudomonas* iz laboratorijske kolekcije umnožavani su upotrebom izrođenih prajmera PS_LACF/PS_LACR (Tabela 5) u „touchdown“ PCR metodi (odjeljak 3.5.3). Specifičnim prajmerima CA3F/CA3R i KTF/KTR sa uvedenim restrikcionim mestima *Bam*HI i *Hind*III (Tabela 5) umnožavana je lakaza kod sojeva *P. putida* CA3 i *P. putida* KT2440. Za umnožavanje gena *cbp* i *copA* iz soja *P. putida* F6 korišćeni su prajmeri CbpF/CbpR i CopAF/CopAR sa restrikcionim mestima *Nhe*I i *Hind*III (Tabela 5). Korišćeni su KAPA Taq PCR kit i KAPA Long Range HotStart PCR kit (odjeljak 3.3).

KAPA Taq PCR reakciona smeša sadržala je (prikazane su finalne koncentracije): 1× KAPA Taq pufer, 1,5 mM MgCl₂, 1 μM svakog prajmera, 0,2 mM svakog nukleotida, 1 U Taq polimeraze i 1 ng DNK matrice.

Gen *copA* je zbog svoje veličine umnožavan KAPA Long Range HotStart DNK polimerazom (0,625 U, finalno). Prajmeri su razblaženi do 0,5 μM, finalno. Ostale komponente PCR reakcione smeše rastvarane su u istim koncentracijama kao i u KAPA Taq PCR reakcijama, a program za umnožavanje gena dat je u Tabeli 4.

3.5.3.2. Umnožavanje gena koji kodiraju lipaze

Upotrebom prajmera navedenih u Tabeli 5 umnožavani su geni za lipazu A (*lipA* 891 bp) iz soja *P. chlororaphis* B-561, kao i lipazu A (*lipA* 936 bp) i fosfolipazu C (*plcB*, 987 bp) iz soja *P. aeruginosa* PAO1. PCR reakcije su pripremane na isti način kao i reakcije za umnožavanje lakaza u skladu sa uputstvima proizvođača kitova (odjeljak 3.5.3.1), a programi korišćeni za umnožavanje ovih gena su prikazani u Tabeli 5.

3.5.4. Agarozna gel elektroforeza

Izolovani plazmidi (odjeljak 3.5.2), ukupna DNK iz bakterijskih sojeva (odjeljak 3.5.1), PCR proizvodi (odjeljak 3.5.3) i proizvodi restrikcione digestije (odjeljak 3.5.8) analizirani su horizontalnom elektroforezom na (0,8 % – 1 % w/v) agaroznim gelovima pripremanim u TBE puferu (TBE od Tris, Borna kiselina, EDTA). Za pripremu TBE pufera sledeće komponente rastvorene su u destilovanoj vodi: 10,9 g l⁻¹ TRIS, 5,56 g l⁻¹ borne kiseline i 0,93 g l⁻¹ EDTA. Etidijum bromid, interkalirajući agens za fluorescentno obeležavanje nukleinskih kiselina, dodavan je u gel za elektroforezu u finalnoj koncentraciji od 0,5 µg ml⁻¹. Elektroforetsko razdvajanje vršeno je pri konstantnom naponu električnog polja od 8 V po dužnom centimetru gela.

Veličina DNK fragmenata je određivana poređenjem njihove elektroforetske pokretljivosti sa pokretljivošću standarda poznate molekulske mase. Kao markeri molekulske veličine korišćeni su: 100 bp DNA ladder (100 – 3000 bp) i 1 kb DNA ladder (250 – 10000 bp) od proizvođača NIPPON Genetics EUROPE GmbH (Diren, Nemačka), peqGOLD 100 bp DNA-Ladder Plus (100 – 3000 bp) od proizvođača VWR International (Radnor, Pensilvanija, SAD), GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder (75 – 20000 bp) od proizvođača Thermo Fisher Scientific (Voltam, Masačusets, SAD).

Razdvajanje uzoraka praćeno je kretanjem fronta indikatorske boje (bromfenol plava), a detekcija uzoraka na gelu vršena je osvetljavanjem gela ultraljubičastom svetlošću talasne dužine 260 nm na aparatu BioDoc Analyze (Biometra, Getingen, Nemačka).

3.5.5. Ligacija DNK fragmenata

Spajanje umnoženih DNK fragmenata i željenih vektora posredstvom enzima ligaze u odgovarajućem puferu predstavlja proces ligacije, veoma važan korak u molekularnom kloniranju, odnosno kreiranju rekombinantne DNK. U ovom radu korišćeni su vektor za direkciono kloniranje pGEM-T Easy i ekspresioni vektori pRSET B i pJB861, opisani u odeljku 3.2. PCR proizvodi i DNK fragmenti dobijeni tretiranjem restrikcionim enzimima analizirani su agaroznom gel elektroforezom. Ukoliko su fragmenti odgovarali očekivanim veličinama, isecani su čistim ostrim skalpelom iz agaroznog gela i prečišćavani QIAEX II Gel Extraction kitom (QIAGEN, Hilden, Nemačka) u skladu sa uputstvom proizvođača. Vektori i prečišćeni fragmenti su prvo odvojeno inkubirani 5 min na 50 °C, zatim ostavljani 5 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga je ligaciona smeša sa vektorom, prečišćenim fragmentom i enzimom ligazom u puferu inkubirana 1 h na 25 °C, a zatim preko noći na 4 °C.

Proces ligacije bitan je i kod prebacivanja željenih gena iz vektora za direkciono kloniranje (pGEM-T Easy) u ekspresioni vektor (pRSET B ili pJB861). Nakon isecanja fragmenta od interesa iz vektora restrikcionim enzimima (odjeljak 3.5.8), vršena je priprema ekspresionog vektora – linearizacija i defosforilacija slobodnih krajeva vektora FastAP alkalnom fosfatazom (Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD) po uputstvu proizvođača. Ovaj korak neophodan je kako bi se umanjila mogućnost intramolekulske ligacije samog vektora. Vektori i fragmenti su prvo inkubirani 5 min na 50 °C, zatim 5 min na sobnoj temperaturi. Ligacija pripremljenog pRSET B, odnosno

pJB861 vektora i fragmenta sa kompatibilnim krajevima vršena je pomoću T4 ligaze (Promega, Medison, Viskonsin, SAD), reakcija je inkubirana 1 h na 25 °C i preko noći na 4 °C.

Ligacione smeše su nakon inkubacije na 4 °C procesom transformacije ubacivane u odgovarajuće ćelije (odjeljak 3.5.6). Konstrukti (Tabela 2, odeljak 3.2) su nakon izolacije iz transformisanih sojeva proveravani restrikcionom analizom (odjeljak 3.5.8) i sekvenciranjem (odjeljak 3.5.9).

3.5.6. Priprema kompetentnih ćelija

U ovom radu su za transformaciju korišćene tri vrste hemijski kompetentnih ćelija: *E. coli* DH5 α , *E. coli* XL10 GOLD i *E. coli* BL21[DE3] (Tabela 1). Elektrokompetentne *P. putida* KT2440 ćelije pripremane su za eksperimente transformacije po izmenjenom protokolu (Choi, Kumar et al. 2006).

Komercijalne ultrakompetentne ćelije *E. coli* XL10 GOLD sa najvećom efikasnošću među hemijski kompetentnim ćelijama, upotrebljavane su u zahtevnijim eksperimentima transformisanja ćelija velikim plazmidima. Kompetentne *E. coli* DH5 α ćelije korišćene su za propagaciju rekombinantnih pGEM-T Easy plazmida sa ubačenim genima za lakazu i lipazu, dok su za ekspresiju rekombinantnih proteina korišćene *E. coli* BL21[DE3] ćelije (Tabela 1).

E. coli DH5 α i BL21[DE3] ćelije pripremane su gajenjem u LB medijumu na 37 °C uz intenzivnu aeraciju od 180 obrt min⁻¹, do optičke gustine kulture od 0,5 na 600 nm (Hanahan 1983). Nakon toga je ćelijski rast zaustavljan hlađenjem kulture (10 min, 4 °C). Ohlađena kultura je taložena (10 min, 3000 \times g, 4 °C, Sorvall SS34, RC-5B Super Speed Centrifuge; Du Pont Instruments, Delaver, SAD) i ćelije iz taloga su resuspendovane u istoj zapremini hladnog 0,1 M CaCl₂ i inkubirane 15 min na ledu. Nakon inkubacije, ćelije su centrifugirane (10 min, 3000 \times g, 4 °C, Sorvall SS34, RC-5B Super Speed Centrifuge; Du Pont Instruments, Delaver, SAD), resuspendovane u 3 ml hladnog 20 % (v/v) glicerola i 0,1 M CaCl₂ i inkubirane 15 min na 4 °C. Tretiranje sa CaCl₂ je vršeno da bi se u procesu transformacije ovih ćelija ćelijski zid učinio propustljivijim i da bi se olakšalo vezivanje plazmidne DNK za ćelijsku membranu. Po završenoj inkubaciji, ćelije su podeljene u alikvote zapremine 50 μ l koji su trenutno zamrzavani u tečnom azotu i čuvani na -80 °C do korišćenja.

3.5.7. Transformacija kompetentnih ćelija

Za proces transformacije, hemijski kompetentne *E. coli* ćelije (čuvane na -80 °C) otapane su postepeno na 4 °C. Alikvotu kompetentnih ćelija zaremne 50 μ l dodavano je 2 μ l ligacione smeše ili 1 μ l rekombinantnog plazmida (odjeljak 3.5.5) i reakcija je inkubirana 30 min na 4 °C. Pre dodavanja ligacione smeše XL10-Gold ultrakompetentne ćelije su po uputstvu proizvođača inkubirane 15 min na 4 °C sa 2 μ l β -merkaptetanola. Inkubacija i svi dalji koraci do zasejavanja vršeni su u Falcon[®] (Korning, Njujork, SAD) epruvetama sa zaobljenim dnom i dvostepenim zatvaračem podešenim za gajenje u aerobnim uslovima, zapremine 14 ml. Nakon toga, ćelije su izlagane termičkom stresu: 45 s na 42 °C, zatim 2 min na 4 °C, a nakon toga „oživljavane“ dodavanjem 0,95 ml neselektivnog bogatog medijuma i inkubirane na 37 °C, uz intenzivnu aeraciju mešanjem na orbitalnom šejkeru (200 obrt min⁻¹) u trajanju od 1 – 2 h (1 h za XL10-Gold, 2 h za DH5 α i BL21[DE3]). Nakon gajenja, ćelije su obarane u centrifugi 15-20 s na 5 000 \times g, 25 °C (Eppendorf Centrifuge 5415 D, Hamburg, Nemačka), nežno resuspendovane u ~0,2 ml sveže hranljive podloge i utrljavane u selektivne podloge. Rekombinantni sojevi sa pGEM-T Easy vektorom su zasejavani na selektivne LA podloge sa dodatkom ampicilina (100 μ g ml⁻¹, finalno), IPTG (1 mM, finalno), X-Gal (40 μ g ml⁻¹, finalno), dok su sojevi sa pRSET B vektorom zasejavani na LA podloge sa dodatim ampicilinom (100 μ g ml⁻¹, finalno). Zasejane podloge su inkubirane na 37 °C preko noći. Efikasnost transformacije bila je od 10⁵ - 10⁷ transformanata po 1 μ g DNK.

Rekombinantni pJB861 vektori su zbog svoje veličine elektroporacijom ubacivani u elektrokompetentne *P. putida* KT2440 ćelije. Elektroporacija je vršena u specijalnoj kiveti sa širinom od 0,1 cm (BioRad, Hercules, Kalifornija, SAD) na elektroporatoru (Gene Pulser, BioRad, Hercules, Kalifornija, SAD) pri sledećim parametrima: 1,2 kV, 25 mF, 200 Ω (Chen, Yang et al. 2010). Ovaj princip podrazumeva primenu elektrošoka na ćelije kako bi se povećala propustljivost ćelijske membrane, odnosno povećala efikasnost ulaska plazmida. Nakon transformacije elektroporacijom, ćelijama je dodavano 0,95 ml bogate hranljive podloge. Gajenje je nastavljeno na 30 °C, u uslovima intenzivne aeracije, u trajanju od 2 h. Selekcija transformanata vršena je na hranljivim LA podlogama sa dodatkom antibiotika kanamicina (30 $\mu\text{g ml}^{-1}$, finalno), na 30 °C, do pojave vidljivih kolonija.

3.5.8. Restrikciona analiza plazmida

Odabrane kolonije sojeva sa rekombinantnim vektorima zasejavane su u tečni LB medijum, a selektivni pritisak vršen je dodavanjem odgovarajućeg antibiotika (odeljak 3.4.2). Plazmidi su izolovani iz prekonocnih kultura gajenih na 30 °C (*Pseudomonas* sp.) ili 37 °C (*E. coli*), uz mešanje na orbitalnom šejkeru od 180 obrt min^{-1} . Izolovani plazmidi (odeljak 3.5.2) analizirani su restrikcijom digestijom. Korišćeni su komercijalni restrikcioni enzimi i odgovarajući puferi, a količina enzima, pufera i temperatura inkubacije su određivani prema savetu proizvođača. Restrikcioni enzimi korišćeni u ovom radu su:

- *EcoRI* (prepoznaje šest nukleotidnih parova G^AAATTC)
- *BamHI* (prepoznaje šest nukleotidnih parova G^AGATCC)
- *HindIII* (prepoznaje šest nukleotidnih parova A^AAGCTT)
- *KpnI* (prepoznaje šest nukleotidnih parova GGTAC^AC)
- *NotI* (prepoznaje osam nukleotidnih parova GC^AGGCCGC)
- *NheI* (prepoznaje šest nukleotidnih parova G^ACTAGC)

Analiza restrikcijom isečenih plazmida i fragmenata vršena je metodom agarozne gel elektroforeze (odeljak 3.5.4).

3.5.9. Sekvenciranje DNK

Sekvenciranje DNK vršeno je na aparatu 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster Siti, Kalifornija, SAD), uz upotrebu komercijalnog kita za sekvenciranje BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster Siti, Kalifornija, SAD). Sekvencirani su prečišćeni fragmenti dobijeni PCR-om, koji odgovaraju veličini umnožavanog gena, kao i prečišćeni plazmidi sa ukloniranim fragmentima. PCR fragmenti željene veličine isecani su sterilnim skalpelom iz agaroznog gela i prečišćavani QIAEX II Gel Extraction kitom (QIAGEN, Hilden, Nemačka) po uputstvu proizvođača, dok su plazmidi prečišćavani po proceduri iz odeljka 3.5.2. Proces sekvenciranja započinjao je PCR reakcijom u kojoj su korišćeni prajmeri kojim je dati gen umnožen (u slučaju PCR fragmenta), i univerzalni M13 i T7 prajmeri koji se vezuju za tačno utvrđena mesta na plazmidu. Svi prajmeri su razblaženi do koncentracije 3,2 pmol.

Reakciona smeša za sekvenciranje (8 μl) sadržala je: „Ready Reaction Mix“ (3 μl), prajmer kojim je vršeno sekvenciranje (koncentracije 3,2 pmol) i DNK koja se sekvencira (1 – 2 ng na 100 bp ukoliko se sekvencira PCR proizvod, odnosno 150 – 300 ng plazmida). Prvi korak sekvenciranja rađen je na PCR aparatu (GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems, Foster Siti, Kalifornija, SAD) korišćenjem sledećeg programa:

- 1 ciklus inicijalne denaturacije (1 min, 96 °C)
- 25 ponovljenih ciklusa: 1) denaturacija DNK matrice (10 s, 96 °C)
2) hibridizacija prajmera i jednolančane DNK matrice (5 s, 55 °C)
3) elongacija (4 min, 60 °C).

Nevezani obeleženi nukleotidi uklanjani su dodavanjem 40 µl rastvora A (1,2 ml 3 M natrijum acetata (pH 5,2), 25 ml 96 % (v/v) etanola i 5,8 ml destilovane vode) i centrifugiranjem 10 min, 10 000 × g, 25 °C (Eppendorf Centrifuge 5415 D, Hamburg, Nemačka). Nakon odlivanja supernatanta talog je ispiran sa 200 µl 70 % (v/v) etanola i centrifugiran (10 min, 10 000 × g, Eppendorf Centrifuge 5415 D, Hamburg, Nemačka). Po odlivanju supernatanta korak ispiranja ponavljan je još jednom. Talog je sušen i rastvaran u 25 µl formamida (Hi-Di Formamide, Applied Biosystems, Foster Siti, Kalifornija, SAD).

Analiza sekvenci rađena je na aparatu Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer programom SeqAnalyzer, u okviru softverskog paketa samog uređaja.

3.6. Bioinformatički alati

U ovom radu bioinformatički alati su korišćeni za analizu sekvenci na osnovu kojih su napravljeni prajmeri za umnožavanje gena od interesa u sojevima roda *Pseudomonas* iz laboratorijske kolekcije (odlajak 3.6.3), ali i za konsolidaciju podataka dobijenih sekvenciranjem genoma divljeg soja *P. putida* F6 (odlajak 3.6.2).

3.6.1. *In silico* analiza sekvenci za lakaze kod sojeva roda *Pseudomonas*

U proteinskoj bazi podataka UniProt (<http://www.uniprot.org/>) pretraživane su aminokiselinske sekvence proteina sa pretpostavljenom funkcijom lakaza. Analizirane su sekvence 12 sojeva roda *Pseudomonas*: *P. putida* BIRD-1, *P. putida* CSV86, *P. putida* DOT-T1E, *P. putida* F1, *P. putida* GB-1, *P. putida* HB3267, *P. putida* KT2440, *P. putida* ND6, *P. putida* S16, *P. putida* W619, *P. fulva* 12-X i *Pseudomonas* sp. TJI_51. Pristupni brojevi ovih sekvenci u NCBI bazi podataka su sledeći: ADR58365.1, EKX83191.1, AFO46658.1, ABQ76832.1, ABY96581.1, AGA71637.1, AAN66249.1, AFK70163.1, AEJ11201.1, ACA75026.1 AEF23770.1 i EGB99140.1. Za analizu sekvenci korišćeni su softverski alati Evropskog instituta za bioinformatiku (EMBL-EBI):

- EMBOSS Backtranseq (https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_backtranseq/) za prevođenje aminokiselinskih sekvenci u nukleotidne,
- Emboss Needle (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/),
- ClustalΩ (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/), kao i
- ClustalX 2.1 (<https://clustalx.software.informer.com/2.1/>) za poravnanje nukleotidnih i aminokiselinskih sekvenci.

Obrada i preklapanje sekvenci gena dobijenih u ovom radu metodom DNK sekvenciranja (odlajak 3.5.9) vršena je u DNA Star SeqMan Pro softveru (DNASTAR Inc., Medison, Viskonsin, SAD), a pretraživanje sličnih sekvenci deponovanih u GeneBank bazi podataka rađeno je u programu BLAST (eng. Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) dostupnom na NCBI serveru.

3.6.2. Analiza sekvence genoma *P. putida* F6

Sekvenciranje genoma divljeg soja *P. putida* F6 Illumina NGS (*eng.* Next-generation sequencing) tehnologijom (Illumina, Inc., San Dijego, Kalifornija, SAD) urađeno je uslužno u kompaniji Microbes NG (Birmingem, Engleska).

Analiza sekvence genoma ovog soja vršena je u MEGA 7 programu (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (<https://www.megasoftware.net/home>). Za dobijanje informacija o potencijalnim funkcijama očitanih gena korišćen je PROKKA softver (Seemann 2014). Nukleotidne sekvence prevedene su u aminokiselinske u EMBOSS Backtranseq programu, poravnanje sekvenci je urađeno u ClustalΩ alatu, a pomoću programa MOTIF (<https://www.genome.jp/tools/motif/>) i Conserved Domains Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) vršeno je pretraživanje motiva i očuvanih proteinskih domena odgovornih za zauzimanje strukture enzima lakaze. U PDBsum bazi podataka koja sadrži sve 3D makromolekulske strukture deponovane u PDB proteinskoj bazi (*eng.* Protein Data Bank) analizirane su aminokiselinske sekvence dobijene u ovom radu i pretraživane slične 3D proteinske strukture (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=index.html>).

3.6.3. Dizajniranje prajmera

Podaci dobijeni bioinformatičkom analizom sekvenci opisanom u odeljku 3.6.1 korišćeni su za dizajniranje prajmera za umnožavanje gena koji kodiraju lakaze i lipaze u sojevima roda *Pseudomonas* iz laboratorijske kolekcije. Kreirana su dva tipa prajmera – izrođeni i specifični. Izrođeni prajmeri predstavljaju kombinaciju različitih oligonukleotida koji na određenim pozicijama poseduju različite nukleotide, te obezbeđuju umnožavanje gena iz srodnih sojeva koji imaju sličnu, ali ne i identičnu nukleotidnu sekvencu, ili onih gena za koje su u bazama podataka dostupne samo aminokiselinske sekvence (Kwok, Chang et al. 1994).

Specifičnim prajmerima za umnožavanje gena koji kodiraju lakazu u sojevima *P. putida* CA-3 i *P. putida* KT2440 dodata su mesta koja prepoznaju restrikcioni enzimi, kao i signal za poliadenilaciju, što prevedenom proteinu omogućava olakšano prečišćavanje na koloni (odeljak 3.7.7.2).

Zbog nedovoljne količine informacija u pretraženim bazama podataka o lakazama iz soja *P. putida* F6, specifični prajmeri za umnožavanje ovih gena su napravljeni sistematizacijom rezultata proisteklih iz softverske analize:

- 1) N-terminalne sekvence prečišćenog proteina odeljak (3.7.7) bioinformatičkim alatima UniProt, EMBOSS Backtranseq, BLAST, ClustalΩ
- 2) sekvence genoma ovog soja (odeljak 3.5.1 i 3.6.2).

Ovim specifičnim prajmerima takođe su dodata restrikciona mesta radi kloniranja gena u ekspresioni vektor, kao i signal za poliadenilaciju.

Specifični prajmeri za umnožavanje lipaza napravljeni su na osnovu sekvenci gena koji kodiraju lipazu A (AAG06250) i fosfolipazu C (AAG03416.1) iz soja *P. aeruginosa* PAO1, kao i lipazu A iz *P. chlororaphis* PA23 (AIC17768.1), takođe preuzetih iz UniProt baze podataka.

Analiza svih napravljenih prajmera na potencijalno formiranje dimera i struktura ukosnica izvršena je u OligoAnalyzer programu (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). Za sekvenciranje fragmenata ukloniranih u pGEM-T Easy i pRSET B vektore korišćeni su univerzalni M13 i T7 prajmeri. Svi prajmeri upotrebljeni u ovom radu prikazani u Tabeli 5.

Tabela 5. Sekvence prajmera korišćenih u ovom radu

Naziv	Sekvenca (5' – 3') i restrikcionno mesto	Referenca
PS_LACF1 PS_LACR1	ATGAGTGRCTGRCBCAG GCGGNTCCAGCCASACCARSGA	ovaj rad
PS_LACF2 PS_LACR2	ATGAGTGACCTGACGCAGGCGTTGCT CTAGCGCGGGTCCAGCCAGACCAACGA	ovaj rad
CA3F CA3R	TAACAGGATCCGAGTGGCCTGACTCAGG (<i>Bam</i> HI) TAATTAAGCTTTTGCGGTTCCAGCCAGAC (<i>Hind</i> III)	ovaj rad
KTF KTR	TAACAGGATCCGAGTGACCTGACGCAGG (<i>Bam</i> HI) TAATTAAGCTTGCGCGGGTCCAGCCAGAC (<i>Hind</i> III)	ovaj rad
CopAF CopAR	TAACAGCTAGCATGTTCGCATGATGATTTTCGT (<i>Nhe</i> I) TAATTAAGCTTTTCGTTCGACCCTCACCGTGCG (<i>Hind</i> III)	ovaj rad
CbpF CbpR	TAACAGCTAGCATGACTCACCATTCCGAAGAC (<i>Nhe</i> I) TAATTAAGCTTAGCCGCCATGGCGCTGCAGCT (<i>Hind</i> III)	ovaj rad
B561lipAF B561lipAR	TATAGCGGCCGCATGTCCCAAGAGCTTGCCACG (<i>Not</i> I) TAACGGTACCCTATACCCCGCCGCCTTCAAC (<i>Kpn</i> I)	ovaj rad
PAO1_lipAF PAO1_lipAR	TATAGCGGCCGCATGAAGAAGAAGTCTCTGCTCC (<i>Not</i> I) TAACGGTACCCTACAGGCTGGCGTTCTTCAGG (<i>Kpn</i> I)	ovaj rad
PAO1_plcBF PAO1_plcBR	TATAGCGGCCGCATGAAAACCTTCGCCC (<i>Not</i> I) TAACGGTACCCTCAGAGAGCAGTCGGTGCATCG (<i>Kpn</i> I)	ovaj rad
M13 nizvodni (-20) M13 uzvodni	GTAAAACGACGGCCAGTG CAGGAAACAGCTATGAC	(Messing 1983)
T7 nizvodni T7 uzvodni	TAATACGACTCACTATAGGG GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Invitrogen, Nemačka

3.6.4. Statistička obrada i analiza podataka

U cilju ispitivanja statistički značajnih razlika u enzimskoj aktivnosti divljih sojeva roda *Pseudomonas* korišćen je program za obradu statističkih podataka IBM SPSS Statistics, V21.0. (IBM Corp, Armonk, Njujork). Rezultati koji su poređeni dobijeni su iz tri nezavisna eksperimenta enzimske oksidacije ABTS supstrata izvedena pod istim uslovima (odjeljak 3.7.9.2). Višestruka poređenja vršena su jednofaktorskom analizom varijanse, odnosno ANOVA testom (*eng.* one-way ANOVA (*eng.* analysis of variance)) koji poredi proseke tri nezavisne grupe, ili većeg broja grupa. Vrednosti za koje je $p < 0,05$ smatrane su statistički značajnim. S obzirom na činjenicu da je ANOVA test pokazao statistički značajne korelacije, urađena je post hoc korekcija. U ovom radu korišćen je Bonferoni post hoc test koji smanjuje verovatnoću da se statistička značajnost rezultata uveća svakim novim merenjem.

3.7. Biohemijske i analitičke metode

3.7.1. Izolacija ukupnih proteina iz bakterijskih kultura

Divlji sojevi bakterija gajeni su u MSM minimalnom tečnom medijumu 72 h na 30 °C uz mešanje od 180 obrt min^{-1} u orbitalnom šejkeru, nakon čega je merena apsorbanacija kultura na 540 nm (Ultraspec 3300 pro, Amersham Biosciences, Bakinghemšir, Engleska). Bakterijske kulture su centrifugirane (10 min, 4500 \times g, 4 °C, Sorvall GS3, RC-5B Super Speed Centrifuge; Du Pont Instruments, Delaver, SAD), nakon čega je odliven tečni deo – supernatant i čuvan na 4 °C do upotrebe. Talози su oprani i resuspendovani u odgovarajućoj zapremini (1/100) 20 mM natrijum-fosfatnog pufera pH 7,4. Ova suspenzija je inkubirana sa 1 mg ml^{-1} lizozima 45 min na 37 °C uz mešanje od 150 obrt min^{-1} u orbitalnom šejkeru. Nakon toga je upotrebom zvučne energije sonikatora (Soniprep 150, MSE (UK) Ltd., Engleska) dodatno podsticano razbijanje ćelijskih membrana, i to na sledeći način: 3 pulsa od po 15 s na 20 kHz, sa pauzom od 15 s između svakog pulsa. Dobijeni homogenat je centrifugiran 40 min, 20 817 \times g, na 4 °C (Eppendorf Centrifuge 5417 R, Hamburg, Nemačka) i nakon toga izdvojen je tečni deo – ćelijski ekstrakt. Ćelijski ekstrakt je frakcija koja predstavlja skup svih unutarćelijskih proteina datog soja, dobijena disrupcijom ćelijske membrane. Ukoliko su supernatanti i ćelijski ekstrakti testirani istog dana, čuvani su na 4 °C, u suprotnom, zamrzavani su na -20 °C do korišćenja.

Rekombinantni sojevi gajeni su u minimalnom medijumu uz dodatak odgovarajućih inducera ekspresije lakaza ili lipaza (odjeljak 3.4.3). Nakon toga su centrifugirani 10 min, 3000 \times g (Eppendorf Centrifuge 5804, Hamburg, Nemačka). Za pripremu ćelijskih ekstrakata sojeva sa rekombinantnim pRSET B vektorima za prečišćavanje lakaze metodom hromatografije (odjeljak 3.7.6.2) korišćen je pufer za lizu koji je sadržao: 50 mM NaH_2PO_4 , pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol i lizozim u koncentraciji 1 mg ml^{-1} . Smeše su inkubirane 30 min na 37 °C, a korak sonikacije, kao i svi dalji koraci pripreme ćelijskog ekstrakta potpuno su isti kao kod divljih sojeva. Izolacija ukupnih proteina u sojevima sa rekombinantnim lipazama nije se razlikovala od procedure kod divljih sojeva.

3.7.2. Određivanje koncentracije ukupnih proteina u uzorcima

Koncentracija ukupnih proteina u uzorcima određivana je metodom po Bradfordu (Bradford 1976), koja se zasniva na upotrebi bojenog reagensa Quick Start™ Bradford 1 \times Reagent (BioRad Laboratories, Kalifornija, SAD). Za određivanje koncentracije proteina, u 1 ml bojenog reagensa dodavano je 20 μl smeše ukupnih proteina nepoznate koncentracije. Slepa proba je umesto proteina sadržala samo 20 μl pufera u kome su rastvoreni proteini. Nakon inkubacije od 10 min na 25 °C

merena je apsorbanacija na 595 nm (A_{595} , Ultrospec 3300 pro, Amersham Biosciences, Bakinghemšir, Engleska). Koncentracija proteina je određivana na osnovu standardne krive koja predstavlja odnos poznatih koncentracija proteinskog standarda (BSA, od eng. Bovin Serum Albumine) i odgovarajućih A_{595} vrednosti.

3.7.3. Koncentrovanje ukupnih proteina

Koncentrovanje proteina vršeno je Microcon sistemom (Merck Millipore, Darmštat, Nemačka) sa membranom koja zadržava i koncentruje proteine veće od 10 kDa. Na filter jedinicu sa membranom nanošeno je 0,5 ml uzorka, nakon čega je ona postavljena u tubicu za sakupljanje tečnosti zapremine 1,5 ml, zatvorena i centrifugirana 25 min, $10\,000 \times g$, na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Eppendorf Centrifuge 5417 R, Hamburg, Nemačka), po uputstvu proizvođača. Potom je tubica sa sakupljenom tečnošću odbacivana, dok je filter jedinica sa ukoncentrovanim uzorkom pažljivim okretanjem na drugu stranu postavljena u novu tubicu, tako da se tečnost sliva u nju. Tubice sa ukoncentrovanim uzorcima centrifugirane su 3 min, $1\,000 \times g$, na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Eppendorf Centrifuge 5417 R, Hamburg, Nemačka). Nakon svakog koncentrovanja proveravana je koncentracija proteina (odjeljak 3.7.2) i po potrebi, postupak je ponavljan.

Koncentrovanje većih količina proteina, za potrebe prečišćavanja, rađeno je najpre pod vakuumom, sa serijom filtera, odnosno celuloznih membrana sa porama reda veličine $0,8\text{ }\mu\text{m}$, $0,45\text{ }\mu\text{m}$ i $0,2\text{ }\mu\text{m}$ (Millipore, Darmštat, Nemačka). Nakon toga, uzorci su koncentrovani u Amicon aparatu za ultrafiltraciju sa magnetom i membranom od regenerisane celuloze koja zadržava proteine veće od 10 kDa (Millipore, Darmštat, Nemačka). Koncentrovanje je vršeno na ledu, uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici (Corning PC-610 Stirrer, Corning Inc., Korning, Njujork, SAD). Kao dodatni korak u odsoljavanju koncentrovanih uzoraka rađen je postupak dijalize (odjeljak 3.7.5).

3.7.4. Taloženje proteina amonijum-sulfatom

Taloženje proteina dodavanjem neorganskih soli je metoda koja se koristi u prvim koracima prečišćavanja proteina. Soli odstranjuju molekule vode sa površine molekula proteina i na taj način omogućavaju se interakcije među njegovim nepolarnim delovima. Proteini iz rastvora prelaze u agregate koji su dovoljno veliki da se lako mogu odvojiti centrifugiranjem.

Ćelijski ekstrakt soja *P. putida* F6 pripremljen po proceduri opisanoj u odeljku 3.7.1. Taloženje proteina od interesa vršeno je sa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Sigma, Sent Luis, Misuri, SAD). Na osnovu zapremine ćelijskog ekstrakta preračunato je koliko je potrebno dodati $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ da bi se postiglo zasićenje od 30 % (Wingfield 2001). Sud u kome je vršeno taloženje proteina bio je postavljen na magnetnu mešalicu (IKA[®] C-MAG HS7, Ika Works Inc., Štaufen im Brajsgau, Nemačka) i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ je postepeno dodavan u ćelijski ekstrakt u malim količinama, a nakon dodavanja inkubiran 30 min na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ova suspenzija je nakon toga centrifugirana 20 min, $1620 \times g$, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Eppendorf Centrifuge 5804R, Hamburg, Nemačka) i supernatant je odvojen od taloga. Odvojeni su takođe i alikvoti za testiranje aktivnosti enzima (odjeljak 3.7.9.2). Supernatant je podvrgnut daljem taloženju sa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kako bi se postiglo zasićenje od 60 %. Nakon dodavanja celokupne količine $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, uzorak je ostavljen da se inkubira 1 h na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon toga, uzorak je centrifugiran 20 min, $1620 \times g$, na $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Eppendorf Centrifuge 5804R, Hamburg, Nemačka) i supernatant je ponovo odvojen od taloga. Uzeti su alikvoti za određivanje aktivnosti enzima u rastvorenom talogu i u supernatantu. Supernatant je dalje podvrgnut taloženju kako bi se postiglo zasićenje od 80 %. Nakon taloženja, uzorak je inkubiran 2 h na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, pa centrifugiran 20 min, $1620 \times g$, na $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Eppendorf Centrifuge 5804R, Hamburg, Nemačka), nakon čega su uzeti alikvoti za određivanje aktivnosti enzima.

3.7.5. Dijaliza: odvajanje proteina od malih molekula

Za uklanjanje viška soli nakupljenih nakon taloženja i koncentrovanja proteina, vršen je proces dijalize. Uzorci sa proteinima od interesa su sipani u celuloznu membranu za dijalizu odgovarajuće dužine (~15 cm), prečnika 10 mm i veličine pora koje ne propuštaju proteine veće od 14 kDa (Sigma, Sent Luis, Misuri, SAD). Membrana za dijalizu je pre upotrebe pripremana po sledećem postupku: kuvanje 10 min u rastvoru 2 % natrijum-bikarbonata i 1 mM EDTA; temeljno ispiranje destilovanom vodom, kuvanje 10 min u 1mM EDTA; hlađenje. Ukoliko nisu odmah upotrebljavane, membrane za dijalizu čuvane su u rastvoru 1 mM EDTA, na 4 °C, do godinu dana. Dijaliza je vršena preko noći na 4 °C, u sudu zapremine 2 l, sa 20 mM natrijum-fosfatnim puferom pH 7,4 u kom se nalazila membrana za dijalizu sa uzorkom, pričvršćeno sa obe strane plastičnim klemama da uzorak ne bi iscureo. Sud je bio postavljen na magnetnu mešalicu, radi konstantnog mešanja pufera. Nakon ovog postupka uzorak je bio spreman za proveru poliakrilamidnom gel elektroforezom.

3.7.6. Razdvajanje proteina poliakrilamidnom gel elektroforezom

Razdvajanje proteina nakon izolacije vršeno je vertikalnom gel elektroforezom na osnovu molekulske mase, odnosno njihove različite pokretljivosti u električnom polju. Takođe, ovim vidom elektroforeze ispitivana je čistoća (homogenost) izolovanog proteina u svim fazama prečišćavanja proteina (odjeljak 3.7.7).

Poliakrilamidna gel elektroforeza (eng. *Polyacrylamide gel electrophoresis*) rađena je u gelu koji se priprema polimerizacijom akrilamida i N,N'-metilen-(bis)akrilamida u odnosu 29:1 (oba od proizvođača Sigma, Sent Luis, Misuri, SAD). Pravljen je diskontinuiran sistem gelova, koji se sastojao iz gela za koncentrovanje i gela za razdvajanje, čija je veličina bila 10 × 8 cm, debljina 0,75 mm, a kapacitet – 10 uzoraka. Korišćeni su reagensi amonijum-persulfat i tetrametiletilendiamin (TEMED) od proizvođača Amersham, Upsala, Švedska, i aparatura za vertikalnu elektroforezu firme Hoefer (Hoefer Mighty Small II, Amersham Pharmacia Biotech AB, Kalifornija, SAD).

3.7.6.1. Nativna poliakrilamidna gel elektroforeza (PAGE)

U ovom radu poliakrilamidnom gel elektroforezom bez denaturišućih agenasa ispitivano je kretanje proteina u njihovoj nativnoj konformaciji, a metodom zimografije (odjeljak 3.7.9.4) ispitivana je njihova aktivnost. Gel za koncentrovanje je sadržao sledeće komponente u finalnoj koncentraciji: 5 % akrilamid/bisakrilamid, 0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 0,05 % amonijum-persulfat, 0,04 % TEMED. U gelu za razdvajanje koncentracija akrilamida je bila finalno 10 %, a pufer je bio 0,38 M Tris-HCl pH 8,8, uz 0,05 % amonijum-persulfat i 0,04 % TEMED. Gel za razdvajanje je nalivan do 3/4 zapremine ploča/sistema, ostavljan 30 min na 25 °C da polimeriše, a zatim je u ostatak prostora nalivan gel za koncentrovanje koji je takođe ostavljan da polimeriše. Pufer za uzorke pravljen u odnosu 1:3 (pufer : uzorak) sadržao je: 60 % glicerol, 150 mM Tris HCl pH 6,8 i 0,001 % indikatorsku boju bromfenol plavo. Kao markeri za poznate veličine proteina korišćeni su Rainbow RPN756, 12 – 225 kDa (Amersham Biosciences, Bakinghemšir, Engleska), BlueStar Prestained Protein Marker, 10 – 180 kDa (NIPPON Genetics, Japan) i ExcelBand 2-Color PreStained Protein Marker, 10 – 175 kDa, PM2400 (Green BioResearch LLC, Baton Ruž, Luizijana, SAD). Pufer za elektroforezu se sastojao iz 25 mM Tris-a pH 8,3 i 193 mM glicina. Elektroforeza je tekla pri konstantnoj struji od 16 – 20 mA po ploči, u trajanju od 2 h. Gelovi su bojani u rastvoru čiji je sastav bio: 45 % metanol (v/v), 10 % (v/v) sirćetna kiselina i 0,25 % boja komazi-plavo, finalno, 1 h uz

mešanje. Odbojavanje gelova je vršeno u rastvoru sastava: 45 % metanol, 10 % sirćetna kiselina, uz mešanje, a nakon toga su ispirani destilovanom vodom. Gelovi korišćeni u zimografiji nisu bojeni komazi-plavim, već su samo ispirani destilovanom vodom. U slučaju veoma niskih koncentracija prečišćenih proteina u uzorku nanetom na gel, gelovi su bojeni srebro-nitratom. Protokol za bojenje gelova srebro-nitratom podrazumevao je upotrebu šest različitih rastvora za fiksiranje i bojenje proteina u gelu, kao i odbojavanje ostatka gela. Sadržaj rastvora naveden je redom:

- rastvor S1: 50 % etanol (v/v) i 12 % sirćetna kiselina (v/v)
- rastvor S2: 50 % etanol (v/v)
- rastvor S3: 30 % etanol (v/v)
- rastvor S4: 0,02 % Na₂S₂O₄
- rastvor S5: 0,2 % AgNO₃ i 0,075 % formaldehid (v/v)
- rastvor S6: 6 % Na₂CO₃, 0,05 % formaldehid (v/v) i 0,02 % Na₂S₂O₄.

Fiksiranje proteina u gelu vršeno je u periodu od 1,5 h ili preko noći u rastvoru S1. Uklanjanje sirćetne kiseline se odvijalo u 2 koraka: inkubiranjem 2 × 20 min u rastvoru S2, a nakon toga 30 min u rastvoru S3. Nakon kratkog ispiranja destilovanom vodom gel je mešan u rastvoru S4 u trajanju od 2 min, zatim ispran destilovanom vodom (3×) i bojen srebro-nitratom u rastvoru S5, u trajanju od 20 min. Nakon ispiranja destilovanom vodom (2×) u trajanju od 20 min usledilo je razvijanje boje u rastvoru S6. Prekidanje reakcije bojenja srebro nitratom vršeno je rastvorom S1, u trajanju od 10 min.

3.7.6.2. Denaturišuća SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Kod denaturišuće poliakrilamidne gel elektroforeze gel za koncentrovanje, gel za razdvajanje, kao i pufer za elektroforezu osim sastojaka navedenih u odeljku 3.7.6.1 sadržali su i denaturišući agens, 0,1 % SDS. Pufer za uzorke u odnosu 1:3 (pufer:uzorak) takođe je sadržao 2,5 % SDS, i nakon dodavanja ovog pufera, kao dodatni stepen denaturacije, uzorci su inkubirani 5 min na 95 °C u uređaju Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Korišćeni markeri, uslovi elektroforeze, bojenje i odbojavanje gelova navedeni su u odeljku 3.7.6.1.

3.7.7. Hromatografske metode za izolovanje i prečišćavanje proteina

3.7.7.1. Prečišćavanje lakaze iz soja *P. putida* F6

Prečišćavanje proteina lakaze tradicionalnim metodama hromatografije na koloni u celini je urađeno u saradnji sa Biotehnološkom laboratorijom Škole za hemijsko inženjerstvo Nacionalnog Tehničkog Univerziteta u Atini, Grčka. Početni uslovi za prečišćavanje enzima lakaze određeni su na osnovu uslova iz rada MakMahan i saradnika (McMahon, Doyle et al. 2007). Prečišćavanje enzima rađeno je na 25 °C. Hromatografske kolone su cevčicama bile spojene sa automatskom dvokanalnom bidirekcionom peristaltičkom pumpom (Econo Gradient Pump, BioRad Laboratories, Kalifornija, SAD) koja je sa druge strane bila povezana sa sakupljačem frakcija (SF-2120, Advantec, Tokio, Japan). Korišćene jonoizmenjivačke i gel-filtracione kolone, njihove relevantne karakteristike, kao i puferi korišćeni za ekvilibrisanje i ispiranje kolona i spiranje proteina prikazani su u Tabeli 6.

Tabela 6. Hromatografske kolone i puferi korišćeni u radu

Tip kolone: jonoizmenjivačka	Nosač	Karakteristike	Pufer
HiPrep DEAE Fast Flow 16/10	DEAE celuloza	Slabi anjonski izmenjivač (1.6 cm x 10 cm), kapacitet: 20 ml	20 mM natrijum- fosfatni pufer, pH 7 20 mM Tris-HCl, pH 8
Q-Sepharose Fast Flow 16/10	Q sefaroza	Jaki anjonski izmenjivač, (1.6 cm x 10 cm), kapacitet: 20 ml	20 mM Tris-HCl, pH 8
Ručno pakovana kolona	Q sefaroza	Jaki anjonski izmenjivač, (5 cm x 25 cm), kapacitet: ~100 ml	20 mM Tris-HCl, pH 8 20 mM Tris-HCl, pH 7
Tip kolone: gel-filtraciona	Nosač	Karakteristike	Pufer
HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR	alil-dekstran i N,N'- metilenbisakrilamid	za izolaciju proteina u opsegu veličina Mr 5 000 – 250 000	20 mM Tris-HCl, pH 7
HiPrep 26/60 Sephacryl S-300 HR	alil-dekstran i N,N'- metilenbisakrilamid	za izolaciju proteina u opsegu veličina Mr 10 000 – 1 500 000	20 mM Tris-HCl, pH 7

U cilju postizanja optimalnih uslova za prečišćavanje proteina, pored različitih kolona, varirane su i pH vrednosti korišćenih pufera i koncentracija NaCl. Nakon toga, uzorci su prečišćavani u nekoliko serija na odabranoj koloni pod optimalnim uslovima. Pre svakog novog nanošenja na kolonu, uzorci su ekvilibrisani ultrafiltracijom u Amicon uređaju (odjeljak 3.7.3) i procesom dijalize (odjeljak 3.7.5) u istom tipu pufera (Tabela 6) koji je korišćen za za ekvilibrisanje i ispiranje kolone, kao i za spiranje proteina. Pufer za spiranje proteina je pored komponenti navedenih u Tabeli 6 sadržao i 0,5 M NaCl. U slučaju komercijalnih DEAE celuloza i Q-sefaroza jonoizmenjivačkih kolona, spiranje proteina vršeno je u linearnom gradijentu NaCl (0 – 0,5 M NaCl), sa protokom 2,5 ml min⁻¹ u trajanju od 1 h. Sa ručno pakovanom Q-sefaroznom kolonom, linearni gradijent je bio isti, ali je protok bio podešen na 5 ml min⁻¹. U sledećem koraku, u cilju optimizacije, ispitivani su uslovi za spiranje proteina u dve faze: u prvoj fazi linearni gradijent je bio 0 – 0,25 M NaCl, sa protokom 5 ml min⁻¹ u trajanju od 1 h, dok je u drugoj fazi testiran gradijent 0,25 – 0,5 M NaCl u trajanju od 40 min. Uzorci koji su frakcionisani gel-filtracionom hromatografijom spirani su odgovarajućim puferom sa 0,15 M NaCl i protokom 60 ml h⁻¹. U sakupljenim frakcijama koncentracija proteina ispitivana je spektrofotometrijski, merenjem apsorbancije na 280 nm. Aktivnost eluiranih frakcija testirana je enzimskim esejem sa ABTS-om (odjeljak 3.7.9.2). Aktivne frakcije su spajane, odsoljavane i ponovo nanošene na kolonu. Razdvajanje i ispitivanje homogenosti proteina vršeno je poliakrilamidnom gel elektroforezom (odjeljak 3.7.6) nakon svakog koraka prečišćavanja, dok je koncentracija proteina određivana metodom po Bradfordu (odjeljak 3.7.2).

3.7.7.2. Prečišćavanje rekombinantnih lakaza

Bakterijski sojevi transformisani pRSET B vektorima sa ukloniranim genima koji kodiraju lakaze gajeni su pod uslovima opisanim u odeljku 3.4.3. Čelijski ekstrakti pripremani po proceduri opisanoj u odeljku 3.7.1 nanošeni su na Ni-NTA (nikl-nitriloacetatna kiselina) agaroznu kolonu (Qiagen, Hilden, Nemačka) ekvilibrisanu sa 50 mM NaH₂PO₄, pH 8, 300 mM NaCl i 10 mM imidazolom. Nespecifično vezani proteini ispirani su sa jednom zapreminom 50 mM imidazola u početnom puferu, a spiranje željenih proteina je vršeno sa 250 mM i 500 mM imidazolom u istom puferu. Koncentracija ukupnih proteina određivana je metodom po Bradfordu (odeljak 3.7.2). Sakupljene frakcije analizirane su denaturišućom poliakrilalamidnom gel elektroforezom, a njihova aktivnost testirana je u eseju sa ABTS-om (odeljak 3.7.9.2).

3.7.8. N-terminalno sekvenciranje prečišćenog proteina iz divljeg soja *P. putida* F6

Metodom N-terminalnog sekvenciranja može se identifikovati protein izolovan iz bakterijskih vrsta kod kojih još uvek nije poznata celokupna sekvenca ili deo sekvence genoma. Automatizovani ciklični proces zahteva netaknutu aminokiselinu na amino-terminusu peptida, koja se nakon modifikacije fenilizotiocijanatom uklanja isecanjem, a α -amino grupa sledeće aminokiseline u nizu spremna je za derivatizaciju. Ovaj proces naziva se Edmanova razgradnja i koristi se za pouzdano utvrđivanje N-terminalne aminokiselinske sekvence prvih 20 – 25 aminokiselina u nizu HPLC metodom (*eng. High Performance Liquid Chromatography*) (Reim and Speicher 1997).

Frakcija proteina prečišćena iz divljeg soja *P. putida* F6 metodom jonoizmenjivačke hromatografije (odeljak 3.7.7.1) uslužno je sekvencirana u kompaniji Cambridge Peptides Ltd., Zapadni Midlands, Engleska. Redosled od sedam aminokiselina na N-terminalnom domenu proteina utvrđen je metodom Edmanove razgradnje, po protokolu kompanije. Analiza sekvence u cilju dizajniranja specifičnih prajmera za umnožavanje gena od interesa urađena je upotrebom bioinformatičkih alata (odeljak 3.6.3).

3.7.9. Ispitivanje aktivnosti lakaza

3.7.9.1. Selekcija sojeva sa aktivnošću lakaze u testu sa gvajakolom

Sojevi roda *Pseudomonas* ispitivani su na prisustvo enzima sa svojstvima lakaze zasejavanjem na bogate hranljive podloge sa supstratom gvajakolom. Nakon sterilizacije u autoklavu (15 min na 121 °C) u prohladenu LA podlogu dodavani su 0,01 % gvajakol (v/v) i 0,35 mM CuSO₄, finalno. Nakon zasejavanja, bakterije su inkubirane sedam dana na 30 °C, uz svakodnevno praćenje rasta i pojave crvenkasto-braon boje, karakteristične za oksidovani supstrat (Kiiskinen, Rättö et al. 2004).

3.7.9.2. Ispitivanje enzimске aktivnosti oksidacijom ABTS supstrata

Da bi se ispitala aktivnost enzima lakaze korišćen je modifikovani esej (Verma, Dhiman et al. 2016) u kome je testirana sposobnost enzima da oksiduje aromatično jedinjenje ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)). Za testiranje aktivnosti supernatanata (ukupni vanćelijski proteini) i ćelijskih ekstrakata (ukupni unutarćelijski proteini) pripremana je reakcija zapremine 1 ml koja je sadržala: 20 mM natrijum-acetatni pufer pH 4,5, 1 mM ABTS, 0,2

mM CuSO₄, finalno i 100 µl uzorka koji se ispituje. Slepa proba je umesto uzorka sadržala pufer u kome je uzorak rastvoren. Reakcije su inkubirane 20 min na 37 °C, a promena apsorbancije je praćena spektrofotometrijski, merenjem na talasnoj dužini 420 nm.

3.7.9.3. Biohemijska karakterizacija prećišćenih rekombinantnih lakaza

Frakcije prikupljene eluiranjem sa kolone pri prećišćavanju proteina lakaze, kao i prećišćeni enzim, testirani su u eseju sa ABTS-om (odeljak 3.7.9.2) u reakciji istog sastava, ali smanjene zapremine (200 µl), u mikrotitar ploći sa 96 bunarića. Kinetika je praćena na 37 °C, u vremenskom intervalu od 20 min, oćitavanjem apsorbancije na talasnoj dužini 420 nm na uređaju Tecan Infinite 200 Pro (Tecan Group Ltd., Menedorf, Švajcarska). Jedna jedinica enzima (1 U) je definisana kao kolićina enzima neophodna da oksiduje 1 µmol min⁻¹ ABTS-a, a molarni ekstinkcioni koeficijent za ABTS je 36,000 M⁻¹ cm⁻¹.

U okviru biohemijske karakterizacije prećišćene lakaze ispitana je i optimalna pH (u opsegu 3 – 10), kao i optimalna temperatura za aktivnost prećišćenog enzima. Za ispitivanje pH optimuma upotrebljeni su sledeći puferi: za opseg pH od 3 do 5 – 20 mM natrijum-acetatni pufer, pH 6 i 7 – 20 mM natrijum-fosfatni pufer, pH 8 i 9 – 20 mM Tris-HCl, pH 10 – 20 mM glicin-NaOH. Određivanje optimalne temperature za aktivnost enzima vršeno je inkubacijom prećišćenog enzima na prethodno određenoj optimalnoj pH vrednosti odgovarajućeg pufera na temperaturama u intervalu 20 °C – 80 °C. Uzorci su skidani sa inkubacije nakon 30, 60, 90 i 120 min, stavljeni na led, nakon ćega je određivana njihova aktivnost u prethodno opisanom ABTS eseju. Termalna stabilnost prećišćenog enzima vršena je merenjem aktivnosti prema supstratu na temperaturama od 60 °C i 80 °C.

3.7.9.4. Zimografsko detektovanje aktivnosti lakaza

Nakon ispitivanja uzoraka koji sadrže rekombinantne enzime u ABTS eseju, aktivnost lakaza analizirana je i metodom zimografije. Gelovi dobijeni nativnom PAGE elektroforezom sa proteinima oćuvane strukture i aktivnosti prislantani su na podlogu u kojoj se nalazio supstrat ABTS i inkubirani na 37 °C do pojave zeleno obojene reakcije. Podloga je sadržala 75 mM natrijum-acetatni pufer pH 4,5, 5 mM ABTS i 1 % agarozu (w/v). Sastojci su rastvarani zagrevanjem i podloga je razlivena u Petri šolju. Nakon stezanja i hlaćenja, podloga je bila spremna za upotrebu. Podloge za zimografiju pripremane su pred samu upotrebu. Mogućnost ćuvanja podloga je iskljućena zbog postepene spontane oksidacije supstrata.

3.7.9.5. Enzimska razgradnja tekstilnih boja lakazom

Za ispitivanje sposobnosti lakaze da razgrađuje tekstilne boje odabrano je sedam razlićitih boja, najćešće upotrebljavanih u tekstilnoj industriji. Iz grupe azo boja testirane su amido crna 10B, Evans plava, reaktivna crna 5, remazol brilijant plava i oranž G, bromkrezol ljubićasta iz grupe trifenil-metan boja, dok je iz grupe ksanten boja testirana boja eritrozina B. Stokovi boja rastvoreni u 100 mM natrijum-acetatnom puferu pH 4,5 ćuvani su na tamnom mestu na temperaturi od 4 °C. U eksperimentima razgradnje boja korišćeni su ćelijski ekstrakti ćetiri soja koja eksprimiraju rekombinantne lakaze poreklom iz sojeva roda *Pseudomonas*. Reakcija je sadržala ćelijske ekstrakte ujednaćenih koncentracija proteina u 100 mM natrijum-acetatnom puferu pH 4,5, 0,05 mM ABTS, 0,2 mM CuSO₄ i odgovarajuću boju. Koncentracija dodate boje podešavana je tako da odgovara apsorbanci 0,6 na maksimalnoj talasnoj dužini za konkretnu boju. Takoće, u eksperimentu su postavljene dve kontrole. Jedna se sastojala od odgovarajuće boje, 100 mM natrijum-acetatnog pufera pH 4,5, 0,05 mM ABTS-a i 0,2 mM CuSO₄ i predstavljala je kontrolu spontanog raspada boje tokom

vremena. Druga kontrola, koja je predstavljala slepu probu nije sadržala boju, a pripremana je za svaku lakazu posebno i sastojala se od ćelijskog ekstrakta u 100 mM natrijum-acetatnom puferu pH 4,5, 0,05 mM ABTS-a i 0,2 mM CuSO₄. Reakcije su inkubirane četiri dana na 30 °C i nakon toga koncentracije boja su spektrofotometrijski određivane na maksimalnoj talasnoj dužini za svaku pojedinačnu boju. Razgradnja analiziranih tekstilnih boja (%) računata je po jednačini:

$$\frac{\text{inicijalna apsorbanca} - \text{finalna apsorbanca}}{\text{inicijalna apsorbanca}} \times 100 \%$$

3.7.10. Ispitivanje aktivnosti lipaza

3.7.10.1. Selekcija sojeva sa aktivnošću lipaze na čvrstim podlogama sa rodaminom B

Selekcija sojeva roda *Pseudomonas* na osnovu lipolitičke aktivnosti vršena je zasejavanjem na bogate LA podloge u koje je pre razlivanja u Petri šolje dodavano 1 % maslinovo ulje (v/v) i 2 mg l⁻¹ indikatorske boje rodamin B, finalno. Sastav podloge preuzet je iz rada Kuker i Jegera (Kouker and Jaeger 1987), ali je umesto trioleilglicerola (trioleina) kao supstrat za lipaze korišćeno maslinovo ulje. Zasejane podloge su inkubirane u trajanju od sedam dana na temperaturi 30 °C, a nakon inkubacije posmatrane su pod ultraljubičastom svetlošću (talasna dužina 260 nm). Pojava fluorescencije kod zasejanih sojeva predstavljala je potvrdu lipolitičke aktivnosti.

3.7.10.2. Ispitivanje lipolitičke aktivnosti izolovanih ćelijskih proteina

Odabrani sojevi *P. chlororaphis* B-561, *P. aeruginosa* PAO1 i *P. putida* KT2440 gajeni su u minimalnim podlogama koje su sadržale 1 % maslinovo ulje ili 0,1 % glukoze, finalno, kao jedini izvor ugljenika. Izolovani su ukupni ćelijski proteini – vanćelijski (supernatant) i unutarćelijski (ćelijski ekstrakt) (odeljak 3.7.1). Testovi su obavljani na 1 % agaroznim podlogama (w/v) koje su sadržale 1 % maslinovo ulje (finalno) kao supstrat i boju rodamin B (u finalnoj konc. 2 mg l⁻¹). Količina od 30 µl uzorka nanošena je na podloge koje su inkubirane preko noći na 37 °C. Pod ultraljubičastom svetlošću posmatrana je pojava fluorescencije na mestima na podlozi na kojima je došlo do enzimske hidrolize supstrata.

3.7.10.3. Esej sa supstratom *p*-nitrofenil palmitatom (*p*-NPP)

Za ispitivanje aktivnosti enzima lipaza korišćen je kolorimetrijski esej sa supstratom *p*-nitrofenil palmitatom (*p*-NPP) (Pinsirodom and Parkin 2001). Testiranje lipolitičke aktivnosti ćelijskih proteina sadržanih u supernatantu i ćelijskom ekstraktu (odeljak 3.7.1) divljih sojeva, kao i sojeva sa rekombinantnom lipazom vršeno je u reakciji zapremine 3 ml koja je sadržala: 40 mM Tris-HCl pH 8,2, 175 µM *p*-NPP supstrat, finalno, i 0,5 ml testiranog uzorka. Komponente supstrata (1,6 g l⁻¹ *p*-NPP, 0,17 l⁻¹ g SDS, 10 g l⁻¹ TRITON X-100) su rastvarane u vodenom kupatilu na 72 °C neposredno pred testiranje kako bi se izbegla brza reakcija spontane razgradnje jedinjenja. Reakcije su inkubirane na 37 °C, uz mešanje od 180 obrt min⁻¹ u orbitalnom šejkeru. Merenje apsorbancije na talasnoj dužini od 410 nm vršeno je nakon 10, 20, 30, 60 i 120 min.

3.8. Polimeri i biorazgradnja

3.8.1. Ispitivanje enzimske razgradnje polihidroksialkanoata (PHA) i polikaprolaktona (PCL) na čvrstim podlogama

Razgradnja polihidroksialkanoata srednjeg lanca i polikaprolaktona ispitivana je na čvrstim podlogama sa 1 % agarozom. Za potrebe ovog eksperimenta pripremljeni su uzorci supernatanata, ćelijskih ekstrakata i frakcije ukupnih proteina (odjeljak 3.7.1) sojeva *P. chlororaphis* B-561 i *P. aeruginosa* PAO1 gajenih na 1 % maslinovom ulju ili 0,1 % glukozi (finalno) kao jedinom izvoru ugljenika (odjeljak 3.4.2). Gotovi polimeri opisani u odeljku 3.8.2 rastvoreni su u acetonu i nakon toga pomešani sa 1 % agarozom (w/v u destilovanoj vodi, finalno) u odnosu 1:1, a smeša je razlivena u sterilnu staklenu Petri šolju da se stegne. Utiskivanjem šireg otvora sterilne staklene Pasterove pipete u čvrstu podlogu napravljeni su bunarići u koje je dodato po 50 µl uzoraka. Podloge su inkubirane pet dana na 37 °C uz svakodnevno praćenje pojave prosvetljenja u podlozi kao posledice aktivnosti lipolitičkih enzima.

3.8.2. Ispitivanje enzimske razgradnje PHA i PCL polimera u puferu

Sojevi iz laboratorijske kolekcije koji su pokazali najbolju lipolitičku aktivnost, *P. aeruginosa* PAO1 i *P. chlororaphis* B-561 (Tabela 1), korišćeni su u eksperimentu razgradnje polimera polihidroksialkanoata (PHA) i polikaprolaktona (PCL). Polihidroksialkanoati srednjeg lanca (mcl-PHA) korišćeni u ovoj studiji sadržali su 70 M frakciju 3-hidroksioktanoata i 30 M frakciju 3-hidroksidekanoata. Ovo su tipični monomeri koji se mogu naći u sastavu PHA srednjeg lanca koje proizvodi soj *P. putida* KT2440 u fermentoru pod uslovima opisanim u radu Dejvisa i saradnika, sa glukozom i oktanoatom kao izvorima ugljenika (Davis, Duane et al. 2015). PHA srednjeg lanca rastvoreni su u acetonu u koncentraciji 20 %, finalno (15 g polimera PHA srednjeg lanca pribavljeno je od kompanije Bioplastech Ltd, (Dablin, Irska) i rastvoreno u 75 ml acetona), izliveni u kalup – staklenu Petri šolju prečnika 10 cm, pokrivenu aluminijumskom folijom i ostavljeni sedam dana na sobnoj temperaturi dok ne ispari rastvarač. Za testiranje enzimske razgradnje dobijeni film isečen je na komadiće pravougaonog oblika, veličine 10 × 20 mm, debljine 600 µm i prosečne mase oko 200 mg. Polimer polikaprolakton (komadići veličine 10 × 20 mm, debljine 200 µm, prosečne mase oko 40 mg) sintetisali su saradnici sa Katedre za opštu i neorgansku hemiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Metoda za sintezu polimera i testiranje enzimske razgradnje PHA i PCL preuzeta je iz rada Ponjavić i saradnika (Ponjavic, Nikolic et al. 2017). Pre testiranja polimeri su izmereni na analitičkoj vagi Sartorius R 300S (Sartorius AG, Getingen, Nemačka), sterilisani sa 70 % etanolom (v/v) i osušeni na 25 °C. Testiranje razgradnje polimera vršeno je u Falcon® epruvetama zapremine 50 ml. Supernatanti i ćelijski ekstrakti odabranih sojeva pripremljeni su po proceduri iz odeljka 3.7.1 i spojeni u jedan uzorak radi ispitivanja aktivnosti ukupnih ćelijskih proteina. Koncentracija ukupnih proteina u uzorcima određena je Bradford proteinskim esejem (odjeljak 3.7.2). PHA i PCL polimeri inkubirani su sa po 5 ml ukupnih ćelijskih proteina na 37 °C, uz mešanje od 180 obrt min⁻¹ u orbitalnom šejkeru. Eksperiment je trajao četiri nedelje, a svake nedelje dodavano je po 5 ml svežeg uzorka. Svi uzorci testirani su u triplikatu. Kao kontrola za reakciju enzimske razgradnje korišćen je PBS pufer pH 7,4 (*eng.* Phosphate buffered saline) koji je sadržao: 8 g l⁻¹ NaCl, 0,2 g l⁻¹ KCl, 0,24 g l⁻¹ KH₂PO₄ i 1,44 g l⁻¹ Na₂HPO₄, rastvorenih u destilovanoj vodi. Na kraju eksperimenta polimeri su nežno obrisani papirnom vatom i 70 % etanolom (v/v) i nakon toga osušeni na 25 °C. Praćenje stepena enzimske razgradnje je vršeno gravimetrijski, merenjem gubitka mase nakon razgradnje, kao i analizom na optičkom mikroskopu Leica DM ILM (Leica Microsystems, Veclar, Nemačka) i mikroskopu atomskih sila, uređaju NanoScope III A (Veeco Digital Instruments, Plejnvju, Njujork, SAD). Merenja su izvedena primenom tapkajućeg moda za šta su upotrebljene silicijumske igle sa konstantom sile od 60 N/m. Koeficijent hrapavosti polimernih

filmova, kao i veličina kristališućih sferulita određeni su pomoću programa "Nanoscope image processing". Analizirana je površina $20 \times 20 \text{ nm}^2$, pre i posle razgradnje. Izmene u kristalnoj strukturi PCL uzoraka analizirane su FTIR spektroskopijom (*eng.* Fourier Transform Infrared Spectroscopy), praćenjem promene karbonil indeksa (CI, *eng.* carbonil index) i indeksa kristaliniteta. FTIR spektri kontrolnih i tretiranih PCL polimera snimljeni su na Thermo Scientific™ Nicolet™ iS10 uređaju sa Smart iTX™ dodatkom. Navedeni uređaji nalaze se na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

3.8.3. Ispitivanje enzimske razgradnje PHA i PCL polimera u modelu komposta

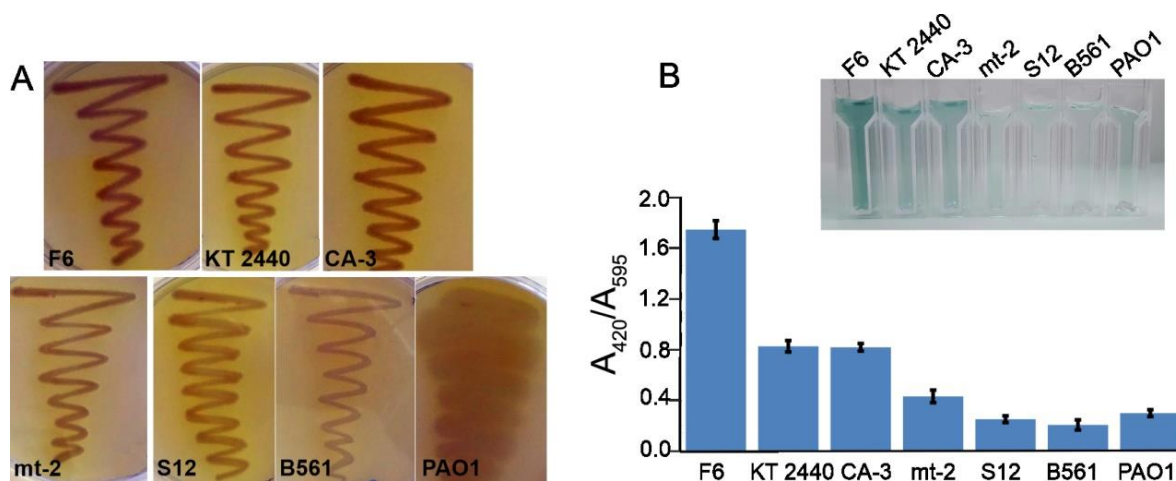
Biorazgradivost sintetisanih PHA i PCL polimera ispitana je i u model sistemu komposta, koji je sadržao komercijalni supstrat obogaćen kulturom odabranog bakterijskog soja. Kompost je postavljen u staklene Petri šolje (dijametra 14 cm, dubine 2 cm), a polimeri PHA i PCL, pripremljeni po proceduri iz odeljka 3.8.2, postavljeni su na dubini od 1 cm i prekriveni ostatkom komposta. Sveži alikvot od 5 ml prekonoćne kulture odabranih sojeva dodavan je svake nedelje u kompost, da bi se osigurala stalna vlažnost i bakterijska aktivnost. Kompost sistem inkubiran je na $37 \text{ }^\circ\text{C}$, u trajanju od četiri nedelje za PCL, odnosno osam nedelja za PHA biorazgradnju. Ovaj sistem imao je dve kontrole u koje je svake nedelje umesto kulture dodavana destilovana voda: nesterilisani kompost sa polimerima, kao i kompost koji je pre testiranja sterilisan u autoklavu na $121 \text{ }^\circ\text{C}$, 15 min. Praćenje stepena enzimske razgradnje je vršeno metodama iz odeljka 3.8.2 na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

4. REZULTATI

4.1. Detekcija aktivnosti lakaza kod odabranih sojeva roda *Pseudomonas* iz laboratorijske kolekcije: oksidacija gvajakola i ABTS esej

Nekoliko enzima lakaza do sada je identifikovano i prečišćeno iz divljih sojeva roda *Pseudomonas* (McMahon, Doyle et al. 2007, Kuddus, Joseph et al. 2013, Arunkumar, Alex Anand et al. 2014, Peter and Vandana 2014, Verma, Dhiman et al. 2016). U cilju identifikacije potencijalno novih lakaza ispitano je sedam sojeva iz laboratorijske kolekcije: *P. putida* F6, *P. putida* KT2440, *P. putida* CA-3, *P. putida* mt-2, *P. putida* S12, *P. chlororaphis* B-561 i *P. aeruginosa* PAO1 (Tabela 1). Kod ovih sojeva testirana je sposobnost oksidacije dva različita supstrata – gvajakola i ABTS-a. Sastav podloga korišćenih za ispitivanje lakazne aktivnosti ovih sojeva, kao i uslovi gajenja detaljno su opisani u odeljku 3.4.

Zasejavanjem bakterijskih sojeva na podloge koje sadrže gvajakol kao supstrat i inkubacijom na temperaturi od 30 °C praćena je pojava crvenkasto-braon boje, kao posledica enzimske oksidacije gvajakola, u periodu od sedam dana. Već u prvim danima eksperimenta primećena je promena boje zasejanih sojeva, a najintenzivnija, tamnobraon boja uočena je nakon sedam dana kod tri soja: *P. putida* F6, *P. putida* KT2440 i *P. putida* CA-3, što je i prikazano na Slici 20A.



Slika 20. A: Oksidacija supstrata gvajakola tokom rasta odabranih sojeva roda *Pseudomonas* na čvrstoj podlozi i B: Promena boje rastvora usled oksidacije ABTS supstrata proteinima iz ćelijskog ekstrakta; grafik: Prikaz enzimske aktivnosti ćelijskih ekstrakata odabranih sojeva roda *Pseudomonas* u ABTS esej. Skraćenice F6, KT2440, CA-3, mt-2, S12, B561 i PAO1 su izvedene iz punih naziva divljih sojeva: *P. putida* F6, *P. putida* KT2440, *P. putida* CA-3, *P. putida* mt-2, *P. putida* S12, *P. chlororaphis* B-561 i *P. aeruginosa* PAO1.

Uporedo sa zasejavanjem na podloge sa gvajakolom, sojevi su gajeni u tečnom minimalnom medijumu sa dodatkom fenil-sirćetne kiseline za indukciju ekspresije enzima lakaza. Izolovani su vanćelijski (supernatant) i unutarćelijski (ćelijski ekstrakt) proteini iz svih sojeva (odeljak 3.7.1) i testirani u enzimskom esej sa ABTS supstratom (odeljak 3.7.9.2). Boja reakcija u kojima se desila enzimska oksidacija ABTS-a varirala je od jarko zelene do tamnozeleno, proporcionalno aktivnosti enzima, odnosno količini oksidovanog supstrata. Na Slici 20B prikazana je enzimska aktivnost ćelijskih ekstrakata divljih sojeva u ABTS esej, koja je predstavljena kao količina nastalog proizvoda u odnosu na koncentraciju ukupnih proteina u uzorku (A_{420}/A_{595}). U supernatantima nije detektovana aktivnost prema supstratu. Najveću aktivnost u ABTS esej pokazao je ćelijski ekstrakt *P. putida* F6, čak dva puta veću od aktivnosti ćelijskih ekstrakata *P. putida* KT2440 i *P. putida*

CA-3, koje su međusobno bile vrlo slične (Slika 20B). Čelijski ekstrakti ostalih sojeva nisu se istakli oksidativnom aktivnošću u eseju sa ABTS supstratom.

Statističkom obradom podataka u ANOVA testu i Boniferoni post hoc testu (poglavlje 3.6.4) i analizom p -vrednosti potvrđeno je da je soj *P. putida* F6 pokazao vrlo značajne razlike u lakaznoj aktivnosti u odnosu na sve ostale sojeve ($p < 0,001$), što je i prikazano u Tabeli 7. Soj *P. putida* KT2440 se nije značajno razlikovao po aktivnosti od soja *P. putida* CA-3, ali su značajne razlike primećene u enzimskoj aktivnosti između ova dva soja i sojeva *P. putida* mt-2, *P. putida* S12, *P.chlororaphis* B-561 i *P. aeruginosa* PAO1 ($p < 0,05$). Sojevi *P. putida* mt-2, *P. putida* S12, *P.chlororaphis* B-561 i *P. aeruginosa* PAO1 nisu se među sobom značajno razlikovali u aktivnosti prema ABTS supstratu ($p > 0,05$). Ovi rezultati prikazani su u Tabeli 7.

Tabela 7. Prikaz p -vrednosti dobijenih u ANOVA i Boniferoni post hoc testu

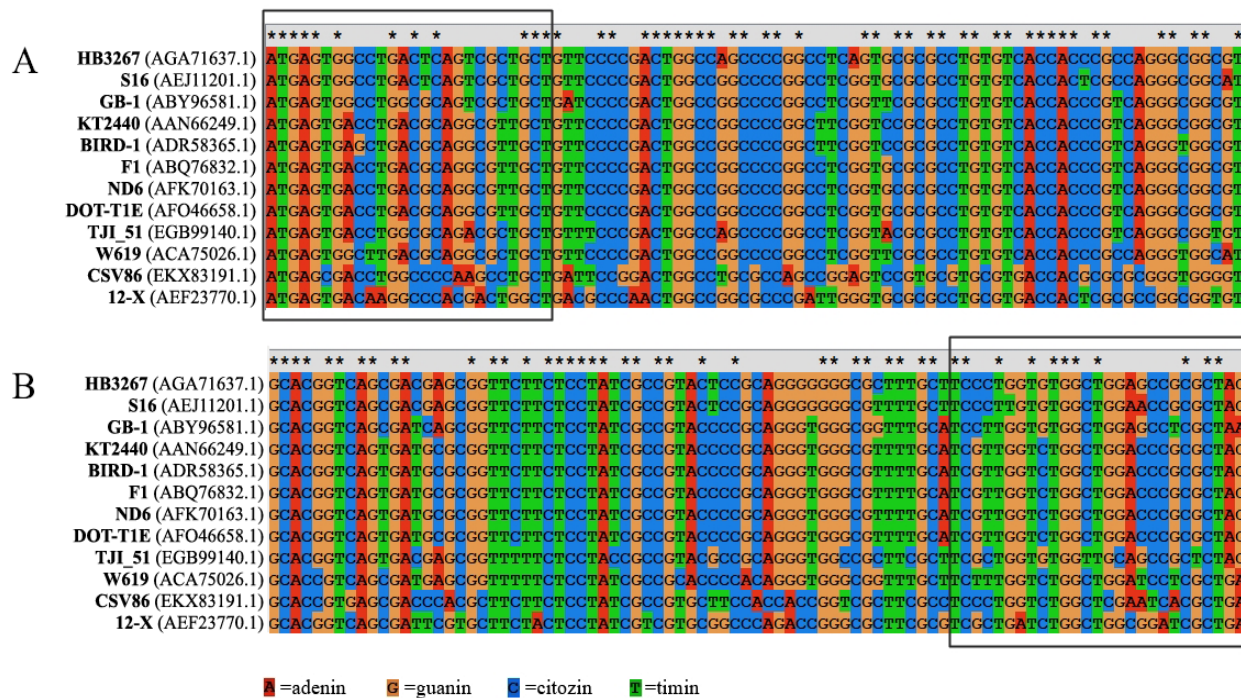
	1	2	3	4	5	6	7
1. <i>P. putida</i> F6	–						
2. <i>P. putida</i> KT2440	0,000 ***	–					
3. <i>P. putida</i> CA-3	0,000 ***	1,000	–				
4. <i>P. putida</i> mt-2	0,000 ***	0,051 *	0,072 *	–			
5. <i>P. putida</i> S12	0,000 ***	0,003 *	0,004 *	1,000	–		
6. <i>P. chlororaphis</i> B-561	0,000 ***	0,002 *	0,003 *	1,000	1,000	–	
7. <i>P. aeruginosa</i> PAO1	0,000 ***	0,011 *	0,016 *	1,000	1,000	1,000	–

* $p < 0,05$

*** $p < 0,001$

4.2. *In silico* analiza poznatih sekvenci za lakazu kod sojeva roda *Pseudomonas*

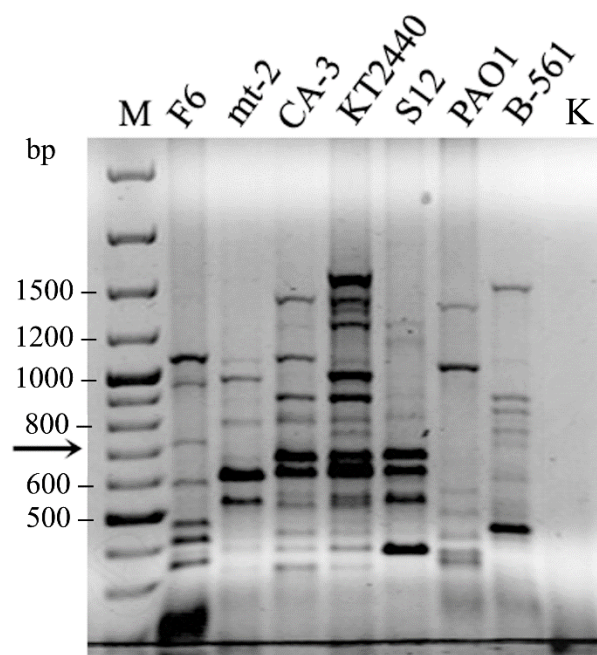
Kako bi se dizajnirali prajmeri za umnožavanje gena koji kodiraju lakazu u sojevima roda *Pseudomonas* analiziranim u ovom radu, u prvom koraku urađena je bioinformatička analiza. U proteinskoj bazi podataka UniProt pretražene su postojeće proteinske sekvence za enzim lakazu kod sojeva roda *Pseudomonas*, kao i za slične neokarakterisane proteine. Analizirano je 12 sojeva sa poznatom aminokiselinskom sekvencom lakaze u celoj dužini (247 AK): *P. putida* BIRD-1, *P. putida* CSV86, *P. putida* DOT-T1E, *P. putida* F1, *P. putida* GB-1, *P. putida* HB3267, *P. putida* KT2440, *P. putida* ND6, *P. putida* S16, *P. putida* W619, *P. fulva* 12-X i *Pseudomonas* sp. TJI_51. Prevođenje aminokiselinskih u nukleotidne sekvence izvršeno je u programu EMBOSS Backtranseq (rezultati nisu prikazani), dok je poravnanje sekvenci vršeno u programima ClustalΩ i ClustalX 2.1 (Slika 21). Na slici je uokviren je početak i kraj poravnanja, odnosno deo gena na osnovu koga su napravljene izrođeni prajmeri. Ovaj par prajmera napravljen je tako da procenat zastupljenih nukleotida guanina (G) i citozina (C) odgovara procentu koji je neophodan kao uslov za dobru PCR reakciju (40 % – 60 %). Nizvodni prajmer (PS_LACF1), dužine 18 nukleotida imao je 50 %, a uzvodni prajmer (PS_LACR1), dužine 22 nukleotida 54,5 % GC zastupljenosti. Sekvence prajmera nalaze se u Tabeli 5, u odeljku 3.5.2.



Slika 21. Poravnanje sekvenci gena za lakaze. Prikazani su samo počeci i krajevi nukleotidnih sekvenci. Obeleženi regioni predstavljaju A: početak i B: kraj poravnanja sekvenci na osnovu kojih su napravljene izrođeni prajmeri za umnožavanje gena.

4.3. Umnožavanje gena koji kodiraju lakaze

Dizajnirani izrođeni prajmeri korišćeni su u reakciji umnožavanja lakaznih gena iz sedam odabranih sojeva roda *Pseudomonas*, dok je kao matrica korišćena genomska DNK svakog soja izolovana postupkom opisanim u odeljku 3.5.1. Umnožavanje gena vršeno je „touchdown“ PCR metodom (odeljak 3.5.3). Svrha ove metode je da se izbegne nespecifično vezivanje prajmera karakteristično za niže temperature i da se već u prvim koracima poveća mogućnost umnožavanja željenih fragmenata specifičnim vezivanjem prajmera. Uslovi PCR reakcija prikazani su u Tabeli 4, a analiza dobijenih PCR proizvoda vršena je agaroznom gel elektroforezom (odeljak 3.5.4). Usled nespecifičnog vezivanja prajmera, kod svih sojeva je na agaroznom gelu detektovan veliki broj (8-15) umnoženih fragmenata, od kojih su se mnogi isticali intenzitetom signala (Slika 22).

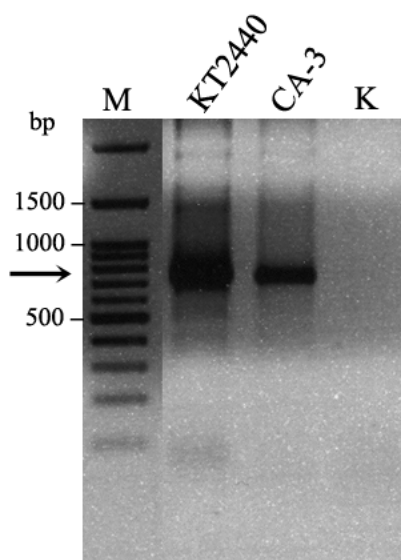


Slika 22. Analiza PCR proizvoda dobijenih korišćenjem izrođenih prajmera PS_LACF1 i PS_LACR1 kod odabranih sojeva roda *Pseudomonas*; **M** – peqGOLD 100 bp DNA-Ladder Plus (100 – 3000 bp) marker; **K** – negativna kontrola; sojevi su obeleženi skraćenicama; strelica pokazuje očekivanu veličinu fragmenta (741 bp).

Sekvenciranjem je provereno 13 fragmenata i to: sedam fragmenata soja *P. putida* F6, veličina između 300 bp i 1200 bp; jedan fragment soja *P. putida* mt-2, veličine između 600 bp i 700 bp; po jedan fragment sojeva *P. putida* KT2440, *P. putida* CA-3 i *P. putida* S12, veličine ~700 bp, jedan fragment soja *P. aeruginosa* PAO1, veličine ~1000 bp i jedan fragment soja *P. chlororaphis* B-561, veličine između 400 bp i 500 bp. Analizom sekvenci je ustanovljeno da umnoženi fragmenti sojeva *P. putida* F6, *P. putida* mt-2, *P. putida* S12, *P. chlororaphis* B-561 i *P. aeruginosa* PAO1 nemaju nikakve sličnosti sa genima koji kodiraju enzim lakazu i koji se mogu naći u postojećim bazama podataka (sekvence su prikazane u Prilogu I). S druge strane, sekvence fragmenata umnoženih iz sojeva *P. putida* CA-3 i *P. putida* KT2440 su imale najbolje preklapanje sa sekvencama gena za koje se pretpostavlja da kodiraju multi-bakar polifenol oksidoreduktazu (Prilog I).

Imajući u vidu činjenicu da sojevi kod kojih nije umnožen gen koji kodira lakazu (*P. putida* mt-2, *P. putida* S12, *P. chlororaphis* B-561 i *P. aeruginosa* PAO1) nisu pokazali ni značajnu aktivnost u testovima enzimske oksidacije supstrata (gvajakol i ABTS) (odeljak 4.1), isključeni su iz daljeg eksperimentalnog rada. Kako se upotrebom izrođenih prajmera nije mogao umnožiti gen koji kodira lakazu u soju *P. putida* F6, koji je pokazao najveću enzimsku aktivnost, napravljena je strategija za dizajniranje specifičnih prajmera. Strategija je uključivala metode prečišćavanja proteina sa lakaznom aktivnošću na koloni, kao i njegovo N-terminalno sekvenciranje (odeljci 3.7.7.1 i 3.7.8).

Na osnovu nukleotidnih sekvenci dobijenih sekvenciranjem fragmenata veličine ~700 bp kod sojeva *P. putida* CA-3 i *P. putida* KT2440 napravljeni su specifični prajmeri za umnožavanje gena koji kodira lakazu, sa dodatim restrikcionim mestima za potrebe kloniranja u ekspresioni pRSET B vektor (Tabela 5, odeljak 3.6.2). Upotreba specifičnih prajmera u lančanoj reakciji polimeraze rezultovala je umnožavanjem fragmenata odgovarajuće veličine (~740 bp) (Slika 23). Fragmenti su provereni sekvenciranjem, a dobijene nukleotidne sekvence pokazale su identičnost sa sekvencama gena koji su umnoženi upotrebom izrođenih prajmera i za koje se pretpostavlja da kodiraju multi-bakar polifenol oksidoreduktaze (Prilog I). Ovi geni su označeni kao *mcoKT* i *mcoCA3* (eng. multicopper oxidase).

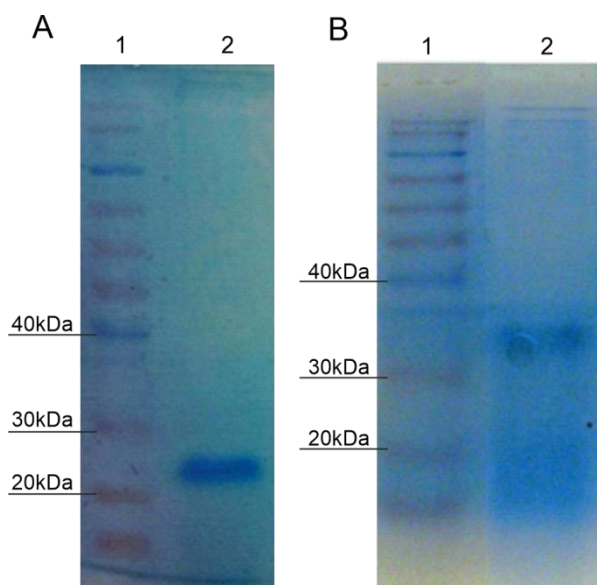


Slika 23. Umnožavanje gena koji kodiraju multi-bakar polifenol oksidoreduktazu – lakazu kod sojeva *P. putida* CA-3 i *P. putida* KT2440; **M** – 100 bp DNA ladder (100 – 3000 bp, NIPPON Genetics) marker; sojevi su obeleženi skraćenicama; strelice pokazuju očekivanu veličinu fragmenta; **K** – negativna kontrola.

4.4. Izolacija i prečišćavanje lakaze iz soja *P. putida* F6: jonoizmenjivačka hromatografija

U cilju dizajniranja specifičnih prajmera za umnožavanje gena koji kodira lakazu u soju *P. putida* F6, pribeglo se prečišćavanju proteina jonoizmenjivačkom hromatografijom. Iz ćelijskog ekstrakta dobijenog pripremom iz 3 l bakterijske kulture (odeljak 3.7.1), na koloni sa jakim anjonskim izmenjivačem Q sefrozom, pod uslovima prikazanim u Tabeli 6 (odeljak 3.7.7.1), prečišćeni su proteini sa enzimskom aktivnošću lakaze. Pojedinačne frakcije dobijene spiranjem proteina vezanih za kolonu testirane su u enzimskom esej u sa supstratom ABTS-om, uz dodatak 0,2 mM CuSO₄ (finalno) (odeljak 3.7.9.2). Na osnovu izmerenih vrednosti apsorbanacije na talasnoj dužini od 280 nm izračunata je koncentracija proteina u svakoj frakciji po formuli izvedenoj iz Lamber-Berovog zakona (Pace, Vajdos et al. 1995), dok je enzimska aktivnost u ovim frakcijama izračunata na osnovu vrednosti dobijenih u ABTS esej u. Reakcija oksidacije ABTS supstrata detektovana je u dva odvojena niza frakcija (rezultati nisu prikazani) koji su obeleženi kao Lacc1 i Lacc2 (eng. laccase). Uzorci Lacc1 i Lacc2 su nekoliko puta propušteni kroz ekvilibrisane kolone da bi se što bolje prečistili i oslobodili od neželjenih dodatnih proteina. Posle svakog propuštanja uzoraka, vršeno je njihovo koncentrovanje (odeljak 3.7.3) i odsoljavanje u procesu dijalize (odeljak 3.7.5), dok su razdvajanje i analiza homogenosti proteina izvršeni metodom denaturišuće poliakrilamidne gel elektroforeze (odeljak 3.7.6.2). U poslednjem koraku Lacc1 uzorak pokazao je jednu homogenu traku na ~24 kDa (Slika 24A), dok je Lacc2 uzorak bio nehomogen, a nakon dva uzastopna fracionisanja i spiranja sa

gel-filtracione kolone izgubljena je većina njegove aktivnosti (Slika 24B). Zbog svoje postojanosti i nepromenjene aktivnosti Lacc1 frakcija korišćena je u daljim istraživanjima.



Slika 24. Analiza delimično prečišćenih frakcija enzima iz *P. putida* F6 denaturišući poliakrilamidnom gel elektroforezom A: kolona 1 – proteinski marker, kolona 2 – Lacc1 frakcija (~24 kDa), B: kolona 1 – proteinski marker, kolona 2 – Lacc2 frakcija; proteinski marker – ExcelBand 2-Color PreStained Protein Marker (15 – 175 kDa).

4.5. N-terminalno sekvenciranje izolovanog Lacc1 proteina

Metoda N-terminalnog sekvenciranja zasnovana na procesu Edmanove razgradnje opisana je u odeljku 3.7.8. Frakcija Lacc1 sa prečišćenim proteinom iz ćelijskog ekstrakta *P. putida* F6 uslužno je sekvencirana u kompaniji Cambridge Peptides Ltd. Redosled od sedam aminokiselina na N-terminalnom delu proteina bio je sledeći: MTHHSED (metionin, treonin, histidin, histidin, serin, glutamat i aspartat). Iako je dobijeni redosled aminokiselina sadržao informaciju koja nakon prevođenja aminokiselinske u nukleotidnu sekvencu može poslužiti za dizajniranje jednog prajmera, za umnožavanje celog gena bilo je neophodno dizajnirati par prajmera (nizvodni i uzvodni). Da bi se napravili prajmeri od kojih se jedan vezuje za početak vodećeg, a drugi za kraj komplementarnog DNK lanca, neophodno je znati sekvencu gena od interesa u celosti. S obzirom da se sekvenca željenog gena nije mogla pronaći u dostupnim bazama podataka na osnovu informacija dobijenih N-terminalnim sekvenciranjem, sledeći korak je bio sekvenciranje čitavog genoma divljeg soja *P. putida* F6.

4.6. Sekvenciranje i analiza genoma *P. putida* F6

Kako bi se došlo do sekvence gena koji kodira lakazu i dizajnirali prajmeri za njegovo umnožavanje, Illumina tehnologijom sekvenciran je genom *P. putida* F6 u kompaniji Microbes NG, a PROKKA softverskom analizom dodeljena je potencijalna funkcija očitanim genima. U programu MEGA 7 (odeljak 3.6.2) izvršena je analiza genoma pretragom sekvenci koje bi prevođenjem u aminokiselinsku sekvencu dale protein sa aktivnošću lakaze i sa N-terminalnim domenom MTHHSED. Takođe, u programu Conserved Domains Tool urađeno je i pretraživanje sekvenci koje poseduju očuvane proteinske domene karakteristične za enzime lakaze. Ovim pretraživanjem je otkriveno osam različitih genskih sekvenci koje bi mogle da kodiraju željeni enzim (Tabela 8).

Međutim, samo jedna od ovih sekvenci sadržala je niz koji se prevodi u MTHHSED, a to je gen koji potencijalno kodira protein koji sadrži jezgro od četiri α -zavojnice i vezuje bakar (*eng.* four-helix bundle copper-binding protein (*cbp*)). U programu Conserved Domains Tool detektovan je i gen *copA* od 1869 bp, koji potencijalno kodira multi-bakar oksidazu sa sistemom za rezistenciju na bakar (Tabela 8). Činjenica da je pretpostavljeni funkcionalni proizvod *copA* gena protein od 623 aminokiseline, kao i da spada u multi-bakar oksidaze ukazivala je na mogućnost da je u pitanju jedan od proteina koji je detektovan u nehomogenoj Lacc2 frakciji (Slika 24B). Geni *cbp* i *copA* odabrani su za umnožavanje, kloniranje i rekombinantnu ekspresiju.

Tabela 8. Geni iz genoma *P. putida* F6 koji potencijalno kodiraju proteine sa istom ili sličnom aktivnošću svojstvenom enzimu lakazi

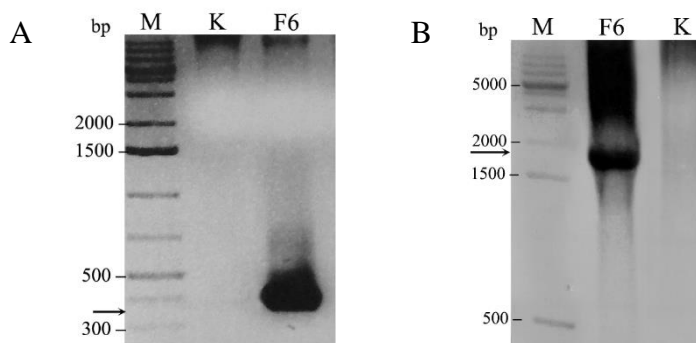
Naziv gena	Veličina proteina (broj AK*)	GeneBank poklapanje	GeneBank broj	Identičnost sekvence (%)	Način otkrivanja
gen za pretpostavljeni cisteinom bogat protein YhjQ	116	protein koji sadrži jezgro od 4 α -zavojnice i vezuje bakar (Cbp) iz soja <i>Pseudomonas putida</i>	WP_026070601	100	pretraživanje aminokiselinskog niza MTHHSED
gen za protein kome nije dodeljena funkcija	623	multi-bakar oksidaza sa sistemom za rezistenciju na bakar (CopA) iz familije <i>Xantomonadaceae</i>	WP_017354985	100	pretraživanje u programu Conserved Domains Tool
gen za protein B odgovoran za rezistenciju na bakar	425	protein B odgovoran za rezistenciju na bakar (CopB) iz familije <i>Xantomonadaceae</i>	WP_017354984	100	pretraživanje genoma i dodela potencijalne funkcije
gen za protein C odgovoran za rezistenciju na bakar	127	periplazmatični vezivni protein koji reguliše homeostazu bakra (CopC) iz familije <i>Xanthomonadaceae</i>	WP_017354979	100	pretraživanje genoma i dodela potencijalne funkcije
gen za domen lakaze, protein YfiH	256	Multi-bakar polifenol oksidoreduktaza lakaza iz soja <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	WP_099560244	99,2	pretraživanje genoma i dodela potencijalne funkcije

gen za multi-bakar oksidazu Mco	460	Multi-bakar oksidaza iz soja <i>Pseudomonas putida</i>	WP_075806698	97,4	pretraživanje genoma i dodela potencijalne funkcije
gen za domen lakaze protein YfiH	246	Multi-bakar polifenol oksidoreduktaza lakaza iz soja <i>Pseudomonas putida</i>	WP_075804457	96,3	pretraživanje genoma i dodela potencijalne funkcije
gen za plavu bakar oksidazu CueO	675	Protein iz soja <i>Pseudomonas putida</i> koji poseduje domen za multi-bakar oksidazu	WP_075804455	79,9	pretraživanje genoma i dodela potencijalne funkcije

*AK – skraćenica za aminokiselinu

4.7. Umnožavanje *cbp* i *copA* gena iz soja *P. putida* F6

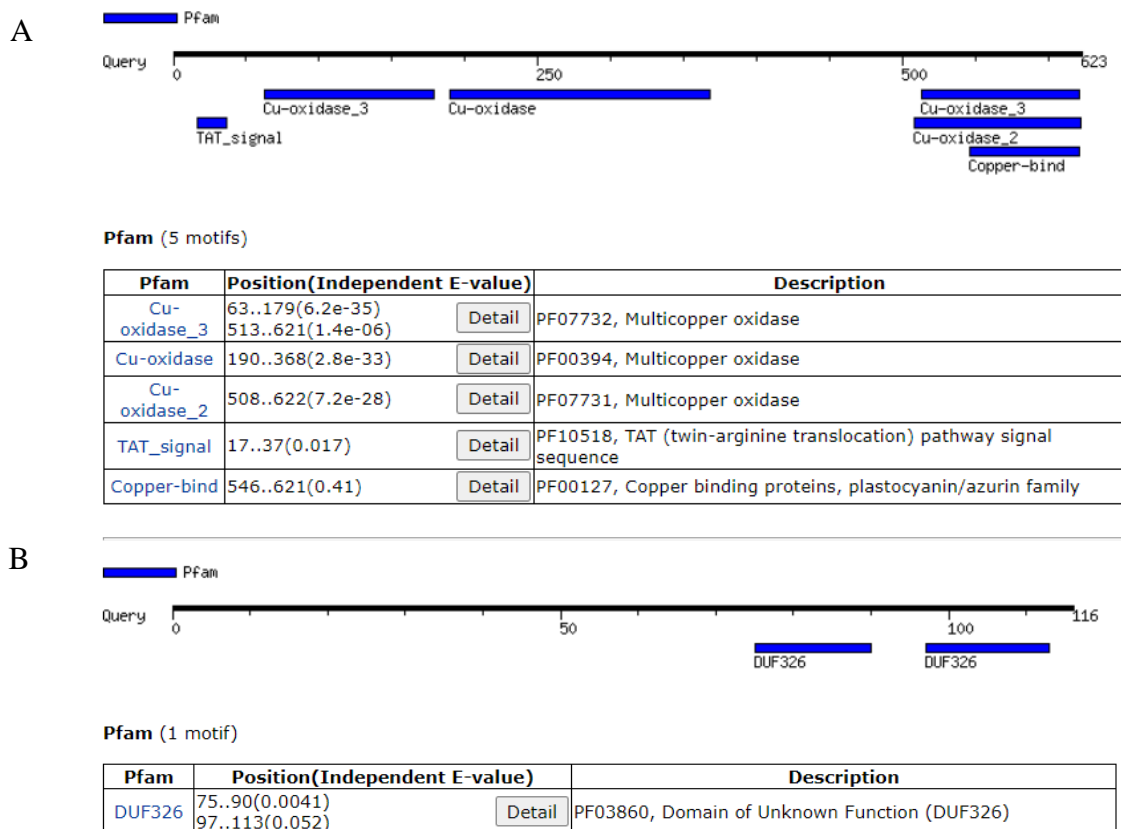
Prema sekvencama *cbp* i *copA* gena iz genoma *P. putida* F6 napravljeni su specifični prajmeri za njihovo kloniranje, prikazani u Tabeli 5, u odeljku 3.6.2. Lančanom reakcijom polimerizacije (pod uslovima prikazanim u Tabeli 4) umnožena su oba gena, *cbp* – veličine 348 bp i *copA* – veličine 1869 bp (Slika 25). Oba PCR proizvoda proverena su sekvenciranjem. Dobijene sekvence pokazale su identičnost sa originalnim sekvencama gena i prikazane su u Prilogu II.



Slika 25. Provera PCR proizvoda dobijenih umnožavanjem A: *copA* i B: *cbp* gena iz soja *P. putida* F6 (obeležen skraćeno); M – GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder (75 – 20000 bp) marker; strelica pokazuje očekivanu veličinu fragmenta.

U softverskom alatu MOTIF je nakon prevođenja u aminokiselinske sekvence izvršena detaljnija analiza *cbp* i *copA* sekvenci. Pretraživanje očuvanih motiva kod sekvence *copA* gena kao rezultat je dalo tri motiva karakteristična za multi-bakar oksidaze i to na sledećim pozicijama: 190 AK – 368 AK (multi-bakar oksidaza tip 1), 508 AK – 622 AK (multi-bakar oksidaza tip 2), 63 AK – 179 AK i 513 AK – 621 AK (multi-bakar oksidaza tip 3). Ovi rezultati prikazani su na Slici 26A. Kod *cbp* sekvence je na pozicijama između 75 i 90 AK, kao i između 97 i 113 AK pronađen

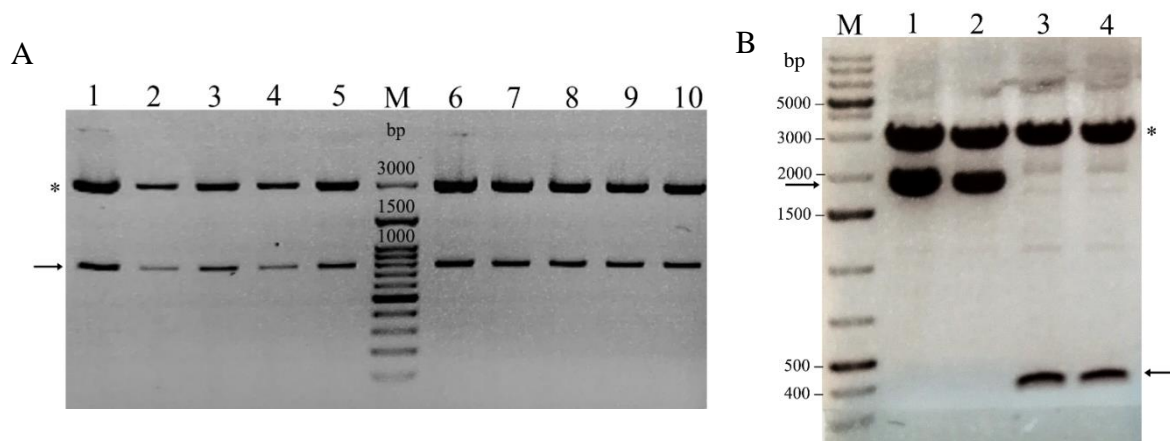
dimerizacioni proteinski domen DUF326. Ovaj domen sastavni je deo proteina koji sadrži jezgro od četiri α -zavojnice i vezuje bakar. Rezultat je prikazan na Slici 26B. U Prilogu III prikazani su rezultati koji govore o sličnostima aminokiselinskih sekvenci CopA i Cbp proteina dobijenih u ovom radu i sekvenci proteina čija je funkcija poznata i kod kojih je metodom kristalografije X zraka utvrđena 3D struktura. CopA protein pokazao je sličnost sa lakazom/multi-bakar oksidazom, dok je Cbp protein imao sličnost sa citosolnim proteinom koji skladišti bakar. Pretraživanje je izvršeno alatima PDBsum baze podataka (odjeljak 3.6.2).



Slika 26. Pretraga domena karakterističnih za multi-bakar oksidaze u aminokiselinskim sekvencama A: CopA i B: Cbp proteina dobijenih iz nukleotidnih sekvenci umnoženih gena.

4.8. Kloniranje umnoženih gena koji kodiraju enzime sa aktivnošću lakaze

Umnoženi geni za koje se pretpostavlja da kodiraju enzime sa aktivnošću lakaze iz sojeva *P. putida* CA-3, *P. putida* KT2440 i *P. putida* F6 su u procesu ligacije ubačeni u vektor za direkciono kloniranje, pGEM-T Easy. U cilju propagacije vektora sa ukloniranim genima, vršena je transformacija hemijski kompetentnih *E. coli* DH5 α ćelija. Pojedinačne kolonije koje su porasle na selektivnim podlogama sa ampicilinom zasejane su u bogati medijum, a nakon toga su iz prekončnih kultura izolovani plazmidi (odjeljak 3.6.7). Da bi se ispitala uspešnost kloniranja gena *mcoKT* (*P. putida* KT2440) i *mcoCA3* (*P. putida* CA-3), prvo je vršena analiza plazmida restrikcijom enzimima *Bam*HI i *Hind*III. Za proveru plazmida sa ukloniranim *cbp* i *copA* genima (*P. putida* F6) vršeno je isecanje fragmenta enzimima *Hind*III i *Nhe*I. Veličine isečenih fragmenata analiziranih na agaroznom gelu odgovarale su očekivanim veličinama (~740 bp, ~350 bp i ~1900 bp) (Slika 27).



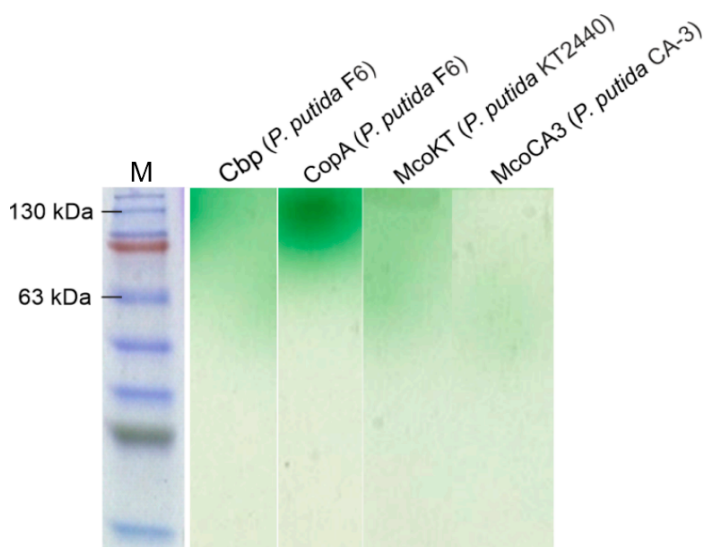
Slika 27. Restrikciona analiza plazmida sa ukloniranim fragmentima, A: 1–5 fragment *mcoCA3* i 6–10 fragment *mcoKT* isečeni iz plazmida pGEM-T Easy nalaze se na odgovarajućim visinama i obeleženi su strelicom, dok je linearizovan plazmid pozicioniran na visini od ~3000 bp obeležen zvezdicom; **M**: 100 bp DNA ladder (100 – 3000 bp, NIPPON Genetics) marker; B: na pozicijama 1 i 2 nalaze se *copA*, dok su na pozicijama 3 i 4 *cbp* fragmenti isečeni iz plazmida pGEM-T Easy, obeleženim zvezdicom); **M**: GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder (75 – 20000 bp) marker.

Sekvenciranjem plazmida parom univerzalnih prajmera M13 (Tabela 5, odeljak 3.6.2) i analizom sekvenci potvrđeno je da su uklonirani željeni geni: *mcoCA3* – 738 bp iz soja *P. putida* CA-3, *mcoKT* – 741 bp iz soja *P. putida* KT2440, *cbp* – 348 bp i *copA* – 1869 bp iz soja *P. putida* F6. Navedeni geni su po proceduri opisanoj u odeljku 3.6.4 preklonirani u ekspresioni vektor pRSET B i takođe provereni restrikcijom analizom i sekvenciranjem pomoću univerzalnih T7 prajmera (rezultati nisu prikazani). U Emboss Needle programu izvršeno je i poravnanje nukleotidnih sekvenci gena *mcoCA3* i *mcoKT* dobijenih sekvenciranjem vektora pRSET B, što je za rezultat dalo preklapanje od 96,8 %. Poravnanjem aminokiselinskih sekvenci McoCA3 i McoKT dobijena je sličnost od 98 %, a domen svojstven multi-bakar oksidazama detektovan je na istim pozicijama kod ovih proteina (rezultati su prikazani u Prilogu IV). Sekvence sva četiri gena sačuvane su u GenBank bazi podataka pod pristupnim brojevima: MN075139 (*mcoKT*), MN075140 (*mcoCA3*), MN075141 (*cbp*) i MN075142 (*copA*).

4.9. Ispitivanje enzimske aktivnosti rekombinantnih proteina

Geni koji kodiraju lakaze iz sojeva *P. putida* CA-3, *P. putida* KT2440 i *P. putida* F6 eksprimirani su u heterologom domaćinu *E. coli* BL21[DE3]. Čelijski ekstrakti sa rekombinantnim proteinima nanošeni su na ekvilibrisanu Ni-NTA agaroznu kolonu. Rekombinantni proteini su se za nosač (kompleks agaroze i niki-nitriloacetatne kiseline) vezivali polihistidinskim nizom (6×His) na N-terminalnom kraju peptida. Nespecifično vezani proteini su spirani sa 50 mM NaH₂PO₄, pH 8, 300 mM NaCl i 50 mM imidazolom, dok su željeni rekombinantni proteini spirani sa istim puferom, ali višim koncentracijama imidazola (250 mM i 500 mM) (odeljak 3.7.7.2). ABTS esejem utvrđena je lakazna aktivnost u frakcijama koje su spirane puferom sa 250 mM imidazolom, i u kojima je koncentracija proteina bila 10 mg/ml. Prečišćeni rekombinantni proteini ispitani su nativnom poliakrilamidnom gel elektroforezom (3.7.6.1), a njihova enzimska aktivnost utvrđena je i metodom zimografije (odeljak 3.7.9.4). Merenjem apsorbancije u ABTS esejem i posmatranjem pojave zelene boje, koja se u reakciji javlja kao posledica enzimske oksidacije supstrata, utvrđeno je da svi čelijski ekstrakti ispitivanih rekombinantnih sojeva, kao i svi prečišćeni enzimi pokazuju lakaznu aktivnost (rezultati nisu prikazani). U metodi zimografije je u toku inkubacije na 37 °C posmatrana pojava zelene boje na mestima na kojima je u poliakrilamidnom gelu došlo do interakcije enzim – supstrat (u 1% agaroznoj podlozi). Već nakon 30 min inkubacije nativnog poliakrilamidnog gela prislonjenog na 1% agaroznu podlogu sa ABTS supstratom uočena je pojava svetlozelene boje kod svih ispitanih

uzoraka, dok se nakon 2 h inkubacije na 37 °C razvila boja koja se pokazala postojanom u toku narednih nekoliko sati (Slika 28). Na mestima u podlozi na kojima se desila oksidacija ABTS supstrata u interakciji sa rekombinantnim enzimima nisu se videle jasno definisane trake koje odgovaraju molekulskoj masi proteina, već zeleno obojeni regioni, na većoj visini od očekivane.

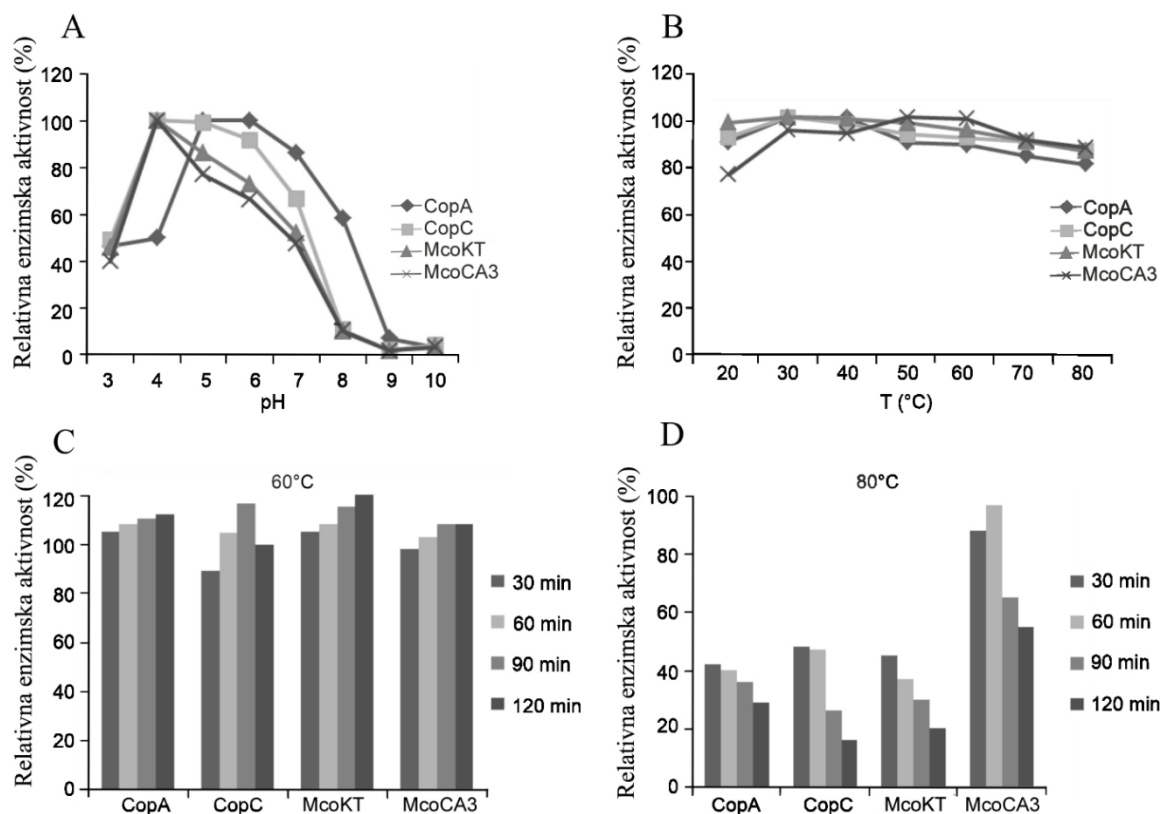


Slika 28. Zimografija sa ABTS supstratom: analiza aktivnosti prečišćenih rekombinantnih enzima razdvojenih nativnom PAGE elektroforezom; **M** – BlueStar prestained protein marker (NIPPON Genetics); kolone 1 i 2: enzimi prečišćeni iz *P. putida* F6 – Cbp i CopA, kolona 3: McoKT iz soja *P. putida* KT2440, kolona 4: McoCA3 enzim prečišćen iz soja *P. putida* CA-3.

Najintenzivnija, tamnozeleno boja uočena je u reakciji oksidacije supstrata enzimom CopA, dok je nešto svetlija boja primećena u reakciji sa rekombinantnim enzimom Cbp. Rezultati za prečišćene rekombinantne enzime McoKT i McoCA3 bili su prilično ujednačeni, što je u skladu sa rezultatima iz poglavlja 4.1. Ova dva enzima oksidovala su supstrat ABTS u manjoj meri u odnosu na enzime iz soja *P. putida* F6. Zeleno obojena reakcija odvijala se na nešto većoj visini u odnosu na očekivanu kod svih testiranih rekombinantnih proteina. Kod Cbp i CopA enzima aktivnost je detektovana na sličnoj visini, bez obzira na međusobne razlike u molekulskoj masi.

4.10. Karakterizacija rekombinantno eksprimiranih lakaza iz sojeva roda *Pseudomonas*

U cilju pronalaženja optimalne pH vrednosti za aktivnost prečišćenih lakaza, ovi enzimi testirani su na različitim pH vrednostima u ABTS eseju. pH vrednosti pufera varirane su u opsegu 3 – 10 (odjeljak 3.7.9.3). Svi ispitani enzimi pokazali su aktivnost u širokom opsegu pH vrednosti: CopA i Cbp od pH 3 do pH 8, dok su McoKT i McoCA3 bili aktivni na pH vrednostima od pH 3 do pH 7. Najveću aktivnost prema ABTS supstratu enzimi su dostigli na pH 4 (Slika 29A).



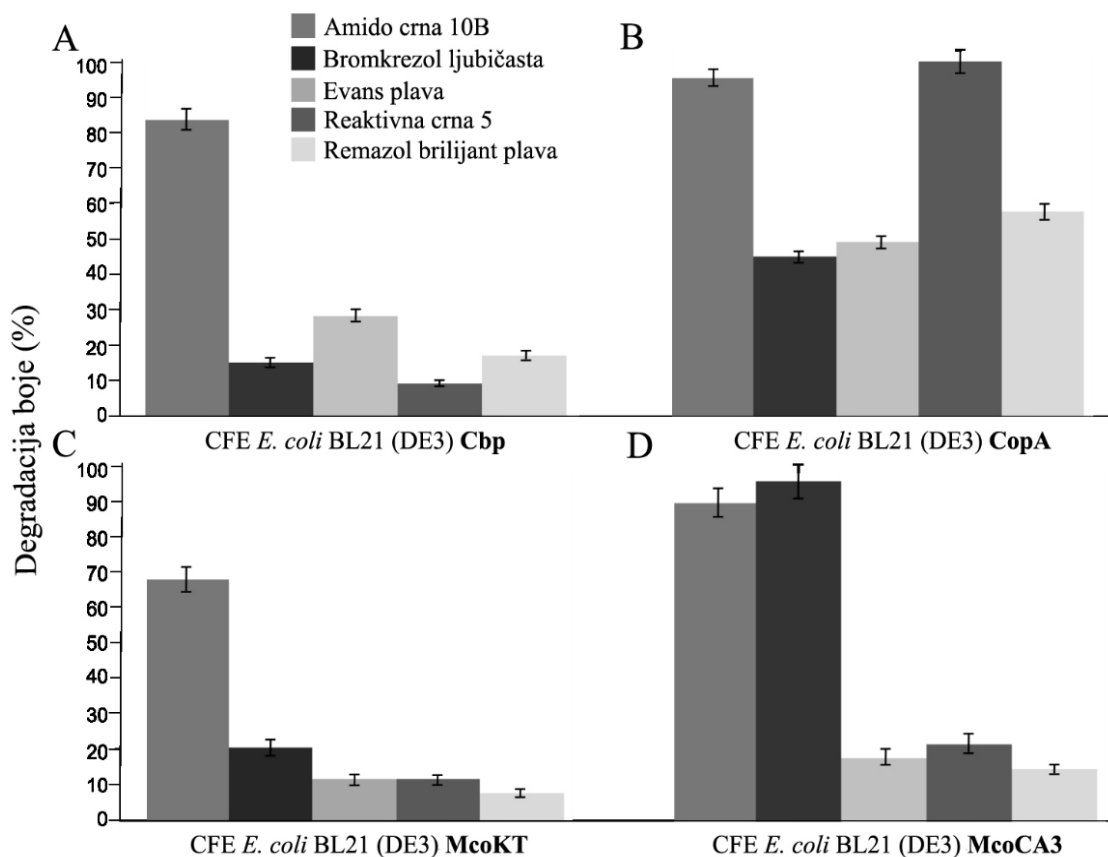
Slika 29. Određivanje optimalne pH vrednosti i temperature, kao i termalne stabilnosti rekombinantno eksprimiranih lakaza iz sojeva roda *Pseudomonas*: A: relativna enzimska aktivnost na različitim pH vrednostima; B: relativna enzimska aktivnost na različitim temperaturama; C: termalna stabilnost na 60 °C; D: termalna stabilnost na 80 °C.

Radi određivanja temperaturnog optimuma prečišćenih enzima vršeno je testiranje sa supstratom ABTS-om na optimalnoj pH vrednosti 4, u reakcijama sa temperaturnim opsegom od 20 °C do 80 °C. Kod svih ispitanih lakaza potvrđena je aktivnost u širokom opsegu temperatura, od 20 °C do 80 °C, sa optimalnim opsegom od 30 °C do 50 °C (Slika 29B). Termalna stabilnost prečišćenih enzima proverena je inkubacijom na 60 °C i 80 °C u ukupnom trajanju od 120 min, a alikvoti enzima uzimani su na svakih 30 min i testirani u enzimskom eseju sa ABTS-om. Svi ispitani enzimi pokazali su visoku termalnu stabilnost na 60 °C, čak i nakon 120 min inkubacije. Aktivnost ovih uzoraka poređena je sa enzimskom aktivnošću kontrole (uzorak enzima pre inkubacije na visokim temperaturama) koja je predstavljena kao 100% vrednosti (Slika 29C). Najveću termalnu stabilnost pokazao je enzim McoCA3 koji je zadržao 55% svoje početne aktivnosti nakon 120 min inkubacije na 80 °C, dok su Cbp, CopA i McoKT zadržali 16%, 29% i 20% početne aktivnosti (Slika 29D).

4.11. Ispitivanje razgradnje tekstilnih boja rekombinantno eksprimiranim lakazama

Potencijal ćelijskih ekstrakata koji sadrže rekombinantne lakaze iz sojeva roda *Pseudomonas* da razgrade sedam različitih sintetičkih boja praćen je spektrofotometrijski u intervalu od četiri dana. Rezultati su prikazani samo za razgrađene boje i izraženi u procentima, kao relativna enzimska razgradnja (Slika 30). Sve boje korišćene u eksperimentima su u širokoj upotrebi u tekstilnoj industriji, kao i u industriji boja. Početni eksperimenti izvedeni su bez dodavanja redoks medijatora (rezultati nisu prikazani), dok je u kasnijim eksperimentima dodavan 0,05 mM ABTS-a (finalno). Eritrozin B i oranž G su jedine boje kod kojih je izostala reakcija razgradnje od strane rekombinantnih lakaza. Ćelijski ekstrakt sa rekombinantnim enzimom CopA razgradio je pet od sedam testiranih boja:

amido crnu 10B, bromkrezol ljubičastu, Evans plavu, reaktivnu crnu 5 i remazol brilijant plavu (Slika 30B). Ova rekombinantna lakaza kompletno je razgradila azo boju reaktivna crna 5 tokom četiri dana trajanja eksperimenta. Među sedam testiranih boja amido crna 10B je jedina boja koja je razgrađena od strane svih rekombinantnih lakaza, i to sa stopom razgradnje 70 % – 95 % u intervalu od četiri dana. Čelijski ekstrakt koji je sadržao lakazu iz *P. putida* CA-3 je za četiri dana inkubacije razgradio 95 % bromkrezol ljubičaste iz grupe trifenil-metan boja (Slika 30D).

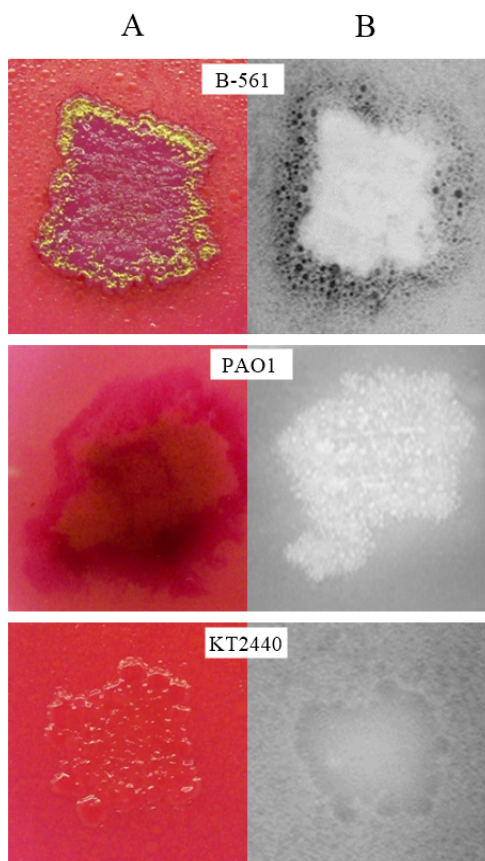


Slika30. Razgradnja pet sintetičkih boja ćelijskim ekstraktima koji sadrže rekombinantne lakaze: A: Cbp iz *P. putida* F6; B: CopA iz *P. putida* F6; C: McoKT iz *P. putida* KT2440; i D: McoCA3 iz *P. putida* CA-3.

4.12. Detekcija lipolitičke aktivnosti kod odabranih *Pseudomonas* sojeva iz laboratorijske kolekcije u testu sa rodaminom B

Bakterijske lipaze su većinom inducibilni enzimi, a njihovu aktivnost pospešuje prisustvo različitih ulja, triacilglicerola, masnih kiselina i njihovih estara, kao i glicerola u podlozi (Gupta, Gupta et al. 2004). Selekcija potencijalno dobrih izvora enzima lipaza vršena je zasejavanjem sedam sojeva roda *Pseudomonas* iz laboratorijske kolekcije (*P. chlororaphis* B-561, *P. aeruginosa* PAO1, *P. putida* KT2440, *P. putida* CA-3, *P. putida* F6, *P. putida* mt-2 i *P. putida* S12) na hranjive LA podloge sa dodatkom 1 % maslinovog ulja i indikatorske boje rodamin B (2 mg l⁻¹, finalno). Bogata hranjiva podloga je korišćena da bi se svim testiranim sojevima omogućili optimalni uslovi za rast, dok je dodavanje 1 % maslinovog ulja imalo za cilj da indukuje produkciju lipaza. Rodamin B poslužio je kao indikator enzimske aktivnosti. Nakon sedam dana inkubacije na 30 °C lipolitička aktivnost utvrđivana je posmatranjem zasejanih podloga pod ultraljubičastom svetlošću, na talasnoj dužini od 260 nm. Kod sojeva *P. chlororaphis* B-561 i *P. aeruginosa* PAO1 lipolitička aktivnost bila

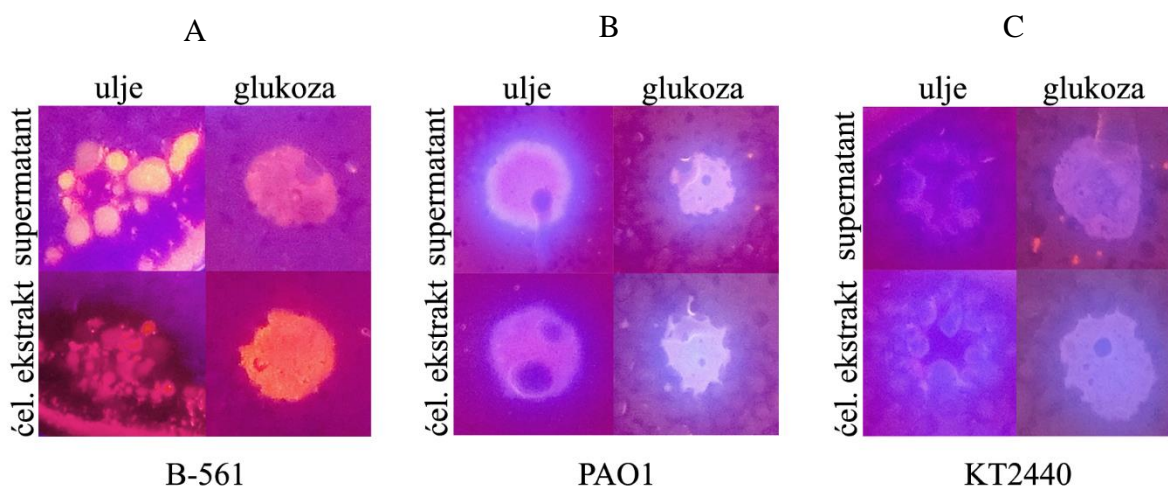
je vidljiva čak i golim okom, a to je potvrđeno i osvetljavanjem ultraljubičastom svetlošću. Kod soja *P. chlororaphis* B-561 se na rubovima mogao videti fluorescirajući prsten (Slika 31). Pojava fluorescirajućeg narandžastog prstena, vidljivog pod ultraljubičastom svetlošću može se objasniti interakcijom proizvoda enzimske hidrolize – slobodnih masnih kiselina sa rodaminom B prisutnim u podlozi (Olusesan, Azura et al. 2009). Fluorescencija nije opažena kod ostalih sojeva (rezultati prikazani samo za soj *P. putida* KT2440), pa su za dalja istraživanja odabrani *P. chlororaphis* B-561 i *P. aeruginosa* PAO1.



Slika 31. Detekcija aktivnosti enzima lipaza na čvrstim podlogama kod sojeva *P. chlororaphis* B-561 i *P. aeruginosa* PAO1 i odsustvo aktivnosti kod soja *P. putida* KT2440 – A: posmatranje u vidljivom spektru i B: pod ultraljubičastom svetlošću.

4.13. Ispitivanje potencijala različitih izvora ugljenika za indukciju enzima lipaza kod odabranih sojeva roda *Pseudomonas*

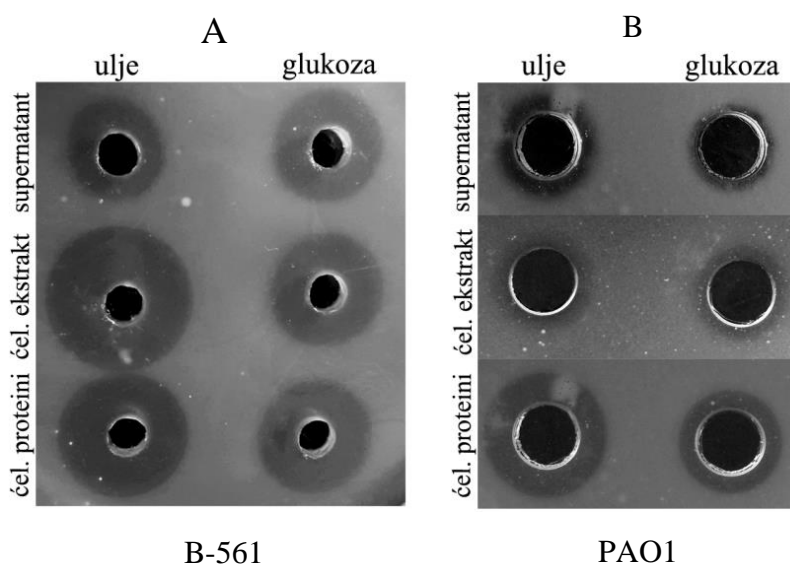
Da bi se ispitaio uticaj upotrebe različitih izvora ugljenika u minimalnim podlogama na pospešivanje aktivnosti enzima lipaze, odabrani su sojevi kod kojih je prethodno potvrđena lipolitička aktivnost – *P. aeruginosa* PAO1 i *P. chlororaphis* B-561, kao i negativna kontrola – *P. putida* KT2440. Testirani su ćelijski ekstrakti i supernatanti pomenutih sojeva, gajenih u minimalnom tečnom medijumu sa dodatkom 1 % maslinovog ulja ili 0,1 % glukoze, kao jedinog izvora ugljenika. Ispitivana je enzimska aktivnost na 1 % agaroznim podlogama (w/v) sa 1 % maslinovim uljem (v/v) i indikatorskom bojom rodamin B (2 mg l^{-1} , finalno). Posmatranjem pod ultraljubičastom svetlošću uočena je fluorescencija na mestima gde se desila enzimska hidroliza maslinovog ulja na slobodne masne kiseline. Sojevi koji su gajeni na ulju pokazali su veću lipolitičku aktivnost u odnosu na sojeve gajene na glukozi, i to naročito enzimi iz supernatanata. Soj *P. chlororaphis* B-561 pokazao je najveću, a *P. putida* KT2440 neznatnu aktivnost, što je očekivano i u skladu sa rezultatima iz odeljka 4.12. Rezultati ovog eksperimenta prikazani su na Slici 32.



Slika 32. Utvrđivanje lipolitičke aktivnosti lipaza na agaroznim podlogama sa 1% maslinovim uljem i rodamin B indikatorom u uzorcima supernatanata i ćelijskih ekstrakata sojeva A: *P. chlororaphis* B-561, B: *P. aeruginosa* PAO1 i C: *P. putida* KT2440 gajenih na 1 % maslinovom ulju ili 0,1 % glukozi.

4.14. Ispitivanje enzimske razgradnje PHA i PCL polimera na čvrstim podlogama

Poznato je da lipolitički enzimi mogu uticati na razgradnju polimera kao što su polihidroksialkanoati (PHA) srednjeg lanca i polikaprolakton (PCL) (Kanmani, Kumaresan et al. 2016). U ovom radu pokazana je enzimska aktivnost lipaza kod sojeva *P. aeruginosa* PAO1 i *P. chlororaphis* B-561. Kako bi se ispitaio potencijal ovih sojeva u razgradnji PCL i PHA, navedeni biopolimeri rastvoreni su u acetonu i dodati u 1 % agaroznu podlogu. Testirani su supernatanti, ćelijski ekstrakti i ukupni ćelijski proteini sojeva *P. aeruginosa* PAO1 i *P. chlororaphis* B-561 gajenih u minimalnom medijumu sa dodatkom 1 % maslinovog ulja ili 0,1 % glukoze (jedini izvor ugljenika). Nakon petodnevne inkubacije na 37 °C uočene su prosvetljene zone oko bunarića sa nanetim uzorcima što je ukazivalo na biorazgradnju polimera u podlozi. Veće zone razgradnje uočene su kod sojeva koji su gajeni u minimalnoj tečnoj podlozi sa dodatim uljem u odnosu na sojeve gajene na glukozi (Slika 33).

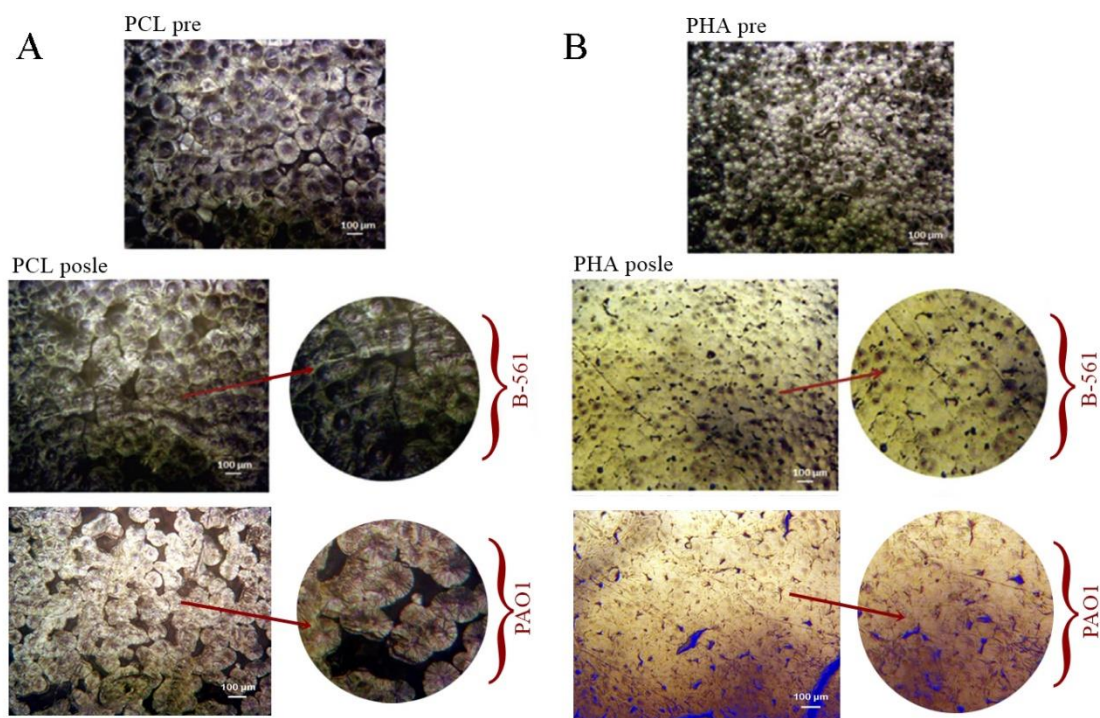


Slika 33. Zone razgradnje polimera PHA i PCL na čvrstoj podlozi ćelijskim proteinima iz sojeva A: *P. chlororaphis* B-561 i B: *P. aeruginosa* PAO1.

Kod soja *P. chlororaphis* B-561 gajenom na ulju kao jedinom izvoru ugljenika najveća zona razgradnje uočena je oko bunarića sa ćelijskim ekstraktom (8,5 mm), zatim ukupnim ćelijskim proteinima (6,5 mm), a nešto manja zona izmerena je oko bunarića sa uzorkom supernatanta (5 mm). Soj *P. aeruginosa* PAO1 gajen na ulju kao jedinom izvoru ugljenika takođe je pokazao potencijal za razgradnju biopolimera u čvrstoj podlozi. Veličine zona razgradnje oko uzoraka sa supernatantom i ćelijskim ekstraktom bile su ujednačene i iznosile su 1,5 mm, dok je zona oko bunarića sa ukupnim ćelijskim proteinima bila nešto veća – 2,5 mm. Kod sojeva gajenih u minimalnom medijumu sa dodatkom glukoze veličine zona razgradnje su iznosile: 6,5 mm oko svih uzoraka kod *P. chlororaphis* B-561; 1 mm, 1,5 mm i 1,7 mm za uzorke supernatanta, ćelijskog ekstrakta i ukupnih ćelijskih proteina kod soja *P. aeruginosa* PAO1. Ovi rezultati u skladu sa rezultatima iz prethodnih odeljaka, u kojima je takođe pokazano da prisustvo ulja može indukovati aktivnost enzima lipaza, odnosno razgradnju supstrata prisutnih u podlozi.

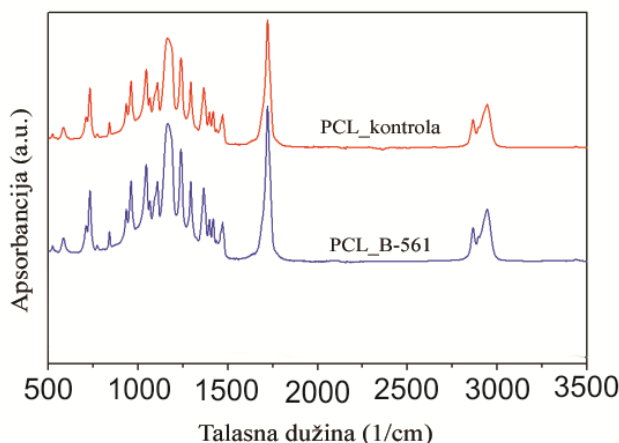
4.15. Ispitivanje enzimske razgradnje PHA i PCL polimera u puferu

Za analizu enzimske razgradnje polimera PHA i PCL korišćeni su ukupni ćelijski proteini sojeva *P. aeruginosa* PAO1 i *P. chlororaphis* B-561 u PBS puferu pH 7,4 (odjeljak 3.8.2). Step razgradnje biopolimera utvrđen je merenjem gubitka mase i analizom na svetlosnom mikroskopu. Nakon četiri nedelje tretmana ukupnim ćelijskim proteinima testiranih sojeva, oba polimera pokazala su umeren gubitak mase, 1 – 1,3%. Na mikrografijama PCL polimera snimljenim pre izlaganja enzimskom dejstvu ukupnih ćelijskih proteina uočljiva je struktura u formi jasno ograničenih sferulita. Nakon četiri nedelje izlaganja bakterijskim enzimima, posmatranjem površine PCL polimera pod mikroskopom primećena je erozija i izmenjena morfologija sa manje izraženim granicama između sferulita (Slika 34A). Analiza PHA polimera srednjeg lanca nakon četiri nedelje delovanja enzima takođe je pokazala površinsku razgradnju i izmene u morfologiji u odnosu na netretirane polimere. Primećene su i tanke pukotine na samoj površini PHA uzoraka (Slika 34B).



Slika 34. A: PCL i B: PHA polimeri pre i posle četiri nedelje izlaganja ukupnim ćelijskim proteinima *P. chlororaphis* B-561 i *P. aeruginosa* PAO1, posmatrani pod svetlosnim mikroskopom.

Izmene u kristalnoj strukturi PCL uzoraka analizirane su FTIR spektroskopijom, praćenjem promene karbonil indeksa i indeksa kristaliniteta koji su za netretirane PCL uzorke iznosili: CI = 3,5, indeks kristaliniteta 61%. Usled amorfne strukture PHA polimera, nije postojala mogućnost praćenja promene ova dva indeksa. Nakon četiri nedelje tretmana PCL polimera ćelijskim proteinima sojeva *P. chlororaphis* B-561 i *P. aeruginosa* PAO1 nije uočena značajna promena karbonil indeksa i indeksa kristaliniteta (CI = 3,5, indeks kristaliniteta 61%). Promene u hemijskoj strukturi i površinskoj morfologiji PCL i PHA polimera nisu mogle da se detektuju upotrebom FTIR metode, što je i prikazano na Slici 35 (Rezultati prikazani samo za soj *P. chlororaphis* B-561).



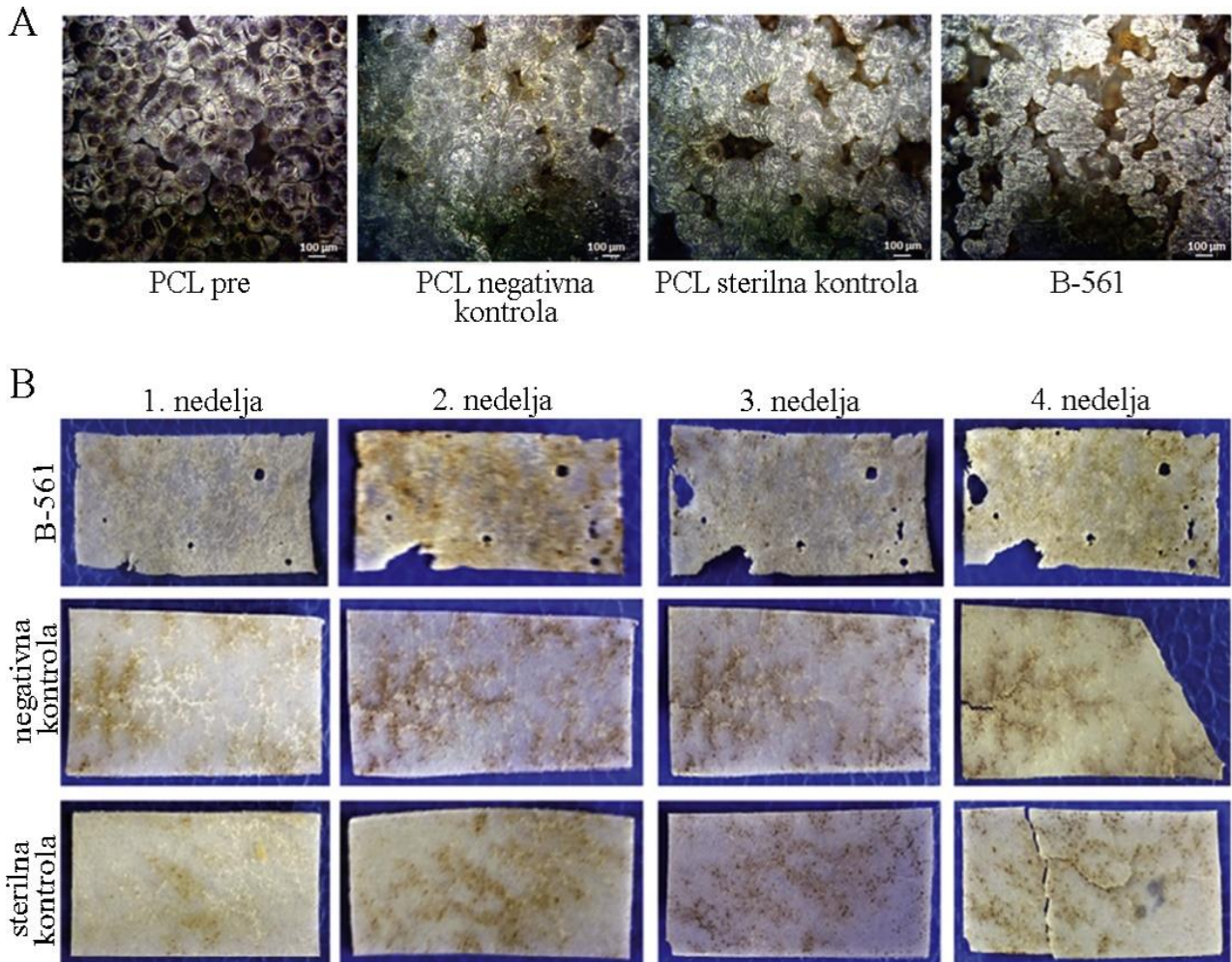
Slika 35. FTIR spektroskopska analiza netretiranog PCL polimera i PCL polimera nakon četiri nedelje razgradnje ukupnim ćelijskim proteinima soja *P. chlororaphis* B-561.

4.16. Ispitivanje enzimske razgradnje PHA i PCL polimera u modelu komposta

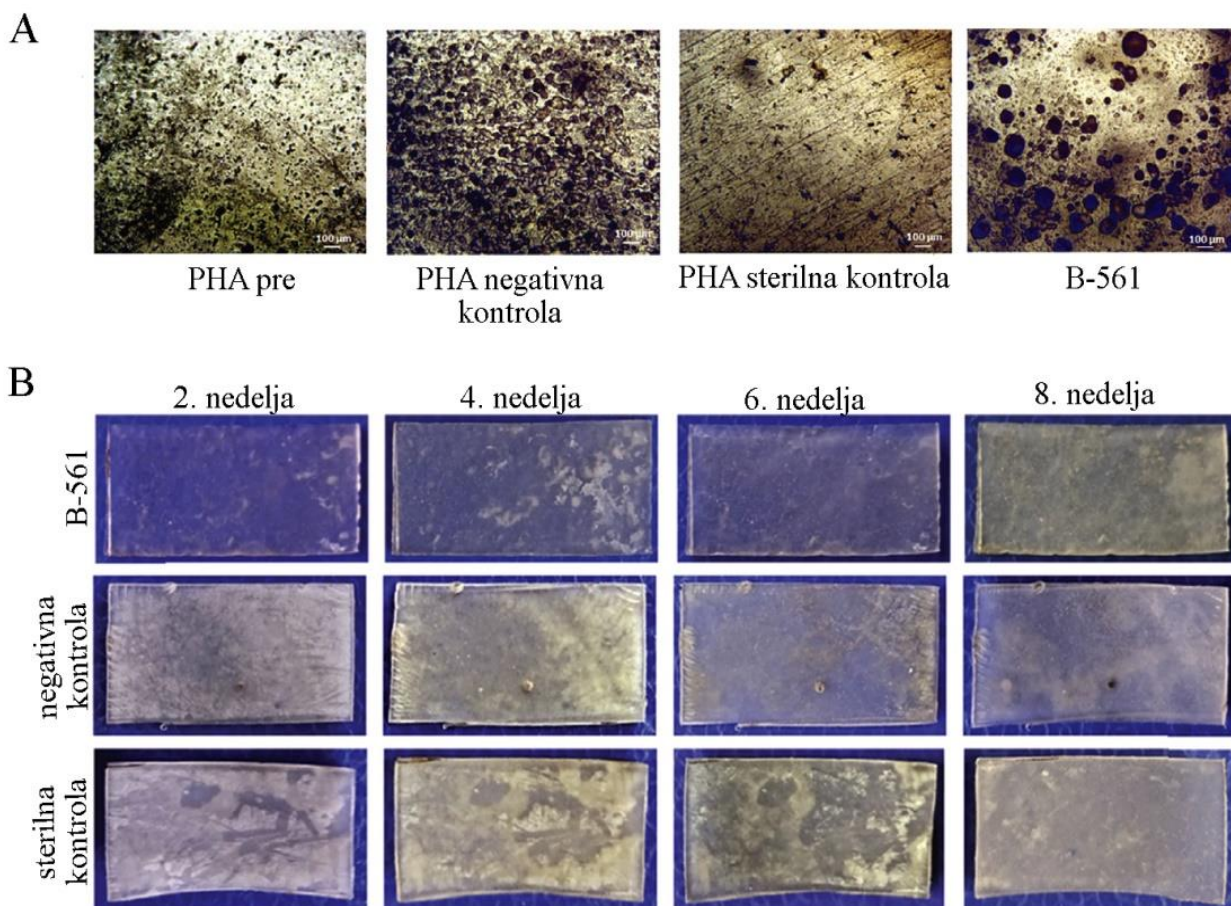
Potencijal za biorazgradnju PCL i PHA polimera ispitivan je i u modelu komposta, testiranjem dejstva celih ćelijskih kultura na njihovu strukturu i održivost. S obzirom da je soj *P. aeruginosa* PAO1 oportunistički patogen, izostavljen je iz ovih eksperimenata, dok je korišćeni soj *P. chlororaphis* B-561 gajen u minimalnoj tečnoj podlozi sa dodatkom ulja kao jedinog izvora ugljenika. Uzorci PCL i PHA veličine 10 × 20 mm (težine oko 40 mg za PCL i 200 mg za PHA) postavljeni su u kompost (pH 7,5) i inkubirani sa svežom tečnom kulturom *P. chlororaphis* B-561 koja je dodavana na svakih sedam dana, u trajanju od ukupno četiri nedelje za PCL i osam nedelja za PHA. Takođe, praćena je promena temperature kompost sistema. Pokazano je da je aktivnost bakterijske kulture imala uticaj samo na biorazgradnju polimera, bez značajnog efekta na promenu temperature u kompostu. Temperatura komposta varirala je od 39 °C do 43 °C, što je niže od tačke topljenja oba biopolimera. Na kraju eksperimenta je merenjem utvrđivan gubitak mase polimera, a površinska razgradnja posmatrana je na optičkom mikroskopu. Oba testirana polimera pokazala su značajan gubitak mase u kompost model sistemu obogaćenom bakterijskom kulturom, i to od 5,7 % – 15,5 %. PCL polimer je pokazao veći stepen biorazgradivosti od PHA polimera. Nakon četiri nedelje inkubacije PCL polimera sa ćelijskom kulturom *P. chlororaphis* B-561 u kompost sistemu došlo je do gubitka mase od 15,5 %. Važno je pomenuti da je u kontrolnom, nesterilisanom kompost sistemu, sa prirodno prisutnim mikroorganizmima primećen takođe značajan gubitak mase od 11,7 %, dok se u sterilisanom kompostu masa testiranih polimera u istim uslovima nije menjala.

Gubitak mase PHA polimera u model sistemu komposta obogaćenom svežom ćelijskom kulturom *P. chlororaphis* B-561 bio je dva puta veći u odnosu na kontrolu sa nesterilisanim kompostom i iznosio je 12,1 %. U sterilisanom kompostu nije detektovana promena mase PHA polimera.

Promene na površini PCL polimera, koje su se javile kao posledica enzimske razgradnje bile su vidljive i golim okom – delovi polimera su nedostajali, materijal je delovao krto, a primećena je i pojava perforacija čiji se broj vremenom uvećavao (Slika 36B) Metodom svetlosne mikroskopije utvrđena je površinska erozija kod oba polimera (Slika 36A i 37A). Kod PCL polimera došlo je do kompletne promene površinske morfologije i sferuliti su bili jedva vidljivi (Slika 36A).

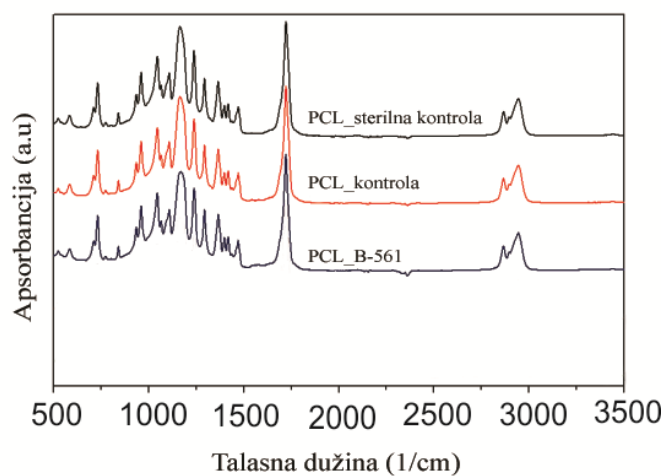


Slika 36. Biorazgradnja PCL polimera nakon četiri nedelje u kompost model sistemu sa dodatom *P. chlororaphis* B-561 bakterijskom kulturom, negativna kompost kontrola i sterilna kompost kontrola. A: Slike sa svetlosnog mikroskopa, i B: Fotografije.



Slika 37. Analiza biorazgradnje PHA polimera u laboratorijskom kompost sistemu sa dodatkom bakterijske kulture *P. chlororaphis* B-561, negativna kompost kontrola i sterilna kompost kontrola, u trajanju od osam nedelja. A: Slike sa svetlosnog mikroskopa, i B: Fotografije.

Promene u kristalnoj strukturi PCL polimera nakon biorazgradnje procenjivane su izračunavanjem CI i indeksa kristaliniteta. Pikovi u FTIR spektru svojstveni PCL polimeru zadržali su se i nakon biorazgradnje polimera, što je prikazano na Slici 38.



Slika 38. FTIR spektroskopska analiza nakon četiri nedelje razgradnje PCL polimera u kompost model sistemu sa dodatom *P. chlororaphis* B-561 bakterijskom kulturom, negativna kompost kontrola i sterilna kompost kontrola.

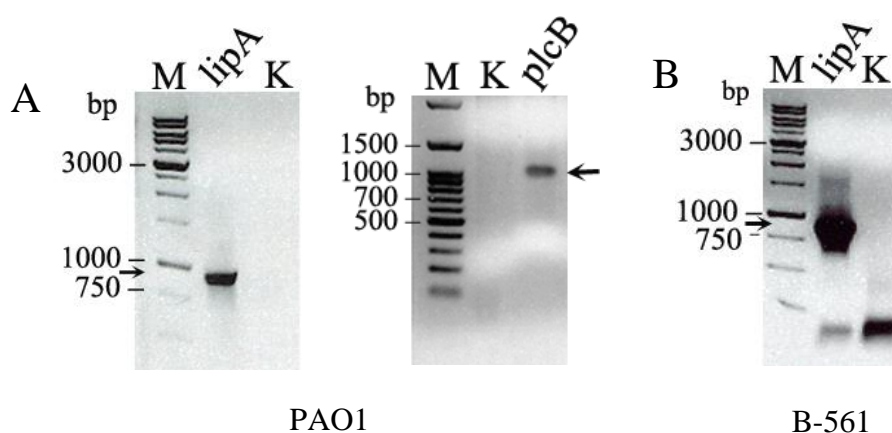
Nisu detektovane promene u CI vrednosti (3,5) i indeksu kristaliniteta (61 %) u odnosu na netretirane PCL. Iako su razlike u izgledu PHA polimera pre eksperimenta i nakon osam nedelja u kompost model sistemu bile minimalne (Slika 37B), posmatranjem pod optičkim mikroskopom uočena je izmenjena morfologija kao posledica biorazgradnje (pukotine na površini, Slika 37A), što je potvrđeno i merenjem gubitka mase (1,3 %).

4.17. Umnožavanje, kloniranje i rekombinantna ekspresija gena koji kodiraju lipaze

U ovom radu eksperimentalno je potvrđeno da lipolitički enzimi poreklom iz dva soja roda *Pseudomonas* (*P. aeruginosa* PAO1 i *P. chlororaphis* B-561) mogu da razgrađuju rastvorene polimere PCL i PHA (u sastavu čvrstih podloga), ili polimere u obliku filma (u puferu i kompostu) (odeljci 4.14, 4.15 i 4.16). Kako bi se ispitaio potencijal primene ovih enzima u procesu biorazgradnje, prvi korak bilo je umnožavanje i kloniranje gena koji ih kodiraju. Analizom GenBank baze podataka izdvojeni su geni iz *P. aeruginosa* PAO1 i *P. chlororaphis* B-561 sojeva koji kodiraju proteine sa potvrđenom, ili pretpostavljenom esteraznom aktivnošću. Odlučeno je da se u okviru ove studije urade preliminarna ispitivanja sa manjim brojem gena, uz mogućnost da se u budućnosti studija proširi i na druge gene od interesa izdvojene bioinformatičkom analizom. Na osnovu odabranih gena dizajnirani su prajmeri za umnožavanje gena iz sojeva *P. aeruginosa* PAO1 i *P. chlororaphis* B-561. Sekvence prajmera i uslovi pod kojima su PCR reakcije izvođene nalaze se u Tabeli 4 i Tabeli 5. U PCR reakciji umnoženi su fragmenti za koje je sekvenciranjem i analizom sekvenci utvrđeno da predstavljaju:

- gen za lipazu A (*lipA* – 936 bp) iz soja *P. aeruginosa* PAO1
- gen za fosfolipazu C (*plcB* – 987 bp) iz soja *P. aeruginosa* PAO1
- gen za lipazu A (*lipA* – 891 bp) iz soja *P. chlororaphis* B-561

Nukleotidne sekvence ovih gena prikazane su u Prilogu V. PCR reakcije u kojima su umnožavani geni za lipaze iz sojeva *P. aeruginosa* PAO1 i *P. chlororaphis* B-561 analizirane su na 1 % agaroznim gelovima, a rezultati su prikazani na Slici 39.



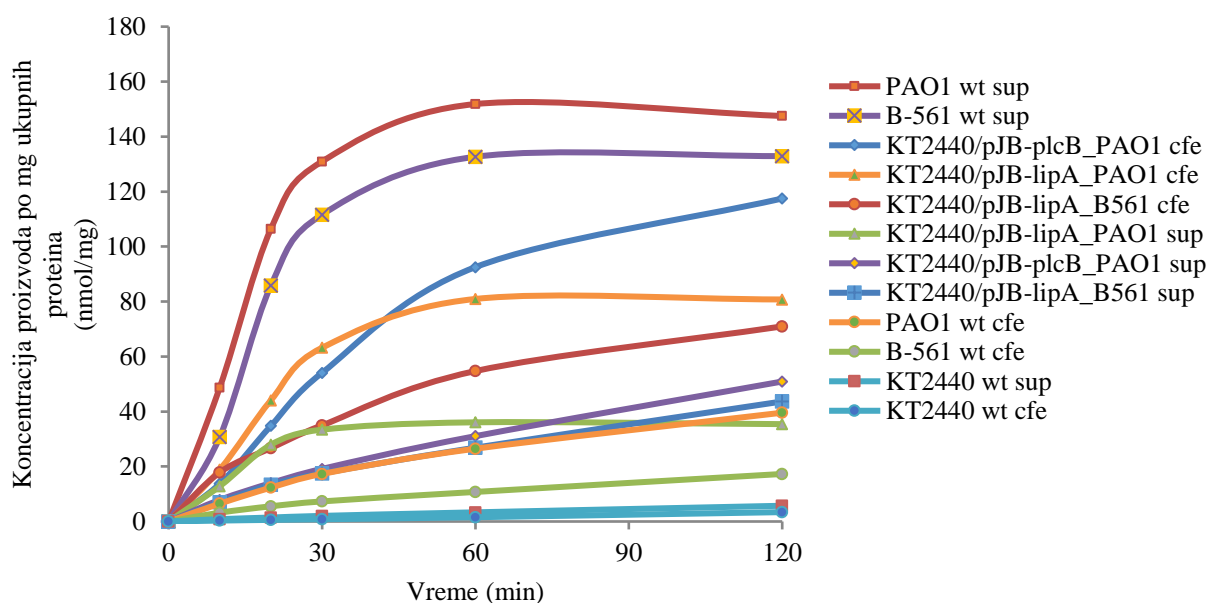
Slika 39. Analiza PCR proizvoda na 1 % agaroznom gelu, A: umnožen gen za lipazu A (*lipA*) (M – 1 kb DNA ladder (250 – 10000 bp) NIPPON Genetics marker) i fosfolipazu C (*plcB*) (M – 100 bp DNA ladder (100 – 3000 bp) NIPPON Genetics marker, K – negativna kontrola) iz soja *P. aeruginosa* PAO1; B: umnožen gen za lipazu A (*lipA*) (M – 1 kb DNA ladder (250 – 10000 bp) NIPPON Genetics marker) iz soja *P. chlororaphis* B-561, K – negativna kontrola; strelice pokazuju očekivane veličine fragmenata.

Geni koji kodiraju lipazu – *lipA* i *plcB* iz soja *P. aeruginosa* PAO1 i *lipA* iz *P. chlororaphis* B-561 uklonirani su u vektor pGEM-T Easy. Rekombinantnim vektorima transformisane su *E. coli* DH5 α hemijski kompetentne ćelije, a uspešnost kloniranja proverena je digestijom rekombinantnih plazmida restrikcionim enzimima *KpnI* i *NotI* i analizom proizvoda digestije na agaroznom gelu (rezultati nisu prikazani). Vektori su takođe provereni sekvenciranjem, uz upotrebu univerzalnih M13 prajmera i analizom sekvenci utvrđeno da su uklonirani geni od interesa. Kako bi se ispitala mogućnost rekombinantne ekspresije gena koji kodiraju lipolitičke enzime, procesima restrikcione digestije i ligacije (odeljci 3.5.8 i 3.5.5) geni su prebačeni u ekspresioni vektor pJB861. Rekombinantni ekspresioni vektori takođe su provereni restrikcionom analizom i sekvenciranjem, a nakon toga elektroporacijom ubačeni u soj *P. putida* KT2440. Soj *P. putida* KT2440 okarakterisan je kao bezbedan, u mnogim istraživanjima korišćen je kao domaćin za vektore sa ukloniranim genima iz drugih zemljišnih mikroorganizama, a našao je i svoju primenu u biotehnologiji (Martins dos Santos, Timmis et al. 2004). Imajući sve navedeno u vidu, u ovoj studiji odabran je kao domaćin za homologu ekspresiju gena i procenu aktivnosti rekombinantnih lipaza.

4.18. Analiza lipolitičke aktivnosti u esaju sa *p*-nitrofenil palmitatom

Kako bi se ispitala lipolitička aktivnost odabranih divljih i rekombinantnih sojeva korišćen je kolorimetrijski esej sa supstratom *p*-nitrofenil palmitatom (*p*-NPP) (odeljak 3.7.10.3). Ispitano je dejstvo supernatanta i ćelijskih ekstrakata divljih sojeva *P. aeruginosa* PAO1 i *P. chlororaphis* B-561 (pozitivne kontrole), *P. putida* KT2440 (negativna kontrola), kao i *P. putida* KT2440 sojeva sa rekombinantno ekspimiranim lipazama (odeljak 4.17). Divlji sojevi koji su u prethodnim testovima (odeljci 4.12, 4.14 i 4.15) pokazali lipolitičku aktivnost označeni su kao pozitivne kontrole, dok je soj *P. putida* KT2440 kod koga nije detektovana lipolitička aktivnost ni u jednom od testova označen kao negativna kontrola.

Sušтина kolorimetrijskog esaja sa *p*-nitrofenil palmitatom je da kao posledica enzimske hidrolize ovog supstrata nastaje jedinjenje *p*-nitrofenol, žuto obojeni proizvod koji se može pratiti spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 410 nm. Rezultati ovog testa prikazani su na grafiku na Slici 40.



Slika 40. Praćenje enzimske aktivnosti lipaza u supernatantu (skraćeno sup) i ćelijskom ekstraktu (skraćeno cfe, eng. cell free extract) kod divljih sojeva (skraćeno wt, eng. wild type) i soja *P. putida* KT2440 sa rekombinantnim lipazama.

Na grafiku se može uočiti da su najveću aktivnost pokazali supernatanti divljih sojeva *P. aeruginosa* PAO1 i *P. chlororaphis* B-561, Slede ćelijski ekstrakti sojeva sa rekombinantnom fosfolipazom C (iz *P. aeruginosa* PAO1), rekombinantnom lipazom A (iz *P. aeruginosa* PAO1) kao i rekombinantnom lipazom A (iz soja *P. chlororaphis* B-561), supernatanti rekombinantnih sojeva i ćelijski ekstrakti divljih sojeva *P. aeruginosa* PAO1 i *P. chlororaphis* B-561, dok je najmanju aktivnost pokazao soj *P. putida* KT2440.

Lipolitička aktivnost uočena kod divljih sojeva *P. aeruginosa* PAO1, *P. chlororaphis* B-561 i *P. putida* KT2440 u skladu je sa očekivanjima i prethodnim rezultatima iz ovog rada. Međutim, interesantan rezultat ovog eksperimenta je značajna aktivnost rekombinantnih lipaza u ćelijskim ekstraktima. Ova činjenica je u suprotnosti sa rezultatima svih prethodnih testova u kojima je lipolitička aktivnost divljih sojeva *P. aeruginosa* PAO1 i *P. chlororaphis* B-561 detektovana pretežno u supernatantu.

5. DISKUSIJA

5.1. Lakaze

Lakaze, enzimi koji spadaju u raznovrsnu grupu multi-bakar oksidaza, katalizuju oksidaciju širokog spektra aromatičnih jedinjenja i zbog toga se smatraju veoma pogodnim za primenu u različitim biotehnološkim i industrijskim procesima (Alexandre and Zhulin 2000, Piscitelli, Pezzella et al. 2010). Aplikativni potencijal ovih enzima je raznolik – mogu se koristiti za obradu nerastvorne lignocelulozne biomase, uklanjanje zagađivača iz industrijskih otpadnih voda i kontaminiranih zemljišta, razgradnju postojećih tekstilnih boja, kao biosenzori za fenolna jedinjenja itd. (Madhavi and Lele 2009).

U novijoj literaturi opisana je primena nekoliko rekombinantnih bakterijskih lakaza iz vrsta *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus safensis*, *B. subtilis*, *Yersinia enterocolitica*, i to uglavnom u procesima bioremedijacije – razgradnji sintetičkih boja i uklanjanju policikličnih aromatičnih ugljovodonika, ali i u biotransformaciji jedinjenja koja se koriste u farmaceutskoj industriji (Singh, Rawat et al. 2016, Zeng, Zhu et al. 2016, Liu, Huang et al. 2017, Siroosi, Amoozegar et al. 2018). Iako je do danas mali broj bakterijskih lakaza detaljno proučen, napredak u sferi tehnologije sekvenciranja genoma i bioinformatičke analize ovih sekvenci ukazao je na njihovu veliku rasprostranjenost. Opisane lakaze iz *Pseudomonas* vrsta su uglavnom identifikovane i prečišćavane iz divljih sojeva (Kuddus, Joseph et al. 2013, Arunkumar, Alex Anand et al. 2014, Peter and Vandana 2014), a jedini do sada rekombinantno eksprimirani enzim je CopA iz soja *P. putida* KT2440 (Granja-Travez and Bugg 2018). Traganje za novim, potencijalno efikasnijim bakterijskim lakazama u sojevima roda *Pseudomonas*, kao i rekombinantna ekspresija u domaćinu jednostavnom za manipulaciju kao što je *E. coli* sastavni su deo ove studije.

5.1.1. Identifikacija lakaza u sojevima roda *Pseudomonas*: utvrđivanje prisustva enzima i analiza genetičkih determinanti

Potencijalno prisustvo enzima lakaze u sojevima roda *Pseudomonas* je u ovoj studiji ispitivano upotrebom kvalitativnih i kvantitavnih enzimskih eseja. Kvalitativni enzimski eseji se koriste za utvrđivanje postojanja enzima, dok kvantitativni eseji služe za analizu aktivnosti enzima merenjem promene količine supstrata ili proizvoda reakcije u određenom vremenskom periodu. Kod sedam sojeva iz kolekcije Laboratorije za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu, ispitana je sposobnost oksidacije dva jedinjenja, standardnih supstrata za lakazu – gvajakola i ABTS-a (odjeljak 4.1). Testirani su sojevi: *P. putida* F6, *P. putida* KT2440, *P. putida* CA-3, *P. putida* mt-2, *P. putida* S12, *P. chlororaphis* B-561 i *P. aeruginosa* PAO1. Gvajakol (*o*-metoksi fenol), aromatično jedinjenje koje zauzima značajan udeo u strukturi lignina (Azadfar, Gao et al. 2015) veoma je dobar supstrat za većinu lakaza (Yaropolov, Skorobogat'ko et al. 1994). Hranljive LA podloge sa gvajakolom korišćene za detekciju lakazne aktivnosti sadržale su i CuSO₄. U literaturi je pokazano da je izvor jona bakra veoma važan za kvaternarnu strukturu enzima lakaze, njegovu termalnu stabilnost i katalitičku aktivnost (Gabdulkhakov, Kostareva et al. 2018). Pojava crvenkasto-braon prebojenosti u testu sa gvajakolom (Nishida 1988, Kiiskinen, Rättö et al. 2004) uočena je kod svih testiranih sojeva, ukazujući na prisustvo enzima sa svojstvom lakaze. Najintenzivniju, tamnobraon boju razvio je soj *P. putida* F6, zatim sojevi *P. putida* KT2440 i *P. putida* CA-3, kao što je prikazano na Slici 20A, u odeljku 4.1.

Nakon što je u kvalitativnom testu sa supstratom gvajakolom utvrđena oksidativna enzimaska aktivnost kod svih ispitanih sojeva, urađena je i kvantitativna analiza lakazne aktivnosti. Ispitivanje

je vršeno enzimskim testom u kom je oksidovan ABTS supstrat, sa dodatkom izvora jona bakra, jedinjenjem CuSO₄. Od svih testiranih vanćelijskih (supernatant) i unutarćelijskih (ćelijski ekstrakt) frakcija proteina najveću enzimsku aktivnost pokazao je ćelijski ekstrakt soja *P. putida* F6, i to dva puta veću od ćelijskih ekstrakata sojeva *P. putida* KT2440 i *P. putida* CA-3, što je u skladu sa rezultatima kvalitativnog testa (Slika 20B). Ova tri soja pokazala su značajnu razliku u enzimskoj oksidaciji ABTS supstrata u odnosu na ostale sojeve (Tabela 7), kod kojih se količina nastalog proizvoda, ABTS radikal-katjona, pokazala zanemarljivom u odnosu na koncentraciju ukupnih proteina u uzorku. Kako je aktivnost enzima lakaze uočena u ćelijskom ekstraktu, dok je u supernatantu bila nemerljiva, ovi rezultati ukazali su na unutarćelijsku lokalizaciju enzima, što je u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima u literaturi (Sharma, Goel et al. 2007, Margot, Bennati-Granier et al. 2013). Podaci u literaturi svedoče o postojanju enzima lakaze u sojevima roda *Pseudomonas* – *P. putida* F6 (McMahon, Doyle et al. 2007) kao i multi-bakar oksidaze (CopA) u soju *P. putida* KT2440 (Granja-Travez and Bugg 2018).

Umnožavanje genetičkih determinanti koje kodiraju enzime sa lakaznom aktivnošću kod odabranih sojeva roda *Pseudomonas* izvršeno je upotrebom izrođenih i specifičnih prajmera. Metodom PCR-a umnoženi su geni koji kodiraju enzime sa svojstvom lakaze iz dva soja – *P. putida* CA-3 (*mcoCA3*, 738 bp) i *P. putida* KT2440 (*mcoKT*, 741 bp) (odjeljak 4.3). Kloniranjem i ekspresijom ovih gena u heterologom domaćinu *E. coli* BL21[DE3] dobijeni su rekombinantni proteini od 246 AK (McoCA3) i 247 AK (McoKT). Poravnanjem aminokiselinskih sekvenci utvrđeno je da se radi o vrlo srodnim multi-bakar oksidazama sa domenom karakterističnim za ove enzime, prisutnim na istim pozicijama (prikazano u Prilogu IV). U bazama podataka su za soj *P. putida* KT2440 pronađena još četiri gena (*cumA*, *copA-I*, *copA-II*, i *mnxG*) koji potencijalno kodiraju multi-bakar oksidaze veličine 468 AK, 574 AK, 669 AK i 1947 AK. Od navedenih enzima u literaturi je jedino opisan, rekombinantno ekspimiran i okarakterisan CopA enzim (669 AK) iz *P. putida* KT2440, koji je skoro tri puta veći od McoKT enzima (247 AK) identifikovanog u ovom radu, što sugerše da je u pitanju neka druga lakaza. U literaturi ne postoje podaci o genima koji kodiraju multi-bakar oksidazu u soju *P. putida* CA-3, te su gen *mcoCA3* i protein koji kodira po prvi put opisani u ovoj studiji.

Dodatnom analizom većeg broja sekvenci fragmenata umnoženih PCR metodom kod sojeva *P. putida* F6, *P. putida* mt-2, *P. putida* S12, *P. chlororaphis* B-561 i *P. aeruginosa* PAO1 jednoznačno je utvrđeno da to nisu geni koji kodiraju multi-bakar oksidaze, niti druge srodne proteine (Prilog I). Svi sojevi roda *Pseudomonas* iz laboratorijske kolekcije kod kojih nije detektovana značajna aktivnost u enzimskim testovima i kod kojih nisu umnoženi geni koji kodiraju lakazu – *P. putida* mt-2, *P. putida* S12, *P. chlororaphis* B-561 i *P. aeruginosa* PAO1, izostavljeni su iz daljih istraživanja u okviru ove studije.

5.1.2. Identifikacija lakaza kod soja *P. putida* F6

Činjenica da gen za lakazu kod soja *P. putida* F6 nije umnožen PCR metodom upotrebom izrođenih prajmera ukazala je na mogućnost da se radi o sekvenci koja se razlikuje od sekvenci poznatih lakaza. U kvalitativnoj, kao i u kvantitativnoj analizi lakazne aktivnosti soj *P. putida* F6 pokazao je dva puta veću aktivnost prema ABTS supstratu u odnosu na sojeve *P. putida* KT2440 i *P. putida* CA-3 (odjeljak 4.1). S obzirom na to da je soj *P. putida* F6 neosporno pokazao aktivnost u ovoj studiji, kao i da je literaturi utvrđeno prisustvo lakazne aktivnosti u ovom soju (McMahon, Doyle et al. 2007), umnožavanje željenog gena zahtevalo je drugačiji pristup. Strategija za kreiranje specifičnih prajmera za umnožavanje gena koji kodiraju enzim sa lakaznom aktivnošću u soju *P. putida* F6 obuhvatila je nekoliko metoda – jonoizmenjivačku hromatografiju, N-terminalno sekvenciranje, sekvenciranje genoma ovog soja i bioinformatičku analizu podataka. Analizom enzimске aktivnosti uz višestruko prečišćavanje na koloni sa jakim anjonskim izmenjivačem, utvrđeno je postojanje dve frakcije proteina sa lakaznom aktivnošću u soju *P. putida* F6 (Lacc1 i Lacc2), od kojih je samo jedna bila homogena (Slika 24). Metodom N-terminalnog sekvenciranja

utvrđeno je da prečišćeni protein molekulske mase od oko 24 kDa iz Lacc1 frakcije na svom amino-kraju sadrži motiv od sedam aminokiselina MTHHSED. Ovaj niz se nije mogao pronaći među lakazama dostupnim u bazama podataka, ali je u sekvenci genoma *P. putida* F6 bioinformatičkom analizom, među osam gena kandidata za enzime sa lakaznom aktivnošću, pronađen i gen *cbp* (348 bp) koji kodira protein sa MTHHSED nizom (Tabela 8). Pronađen je još jedan gen, *copA* (1869 bp), koji kodira multi-bakar oksidazu sa sistemom za rezistenciju na bakar od 623 AK, veličine približne jednom od proteina iz nehomogene frakcije (Slika 24B). Specifičnim prajmerima dizajniranim na osnovu sekvenci gena *cbp* i *copA* umnožena su oba gena iz soja *P. putida* F6 (Slika 25, odeljak 4.7). Geni umnoženi iz soja *P. putida* F6 su u ovom radu po prvi put klonirani i eksprimirani u domaćinu *E. coli* BL21[DE3]. Proizvodi gena *cbp* i *copA* su proteini koji za svoju funkciju zahtevaju bakar. Cbp je protein od 116 AK (~12,7 kDa) čije je jezgro sastavljeno od četiri α -zavojnice, dok je CopA multi-bakar oksidaza od 623 AK (~68,5 kDa). Lakaza koju su MakMahan i saradnici prečistili iz soja *P. putida* F6 je molekulske mase 59 kDa (McMahon, Doyle et al. 2007), što je ukazalo da se razlikuje od enzima identifikovanih u ovoj studiji. Takođe, poređenjem aminokiselinskih sekvenci CopA enzima iz soja *P. putida* KT2440 (Granja-Travez and Bugg 2018) i CopA multi-bakar oksidaze iz soja *P. putida* F6 koja je klonirana u ovom radu utvrđeno je da se radi o različitim proteinima sa 67,7 % sličnosti. Važno je istaći da postoji neslaganje u molekularnoj masi proteina iz frakcije Lacc1 koji je sekvenciran (~24 kDa) i proizvoda identifikovanog *cbp* gena (~12,7 kDa). Gen koji se nalazi iza gena *cbp* (348 bp) je *copC* gen (381 bp), koji potencijalno kodira protein molekulske mase ~13,9 kDa. Između *cbp* i *copC* gena nalazi se samo 11 baznih parova, pa je neposredna blizina mogući uzrok potencijalnog prepisivanja ovih gena u jedinstveni peptid, što bi moglo da razjasni nepodudaranje pretpostavljenih veličina Cbp proteina i proteina u Lacc1 frakciji. Proizvod *copC* gena je periplazmatični vezivni protein koji reguliše homeostazu bakra i prisutan je kod mnogih bakterijskih vrsta (Lawton, Kenney et al. 2016).

5.1.3. Karakterizacija rekombinantno eksprimiranih lakaza iz sojeva roda *Pseudomonas*

U ovom radu su četiri enzima (Cbp, CopA, McoKT i McoCA3) iz tri *P. putida* soja (*P. putida* F6, *P. putida* KT2440 i *P. putida* CA-3) heterologo eksprimirana u *E. coli* BL21[DE3] domaćinu i prečišćena na Ni-NTA koloni (odeljak 4.9). Kvantitativnim enzimskim esejem sa ABTS supstratom i metodom zimografije pokazano je da su nakon rekombinantne ekspresije u heterologom domaćinu ovi enzimi zadržali svoju aktivnost, tj. da su proizvodi ukloniranih gena funkcionalni. Aktivnost rekombinantnih lakaza uvećana je ~2,5 puta dodavanjem 0,2 mM jona Cu^{+2} u reakciju enzimske oksidacije ABTS supstrata. Galai i saradnici su dodatkom mnogo veće koncentracije jona Cu^{+2} (10 mM) dobili slično uvećanje aktivnosti lakaze (2,6 puta) iz soja *Stenotrophomonas maltophilia* AAP56 (Galai, Limam et al. 2009). U zimografiji su se na mestima gde se desila oksidacija ABTS supstrata rekombinantnim enzimima umesto jasno definisanih traka mogli uočiti obojeni regioni, na nešto većoj visini od očekivane, što je pokazano na Slici 28, u odeljku 4.9. Poznato je da pokretljivost proteina pri njihovom razdvajanju poliakrilamidnom gel elektroforezom bez denaturišućih agenasa zavisi od njihove molekulske mase, naelektrisanja i nativne strukture. Što je veće ukupno negativno naelektrisanje, veća je i pokretljivost proteina u alkalnim puferima. Proteini velike molekulske mase, ali i oni koji zauzimaju kompleksnije trodimenzionalne strukture kreću se sporije zbog efekta trenja. Mogućnost da rekombinantni enzimi poseduju kompleksniju nativnu strukturu od pretpostavljene može objasniti njihovu manju elektroforetsku pokretljivost i zadržavanje u poliakrilamidnom gelu na visini većoj od očekivane.

Kada je u pitanju testiranje sposobnosti enzima da oksiduje ABTS supstrat na različitim pH vrednostima, svi ispitani rekombinantni enzimi pokazali su aktivnost u širokom opsegu pH (odeljak 4.10). CopA i Cbp enzimi (*P. putida* F6) bili su aktivni u opsegu od pH 3 do pH 8, dok je aktivnost enzima McoKT (*P. putida* KT2440) i McoCA3 (*P. putida* CA-3) detektovana u opsegu između pH 3 i pH 7 (Slika 29A). Optimalna pH vrednost za aktivnost sva četiri rekombinantna enzima bila je pH 4, što je u potpunosti u skladu sa literaturnim podacima o CopA enzimu iz *P. putida* KT2440, kao

i lakazama iz vrsta *B. coagulans* i *B. clausii* koje su takođe svoju najveću aktivnost u ABTS eseju pokazale na pH 4 (Ihssen, Reiss et al. 2015). Lakaza iz bakterije *B. licheniformis* pokazala je najveću aktivnost na pH 3 (Lončar, Božić et al. 2016), a iz bakterije *Streptomyces cyaneus* – na pH 5 (Ece, Lambertz et al. 2017).

U okviru karakterizacije rekombinantnih enzima vršena je procena optimalne temperature za njihovu aktivnost, kao i njihova termostabilnost (odjeljak 4.10). Svi enzimi su bili aktivni u opsegu od 20 °C do 80 °C, s tim što je najveća aktivnost prema ABTS-u detektovana u opsegu od 30 °C do 50 °C (Slika 29B). Značajna enzimaska aktivnost koju su testirani enzimi pokazali čak i na povišenim temperaturama saglasna je sa podacima u literaturi o drugim bakterijskim multi-bakar oksidazama iz vrsta *S. coelicolor*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. clausii* i *B. coagulans* (Sherif, Waung et al. 2013, Ihssen, Reiss et al. 2015). Sve rekombinantno eksprimirane lakaze pokazale su visoku termostabilnost na 60 °C (Slika 29C), a aktivacija enzima pod uticajem temperature pokazana je kod *S. cyaneus* u radu Ece i saradnika (Ece, Lambertz et al. 2017). Najbolju termostabilnost u ovom radu pokazao je McoCA3 enzim sa 55 % svoje početne aktivnosti nakon 120 min na 80 °C, a usledili su CopA sa 29 %, McoKT sa 20 % i Cbp sa 16 % početne enzimске aktivnosti (Slika 29D). Rekombinantni enzimi ispitivani u ovom istraživanju pokazali su visoku termotoleranciju. S obzirom na to da sojevi roda *Pseudomonas* spadaju u mezofilne mikroorganizme, ovo svojstvo je u skladu sa literaturnim podacima o mezofilnim mikroorganizmima. Lončar i saradnici su ispitali aktivnost prečišćene rekombinantne lakaze iz vrste *B. licheniformis* i dobili 50 % aktivnosti nakon 100 min inkubacije na 60 °C i 60 min inkubacije na 70 °C. Heterologo eksprimirane multi-bakar oksidaze iz sojeva roda *Bacillus* zadržale su svoju aktivnost nakon 30 min inkubacije na 70 °C (Ihssen, Reiss et al. 2015). Ece i saradnici su testirali aktivnost rekombinantne lakaze iz soja *S. cyaneus* prema supstratu DMP (2,6-dimetoksifenol) i pokazali da postoji aktivnost od 50 % nakon 60 min inkubacije na 60 °C, dok je skoro celokupna aktivnost izgubljena na 90 °C (Ece, Lambertz et al. 2017).

Stabilnost enzima u širokom opsegu pH vrednosti, kao i termostabilnost su među najpoželjnijim svojstvima enzima koji se primenjuju u biotehnološkim i industrijskim procesima, te se može zaključiti da rekombinantni enzimi dobijeni u ovoj studiji pokazuju dobar potencijal za ovakvu vrstu primene.

5.1.4. Primena lakaza iz sojeva roda *Pseudomonas* u razgradnji sintetičkih tekstilnih boja

Iz literature je poznato da bakterijske lakaze mogu da razgrađuju sintetičke boje (Tavares, Cristóvão et al. 2008, Pereira, Coelho et al. 2009, Mishra and Sharma 2014, Narayanan, Murugan et al. 2015). U ovoj studiji je ispitana sposobnost četiri rekombinantne lakaze iz sojeva roda *Pseudomonas* da razgrade sedam boja koje su u širokoj upotrebi u tekstilnoj industriji i industriji boja, a rezultati ovog ispitivanja prikazani su u odeljku 4.11. Među testiranim bojama pet od ukupno sedam pripadaju azo bojama, koje čine 70 % svih proizvedenih sredstava za bojenje tekstila (Tony, Goyal et al. 2009). Čelijskom ekstraktu sa rekombinantnim enzimima je kao redoks medijator dodavan ABTS koji je značajno doprineo procesu razgradnje sintetičkih boja, što je u skladu sa literaturnim podacima o ABTS-u kao medijatoru lakaza (Tavares, Cristóvão et al. 2008). U studiji Tavares i saradnika objašnjeno je da postoje sintetičke boje koje se ne mogu razgraditi direktno lakazom, već je za to neophodan medijator. Pretpostavka je da je redoks potencijal reaktivnih boja veći od redoks potencijala enzima, ili da zbog konformacije koje zauzimaju određene boje postoje sterne smetnje za prilaz aktivnom mestu enzima, pa je iz tog razloga neophodan medijator za transfer elektrona sa boje na enzim (Tavares, Cristóvão et al. 2008).

Rekombinantno eksprimirani CopA enzim iz *P. putida* F6 pokazao najznačajniju aktivnost razgradivši pet od sedam testiranih boja: amido crnu 10B, bromkrezol ljubičastu, Evans plavu, reaktivnu crnu 5 i remazol brilijant plavu (Slika 30B). Enzim CopA je već u prvih 48h razgradio 86 % azo boje reaktivna crna 5, dok je nakon četiri dana ova boja razgrađena u potpunosti. Pereira i saradnici testirali su sposobnost prečišćene rekombinantne CotA lakaze iz vrste *B. subtilis* da razgradi

boju reaktivna crna 5 i kao rezultat dobili 85 % razgradnje nakon 24 h (Pereira, Coelho et al. 2009). Boja koja je u najvećoj meri razgrađena i to od 70 % do 95 % nakon četiri dana, od strane svih rekombinantno eksprimiranih lakaza iz *Pseudomonas* sojeva je amido crna 10B. Mišra i saradnici testirali su tri *Bacillus* izolata iz zemljišta i dobili 50 % – 84 % razgradnje amido crna 10B boje nakon četiri dana inkubacije sa bakterijskom kulturom (Mishra and Sharma 2014). Rekombinantni enzim McoCA3 iz ćelijskog ekstrakta *P. putida* CA-3 razgradio je 95 % boje bromkrezol ljubičasta iz grupe trifenil-metan boja nakon četiri dana inkubacije. U radu Hmelove i Ondrejoviča prečišćena lakaza iz gljive *Ceriporiopsis subvermispora* je u roku od 168 h razgradila 71,6 % boje bromkrezol ljubičasta (Chmelová and Ondrejovič 2016). Od svih testiranih boja, jedino su eritrozina B i oranž G ostale nerazgrađene.

Većina studija koja se bavi razgradnjom tekstilnih boja usmerena je ka lakazama iz gljiva (Jesus, Corso et al. 2010, Legerská, Chmelová et al. 2016, Yesilada, Birhanli et al. 2018). Sve rekombinantno eksprimirane lakaze iz sojeva roda *Pseudomonas* ispitane u ovom radu pokazale su dobar potencijal za razgradnju tekstilnih boja, uzimajući u obzir da su u eksperimentima korišćeni ćelijski ekstrakti, a ne prečišćeni enzimi.

5.2. Lipaze

Velikoj i raznovrsnoj grupi enzima hidrolaza pripadaju i enzimi koji katalizuju hidrolizu estarske veze. Estarska veza je prisutna kod jedinjenja prirodnog porekla (masti, ulja, vosak, prirodni poliestri) i sintetičkih jedinjenja (sintetički poliestri). Najznačajniji predstavnici enzima koji katalizuju hidrolizu estarske veze su lipaze i fosfolipaze. U današnje vreme je veoma rasprostranjena upotreba ovih enzima kao biokatalizatora u različitim industrijskim procesima (Borrelli and Trono 2015). U industrijskoj proizvodnji na globalnom nivou lipaze zauzimaju treće mesto, iza proteaza i amilaza (karbohidraza) (Javed, Azeem et al. 2018). Lipaze poreklom iz mikroorganizama su najpraktičnije za upotrebu zbog stabilnosti, širokog spektra katalitičkog dejstva i jednostavnijeg procesa genetičke manipulacije koji omogućava visok prinos enzima. Iz literature je poznato da bakterijske lipaze pokazuju značajnu aktivnost u neutralnim i alkalnim uslovima, kao i da su termostabilne (Wang, Srivastava et al. 1995, Royter, Schmidt et al. 2009, Cherif, Mnif et al. 2011, Ben Bacha, Moubayed et al. 2015). Pokazano je da se bakterijski sojevi roda *Pseudomonas*, među kojima *P. alcaligenes*, *P. aeruginosa*, *P. fragi* i *P. fluorescens*, mogu koristiti za proizvodnju velikih količina enzima lipaza (Chandra, Enespa et al. 2020). Osim u industrijskoj proizvodnji, lipolitički enzimi imaju potencijal za upotrebu i u bioremedijaciji, odnosno ubrzavanju procesa biorazgradnje polimernih materijala koji se u današnje vreme sve češće koriste kao alternativa plastici (Chen, Bei et al. 2000, Sekosan and Vasanthan 2010, Kanmani, Kumaresan et al. 2016, Ponjavic, Nikolic et al. 2017, Khan, Nagarjuna et al. 2019). U ovom radu istražen je aplikativni potencijal lipolitičkih enzima iz sojeva roda *Pseudomonas*.

5.2.1 Identifikacija lipolitičkih enzima u sojevima roda *Pseudomonas*

Pokazano je da mnoge vrste u okviru roda *Pseudomonas* poseduju enzime lipaze (Gilbert 1993, Chandra, Enespa et al. 2020). Literaturni podaci govore o tome da se ovi enzimi uglavnom ne eskprimiraju konstitutivno, već je neophodno prisustvo inducera (Zarevúcka 2012). Biljna ulja su se pokazala kao dobri induceri biosinteze i aktivnosti lipaza, a među njima je najveći uticaj imalo maslinovo ulje (Sokolovská, Albasi et al. 1998, Lakshmi, Kanguane et al. 1999, Zarevúcka 2012). Za maslinovo ulje je pokazano da može indukovati lipolitičku aktivnost i kod vrsta iz roda *Pseudomonas* (Rasmey, Aboseidah et al. 2017). Stoga je kod sedam sojeva roda *Pseudomonas* iz laboratorijske kolekcije ispitana enzimska aktivnost lipaza kvalitativnom analizom na čvrstim hranljivim podlogama sa dodatkom maslinovog ulja i indikatorske boje (odeljak 4.12). U ovom testu su lipolitičku aktivnost pokazala dva soja – *P. chlororaphis* B-561 i *P. aeruginosa* PAO1, što je

prikazano na Slici 31. Prisustvo lipaza u sojevima *P. chlororaphis* B-561 i *P. aeruginosa* PAO1 u saglasnosti je sa literaturnim podacima (Hou 1994, Jaeger and Kovacic 2014). U literaturi se navodi da patogeni soj *P. aeruginosa* PAO1 poseduje oko stotinu putativnih lipolitičkih enzima esteraza, lipaza i fosfolipaza, ali da je samo nekolicina ovih enzima ispitana, uprkos činjenici da je genom ovog soja sekvenciran i da je većini gena dodeljena funkcija (Jaeger and Kovacic 2014). Takođe, pokazano je da vrsta *P. chlororaphis* poseduje enzime lipaze (Poritsanos, Selin et al. 2006, Selin, Habibian et al. 2010, Sharma, Mohanan et al. 2019). Ostali testirani sojevi nisu pokazali lipolitičku aktivnost na čvrstim hranljivim podlogama sa dodatkom maslinovog ulja. U ovoj studiji izveden je još jedan kvalitativni test kojim je analizirana proizvodnja enzima sa lipolitičkom aktivnošću u zavisnosti od izvora ugljenika prisutnog u minimalnom medijumu (odjeljak 4.13). Ispitani su vanćelijski i unutarćelijski proteini sojeva kod kojih je u prethodnom testu detektovana lipolitička aktivnost (*P. chlororaphis* B-561 i *P. aeruginosa* PAO1), kao i ćelijski proteini negativne kontrole (*P. putida* KT2440) na podlozi sa maslinovim uljem i indikatorskom bojom rodamin B. Kod obe frakcije proteina sojeva *P. chlororaphis* B-561 i *P. aeruginosa* PAO1 gajenih na 0,1 % glukozi ili 1 % maslinovom ulju detektovana je lipolitička aktivnost (Slika 32). Međutim, intenzitet fluorescencije na mestima gde se desila enzimaska hidroliza maslinovog ulja na slobodne masne kiseline bio je veći kod sojeva koji su gajeni u minimalnom medijumu sa 1 % maslinovim uljem kao jedinim izvorom ugljenika. U literaturi je pokazano da se lipolitička aktivnost kod vrste *P. aeruginosa*, iako u manjoj meri, može detektovati i kada je bakterija gajena u medijumu u kome nije prisutno ulje kao inducer. Ovo se može objasniti činjenicom da se transkripcija gena koji kodiraju enzime sa lipolitičkom aktivnošću odvija na bazalnom nivou i bez inducera, ali samo onda kada je glukoza u medijumu prisutna u niskim koncentracijama, manjim od 0,5 %, dok u višim koncentracijama glukoza može suprimirati ekspresiju ovih gena (Uscátegui, Jiménez-Junca et al. 2012). Proteini iz vanćelijske frakcije pokazali su veću lipolitičku aktivnost u odnosu na unutarćelijsku frakciju kod oba soja, što je u skladu sa literaturnim podacima o vanćelijskim lipazama kod sojeva roda *Pseudomonas* – *P. aeruginosa* PAO1 i *P. chlororaphis* PA23 (Wohlfarth, Hoesche et al. 1992, Jaeger and Rosenau 2004, Sharma, Mohanan et al. 2019). Ćelijski proteini soja *P. putida* KT2440 ni u ovom testu nisu pokazali lipolitičku aktivnost, što je u skladu sa literaturnim podacima i rezultatima prethodnog testa za lipaze obavljenog u ovoj studiji.

5.2.2. Enzimaska razgradnja PHA i PCL polimera na čvrstim podlogama

Iako se dugo smatralo da se biopolimeri mogu spontano razgraditi do organske materije, ovi materijali nisu spontano biorazgradivi. Poznato je da se dejstvom odgovarajućih hidrolitičkih enzima mikroorganizama ovi materijali mogu u potpunosti razgraditi (Tokiwa, Calabria et al. 2009, Wierckx, Narancic et al. 2018). Za razgradnju polimera, naročito onih prirodnog porekla, mikroorganizmi koriste enzime depolimeraze, kao i enzime sa esteraznom aktivnošću, lipaze i kutinaze. Potpuna razgradnja biopolimera do ugljen-dioksida i vode, odnosno mineralizacija, može se odvijati tokom rasta bakterija, pod dejstvom bakterijskih hidrolitičkih enzima *in situ*, u zemljištu ili vodenoj sredini (Prieto 2016). Nedavna istraživanja Ponjavić i saradnika pokazala su da soj *P. aeruginosa* PAO1 razgrađuje hidrofilni PCL/PEO (polikaprolakton/poli(etilen-oksidi)) blok kopolimer (Ponjavic, Nikolic et al. 2017). Literaturni podaci i lipolitička aktivnost sojeva *P. aeruginosa* PAO1 i *P. chlororaphis* B-561 koja je potvrđena u ovoj studiji usmerili su tok istraživanja ka lipolitičkim enzimima koji bi potencijalno mogli da se primene u biorazgradnji polimera.

Kako bi se ispitalo dejstvo lipolitičkih enzima na biorazgradnju polimera, testirani su vanćelijski, unutarćelijski i ukupni ćelijski proteini sojeva *P. aeruginosa* PAO1 i *P. chlororaphis* B-561 (koji su gajeni na 1 % maslinovom ulju, ili na 0,1 % glukozi) na čvrstim podlogama koje u svom sastavu imaju rastvorene polimere PCL i PHA srednjeg lanca (odjeljak 4.14). Kao što je i pretpostavljeno, pokazalo se da lipolitički enzimi koje poseduju sojevi *P. aeruginosa* PAO1 i *P. chlororaphis* B-561 mogu da razgrađuju biopolimere polikaprolaktona i polihidroksialkanoata srednjeg lanca u sastavu čvrstih agaroznih podloga, što je i prikazano na Slici 33. Zone razgradnje

polimera oko bunarića sa nanetim uzorcima razlikovale su se u zavisnosti od izvora ugljenika na kome su sojevi gajeni. Veličine zona kod sojeva gajenih na ulju i sojeva gajenih na glukozu pokazale su razlike od ~50 % za vanćelijske proteine, ~30 % za unutarćelijske proteine soja *P. chlororaphis* B-561 i ~40 % za ukupne proteine kod soja *P. aeruginosa* PAO1 u korist sojeva gajenih na ulju. Kod ostalih uzoraka veličina zona je bila prilično ujednačena. Takođe je uočeno da su zone razgradnje oko ćelijskih proteina sojeva gajenih na glukozu opalescentne i da se razgradnja polimera u najvećoj meri odvijala na površini podloge. Sa druge strane, oko uzoraka sojeva gajenih na maslinovom ulju kao jedinom izvoru ugljenika zone razgradnje su bile bistre i prostirale su se celom dubinom podloge. Još jednom, ulje se pokazalo kao dobar inducer ekspresije lipolitičkih enzima sa ulogom u biorazgradnji polimernih materijala kod oba soja, ali je soj *P. chlororaphis* B-561 u većoj meri razgradio polimere. U radu Mabruk i Sabri pokazano je da bakterija *Streptomyces* sp. SNG9 razgrađuje poli(hidroksi-butirat) (PHB) u sastavu čvrste podloge enzimom PHB depolimerazom i da se može gajiti u medijumu koji sadrži ovaj polihidroksialkanoat kratkog lanca kao jedini izvor ugljenika (Mabrouk and Sabry 2001). Čua i saradnici su opisali biorazgradnju PCL u sastavu čvrstih podloga enzimom depolimerazom iz termofilne vrste *Streptomyces thermoviolaceus subsp. thermoviolaceus* 76T-2 (Chua, Tseng et al. 2013). Šarma i saradnici pokazali su da enzimi depolimeraze i lipaze iz sojeva *Acinetobacter lwoffii* i *P. chlororaphis* PA23 razgrađuju polihidroksialkanoate srednjeg lanca u okviru čvrste podloge (Sharma, Mohanan et al. 2019).

Kako u ovom radu nije bilo značajne razlike u aktivnosti frakcija supernatanata i ćelijskih ekstrakata, moglo se zaključiti da su enzimi koji su učestvovali u razgradnji biorazgradivih polimera bili dvojakog porekla – vanćelijski i unutarćelijski, te su u daljem radu korišćeni ukupni ćelijski proteina sojeva gajenih na ulju kao jedinom izvoru ugljenika.

5.2.3. Enzimska razgradnja PHA i PCL polimera u pufetu

Za razliku od prethodnog testa u kome je ispitivano dejstvo lipolitičkih enzima na biorazgradnju polimera koji su rastvoreni u čvrstoj podlozi, u ovom testu su polimeri PCL i PHA srednjeg lanca u formi čvrstog filma inkubirani sa ukupnim ćelijskim proteinima sojeva *P. aeruginosa* PAO1 i *P. chlororaphis* B-561. Aktivnost ukupnih ćelijskih proteina nakon četiri nedelje tretmana potvrđena je prisustvom površinske erozije kod oba materijala, kao i umerenim gubitkom mase od 1 % – 1,3 % (odjeljak 4.15). Ponjavic i saradnici su u svojim eksperimentima koristili frakciju unutarćelijskih proteina iz soja *P. aeruginosa* PAO1 što je rezultovalo sličnim procentualnim gubitkom mase PCL polimera (Ponjavic, Nikolic et al. 2017, Ponjavic, Nikolic et al. 2018). Kod Hermanove i saradnika opisana je razgradnja PCL polimera sa gubitkom mase od 3,3 % nakon četiri nedelje inkubacije, što je oko dva i po puta veći gubitak mase u odnosu na onaj koji je postignut tretmanom ukupnim ćelijskim proteinima soja *P. chlororaphis* B-561, ali je u tom radu korišćena prečišćena, komercijalna lipaza iz gljive *Aspergillus oryzae* (Hermanová, Omelková et al. 2012). U poređna analiza mikrofotografija PCL polimera pre izlaganja enzimskom dejstvu ukupnih ćelijskih proteina i četiri nedelje od početka eksperimenta pokazala je izmenjenu morfologiju, odnosno prostornu organizaciju sferulita na površini polimera, koji su se nakon delovanja enzima smanjili (Slika 34A). FTIR spektroskopskom analizom uočene su neznatne promene u vrednostima karbonil indeksa i indeksa kristaliniteta (CI – bez promene, indeks kristaliniteta – do 1 %) (Slika 35), što govori u prilog tome da u toku četiri nedelje tretmana nije došlo do značajne promene u uređenim regionima PCL polimera. Kristalnu strukturu i stopu biorazgradnje PCL polimera proučili su Ivata i Doi u studiji u kojoj je sintetisan samo jedan kristal PCL da bi se ispitalo dejstvo lipaze iz *Pseudomonas* sp. na mikrostrukturu polimera (Iwata and Doi 2002). U ovom radu pokazano je da se biorazgradnja odvija brže u „labavo“ pakovanim, tj. amorfnijim regionima kristala, pa tek onda u uređenijim delovima. U studiji autora Sekosan i Vasanten takođe je analiziran uticaj kristalne uređenosti na enzimsku razgradnju PCL polimera. Zaključeno je da stopa razgradnje PCL polimera enzimom lipazom mnogo zavisi od inicijalne strukture polimera i da se polimeri većeg kristaliniteta sporije razgrađuju. Suprotni fenomeni opisani su kod PCL polimera kod kojih je inicijalno prisutan nizak kristalinitet. Razgradnja

uvek počinje u amorfim delovima kod polimera niskog kristaliniteta, dok se u polimerima visokog kristaliniteta uporedo sa razgradnjom amorfih delova istovremeno dešava i razgradnja visoko uređenih delova (Sekosan and Vasanthan 2010). PCL polimeri korišćeni u ovoj studiji imali su visok nivo kristalne uređenosti, pa su dobijeni rezultati u potpunosti u skladu sa literaturnim podacima.

PHA biopolimeri su nakon četiri nedelje delovanja lipolitičkih enzima sojeva *P. aeruginosa* PAO1 i *P. chlororaphis* B-561 pokazali površinsku eroziju, odnosno morfološke promene u vidu tankih pukotina u odnosu na netretirane polimere (Slika 34B). Praćenje CI indeksa i indeksa kristaliniteta nije bilo moguće zbog amorfne prirode polimera. Veoma je malo podataka u literaturi o razgradnji polihidroksialkanoata srednjeg lanca. Većina tih studija se, za razliku od ove, zasnivala na ispitivanju dejstva celih bakterijskih kultura na razgradnju PHA polimera srednjeg lanca (Woolnough, Charlton et al. 2008). Kumagai i saradnici su posmatrali enzimsku razgradnju PHA biopolimera sastavljenog od poli(hidroksi-butirata) (PHB), enzimom PHB depolimerazom iz soja *Alcaligenes faecalis* T1 i zaključili da enzim prvo hidrolizuje PHB lance u amorfim regionima na površini polimera, a nakon toga dolazi do hidrolize PHB lanaca u kristalnim regionima (Kumagai, Kanesawa et al. 1992).

5.2.4. Enzimska razgradnja PHA i PCL polimera u modelu komposta

Osim što su biorazgradivi, biopolimeri su netoksični, a proizvodi koji nastaju njihovom razgradnjom su neškodljivi za životnu sredinu i žive organizme. Iz tog razloga ovi materijali su pogodni za kompostiranje (Gómez and Michel 2013). Enzimi sa lipolitičkom aktivnošću iz sojeva *P. aeruginosa* PAO1 i *P. chlororaphis* B-561 su u ovoj studiji pokazali dobar potencijal za biorazgradnju polimera (odeljci 4.14 i 4.15). Kako bi se ispitala potencijalna primena lipolitičkih enzima u kompostiranju, dizajniran je laboratorijski model sistem komposta, a iz testiranja je, zbog činjenice da je oportunistički patogen, izostavljen soj *P. aeruginosa* PAO1. U laboratorijskom sistemu komposta korišćen je soj *P. chlororaphis* B-561 i dve vrste polimera – PCL i PHA srednjeg lanca (odeljak 4.16). Eksperiment u kome je ispitivana sposobnost razgradnje polimera u laboratorijskom model sistemu komposta trajao je četiri nedelje za PCL, odnosno osam nedelja za PHA. Temperatura na kojoj je inkubiran kompost sistem (37 °C) pogodna je za njegovu potencijalnu upotrebu u domaćinstvu.

Gubitak mase PCL polimera u kompost sistemu sa uvedenom bakterijskom kulturom *P. chlororaphis* B-561 iznosio je 15,5 %, a u negativnoj kompost kontroli sa autohtonim mikroorganizmima 11,7 %. U sterilnoj kontroli, bez prisustva mikroorganizama, masa PCL polimera nije se menjala. U studiji Funabašija i saradnika PCL polimer je u roku od tri nedelje razgrađen u mnogo većem procentu – 60 %, ali je umesto čvrstog filma testiran u formi mehanički izdrobljenog praha, a eksperiment razgradnje je izveden u kontrolisanim uslovima na temperaturi 58 °C, što je samo nekoliko stepeni ispod temperature topljenja samog polimera (Funabashi, Ninomiya et al. 2009). Narančić i saradnici su u svom radu pokazali kompletnu razgradnju PCL polimera nakon 20 nedelja u zemljištu obogaćenom zrelim kompostom (Narancic, Verstichel et al. 2018). Al Hosni je sa saradnicima takođe ispitao biorazgradivost ovog polimera u kontrolisanim uslovima u kompost model sistemu i objasnio da je na njegovu potpunu razgradnju nakon 91 dana najviše uticala temperatura od 50 °C (Al Hosni, Pittman et al. 2019). U ovom radu je optičkom mikroskopijom utvrđeno da je nakon tretmana PCL polimera bakterijskom kulturom *P. chlororaphis* B-561 došlo do kompletne izmene u morfologiji sferulita, koji su bili jedva vidljivi (Slika 36A). Iako su promene na tretiranom PCL polimeru nakon četiri nedelje bile vidljive čak i golim okom, analizom FTIR spektra nakon tretmana nisu uočene značajne promene u karbnil indeksu ovog polimera u odnosu na netretirani polimer (Slika 38). Kao što je već opisano, u procesu razgradnje polimera visokog kristaliniteta najčešće se prvo razgrađuju prostorno neuređeni, amorfni domeni, a nakon toga visoko uređeni, kristalni domeni, što se može pratiti promenom indeksa kristaliniteta. Promene u indeksu kristaliniteta primećene su samo kod PCL filmova koji nisu tretirani bakterijskom kulturom

P. chlororaphis B-561 – u negativnoj kompost kontroli (gubitak mase od 11,7 %) i sterilnoj kontroli (bez gubitka mase), dok je kod tretiranog uzorka indeks kristaliniteta ostao nepromenjen (61 %). Ovaj rezultat, kao i relativno visok gubitak mase tretiranih PCL polimera u vremenskom periodu od četiri nedelje sugerišu da se pod uticajem hidrolitičkih enzima soja *P. chlororaphis* B-561 odvijala progresivna, istovremena razgradnja amorfnih i kristalnih regiona polimera, što je u skladu sa literaturnim podacima (Sekosan and Vasanthan 2010). Na ovaj način može se objasniti činjenica da je indeks kristaliniteta ostao nepromenjen, uprkos vidljivoj površinskoj eroziji, prikazanoj na fotografijama i mikrografijama (Slika 36). Posmatranjem PCL filma u celini, jasno je da se odigrala nehomogena razgradnja, s obzirom da su delovi filma potpuno uništeni (prisutne su perforacije), što je i prikazano na Slici 36B. FTIR analiza rađena je na očuvanim delovima polimera. PCL polimeri iz kontrolnih kompost sistema nisu pokazali tako progresivnu razgradnju.

U ovoj studiji, u eksperimentu koji je trajao 56 dana, posmatran je gubitak mase PHA srednjeg lanca u negativnoj kompost kontroli i sterilnoj kontroli uporedo sa laboratorijskim kompost sistemom u koji je dodavana bakterijska kultura *P. chlororaphis* B-561. Jasno je uočeno da je biorazgradnja ubrzana dodavanjem sveže bakterijske kulture soja *P. chlororaphis* B-561, čime je postignut oko dva puta veći gubitak mase (12,1 %) u odnosu na negativnu (5,7 %) i sterilnu kontrolu (6,2 %). Literaturni podaci koji se tiču biorazgradnje i kompostiranja uglavnom se odnose na PHA polimere kratkog lanca, i to pretežno polihidroksibutirat (PHB), dok se samo nekoliko studija bavilo PHA polimerima srednjeg lanca. U eksperimentu Lima i saradnika koji je trajao 112 dana ispitivan je potencijal biorazgradnje PHA polimera srednjeg lanca *in situ*, enzimima mikroorganizama prirodno prisutnim u tropskom zemljištu i kao rezultat je dobijen gubitak mase od 16,7 % u kiselom šumskom zemljištu, 3 % u baznom zemljištu i 4,5 % u zemljištu šume mangrove (Lim, Gan et al. 2005). Narančić i saradnici su testirali razgradnju polihidroksioktanoata (PHO) u zemljištu obogaćenom zrelim kompostom i ovaj polimer je i nakon dve godine izlaganja dejstvu mikroorganizama ostao skoro netaknut (Narancic, Verstichel et al. 2018). U ovoj studiji mikrografije tretiranih, kompostiranih PHA polimera srednjeg lanca takođe su pokazale izmenjenu morfologiju, sa pukotinama na površini (Slika 37A), dok su na fotografijama promene u izgledu polimera nakon osam nedelja slabije primetne (Slika 37B). Pokazano je da veliki broj parametara može uticati na stopu biorazgradnje različitih polimera, uključujući i PHA. Među njima su sredinski uslovi – populacija mikroorganizama, dostupnost vode, temperatura, zatim oblik i debljina testiranog polimernog materijala, tekstura, poroznost i stepen kristalne uređenosti, kao i prisustvo drugih komponenti u sastavu samog materijala – polimernih punila i sredstva za bojenje (Lee and Choi 1999). Matavulj i Molitoris izveli su zanimljivu studiju u kojoj su u toku 50 nedelja, na 11 različitih lokacija testirali biorazgradivost materijala BIOPOL® (Zeneca BioProducts), sastavljen od PHA kratkih lanaca (Matavulj and Molitoris 2000). Najveća stopa biorazgradnje uočena je u kompostu (100 % razgradnja nakon 10 nedelja), tresetu staklenika (100 % nakon 40 nedelja), gradskoj deponiji (100 % nakon 45 nedelja) i u kanalizacionom postrojenju u aerobnim (100 % nakon 50 nedelja) i anaerobnim uslovima (98 % nakon 50 nedelja) (ASTM D6400, American Society for Testing and Materials 1999).

Pod uticajem bakterijske kulture soja *P. chlororaphis* B-561 u ovoj studiji je PCL polimer razgrađen je u znatno većoj meri u odnosu na PHA (Slike 36 i 37).

5.2.5. Rekombinantna ekspresija lipaza iz sojeva *P. aeruginosa* PAO1 i *P. chlororaphis* B-561 u homologom domaćinu i analiza enzimske aktivnosti

Iako su procesi katalizovani lipazama od velikog komercijalnog značaja, danas su ovi enzimi nedovoljno u upotrebi zbog niskog prinosa i nedostatka optimalnih performansi u izvornom obliku. Jedan od načina da se prevaziđe ovaj problem je rekombinantna ekspresija (Borrelli and Trono 2015). U ovoj studiji je pokazan potencijal lipolitičkih enzima iz dva soja roda *Pseudomonas* (*P. aeruginosa* PAO1 i *P. chlororaphis* B-561) za buduću primenu u biorazgradnji polimernih materijala. Usledila je identifikacija genetičkih determinanti koje kodiraju lipaze u ovim sojevima, njihovo umnožavanje, kloniranje i rekombinantna ekspresija (odjeljak 4.17). U literaturi se pominje veliki broj gena koji kodiraju lipaze u sojevima roda *Pseudomonas*, kloniranih i heterologo eksprimiranih u *E. coli* ćelijama (Iizumi, Nakamura et al. 1991, Oshima-Hirayama, Yoshikawa et al. 1993, Liu, Li et al. 2017). Problem kod ovog pristupa je nakupljanje inkluzionih tela u ćeliji domaćina koja “zarobljavaju” i deaktiviraju molekule enzima. Sa druge strane, enzimi lipaze mogu se eksprimirati homologo, u ćelijama domaćina sa istim ili sličnim signalnim putevima. U *Pseudomonas* domaćinu homologo je eksprimirana lipaza iz soja *P. alcaligenes* zajedno sa svojim šaperonom (Gerritse, Hommes et al. 1998), kao i lipaza iz soja *P. fluorescens* SIK W1 zajedno sa ABC transporterom (Ahn, Pan et al. 2001). Nakon opsežne bioinformatičke analize dostupnih sekvenci gena koji kodiraju enzime sa esteraznom aktivnošću u sojevima *P. aeruginosa* PAO1 i *P. chlororaphis* B-561, u ovom radu su za umnožavanje i ekspresiju odabrana tri gena, uz mogućnost da se nakon preliminarnih ispitivanja studija proširi na ostale gene kandidate. Umnoženi su i klonirani geni koji kodiraju lipazu A (*lipA*) i fosfolipazu C (*plcB*) iz soja *P. aeruginosa* PAO1, kao i lipazu A (*lipA*) iz *P. chlororaphis* B-561, a homologa ekspresija je vršena u *P. putida* KT2440 domaćinu, biološki bezbednom za genetičku manipulaciju (Loeschcke and Thies 2015).

Aktivnost homologo eksprimiranih enzima testirana je u kvantitativnom enzimskom eseju sa supstratom *p*-nitrofenil palmitatom (*p*-NPP) (odjeljak 4.18). Ispitane su vanćelijske i unutarćelijske frakcije proteina divljih sojeva (*P. aeruginosa* PAO1 i *P. chlororaphis* B-561 – pozitivne kontrole, *P. putida* KT2440 – negativna kontrola), kao i rekombinantnih sojeva. U ovom testu najvišu aktivnost pokazale su vanćelijske frakcije proteina divljih sojeva *P. aeruginosa* PAO1 i *P. chlororaphis* B-561, a zatim unutarćelijske frakcije proteina rekombinantnih sojeva sa ukloniranom fosfolipazom C iz *P. aeruginosa* PAO1, ukloniranom lipazom A iz *P. aeruginosa* PAO1 i ukloniranom lipazom A iz *P. chlororaphis* B-561 (Slika 40). Nižu aktivnost pokazali su supernatanti rekombinantnih sojeva i ćelijski ekstrakti divljih sojeva *P. aeruginosa* PAO1 i *P. chlororaphis* B-561. Najnižu aktivnost pokazali su vanćelijski i unutarćelijski proteini negativne kontrole, divljeg soja *P. putida* KT2440. Lipolitička aktivnost uočena u uzorcima vanćelijskih proteina divljih sojeva *P. aeruginosa* PAO1 i *P. chlororaphis* B-561, kao i nedostatak aktivnosti kod soja *P. putida* KT2440 očekivane su i u skladu sa prethodnim rezultatima iz ovog rada koji se tiču razgradnje supstrata za lipaze. Takođe, značajna aktivnost lipaza u uzorcima ćelijskih ekstrakata rekombinantnih sojeva u skladu je sa očekivanjima. U literaturi se navodi da su lipaza A i fosfolipaza C poreklom iz soja PAO1 vanćelijski enzimi, odnosno da se transportuju kroz ćelijsku membranu u vanćelijski prostor da bi vršili svoju funkciju (Wohlfarth, Hoesche et al. 1992, Barker, Vasil et al. 2004), dok lipaza iz soja *P. chlororaphis* B-561 još uvek nije okarakterisana. Transport vanćelijske lipaze A i fosfolipaze C u soju *P. aeruginosa* PAO1 vrši se veoma složenim Xcp sistemom, koji je deo sekretornog puta tip II, i koji podrazumeva interakciju sa signalnim peptidom u sastavnom delu proenzima (Wohlfarth, Hoesche et al. 1992, Durand, Bernadac et al. 2003). S obzirom na kompleksnost sekretornog sistema, u ovoj studiji je *P. putida* KT2440 domaćin poslužio za ispitivanje funkcionalnosti ukloniranih gena i aktivnosti rekombinantnih enzima, a ostavljen je prostor za naknadnu optimizaciju procesa njihove sekrecije u spoljašnju sredinu, radi potencijalne upotrebe ovih enzima u biokatalizi i biorazgradnji polimernih materijala.

6. ZAKLJUČCI

6.1. Lakaze

- Inicijalnim pretraživanjem sojeva roda *Pseudomonas* iz kolekcije Laboratorije za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (Univerzitet u Beogradu), na prisustvo enzima lakaza utvrđena je specifična enzimska aktivnost kod tri od ukupno sedam testiranih sojeva. Najznačajnija aktivnost uočena je kod soja *P. putida* F6, zatim kod sojeva *P. putida* KT2440 i *P. putida* CA-3, što je indikator prisustva genetičkih determinanti za lakazu u ovim sojevima.
- *In silico* analiza poznatih sekvenci gena koji kodiraju lakaze potvrdila je da su ovi enzimi rasprostranjeni kod vrsta roda *Pseudomonas*.
- Lančanom reakcijom polimeraze umnoženi su geni koji kodiraju nove enzime multi-bakar oksidaze – lakaze u sojevima *P. putida* KT2440 i *P. putida* CA-3. S obzirom da sličnost aminokiselinskih sekvenci ovih proteina iznosi 98 %, zaključeno je da se radi o srodnim proteinima kod ova dva soja. Sekvence gena označene kao *mcoKT* i *mcoCA3* deponovane su u GenBank bazu podataka.
- S obzirom da geni koji kodiraju lakaze nisu umnoženi u soju *P. putida* F6 upotrebom izrođenih prajmera, prečišćen je protein sa aktivnošću lakaze iz ovog soja. Bioinformatičkom analizom N-terminalne sekvence prečišćenog proteina i celokupne genomske sekvence ovog soja detektovani su geni potencijalno odgovorni za lakaznu aktivnost u ovom soju – *cbp* i *copA*. Ovi geni nemaju nikakve sličnosti sa genima *mcoKT* i *mcoCA3* pa se može zaključiti da soj *P. putida* F6 poseduje drugi tip multi-bakar oksidaza, koje se razlikuju od ostalih analiziranih u ovom radu.
- Četiri nova enzima, McoCA3, McoKT, Cbp i CopA dobijena su rekombinantnom ekspresijom u heterologom domaćinu *E. coli* BL21[DE3]. Enzimi su funkcionalni, poseduju oksidativnu aktivnost lakaza, te se može zaključiti da je ovaj domaćin pogodan za njihovu rekombinantnu proizvodnju.
- Nove rekombinantne lakaze pokazale su oksidativnu enzimsku aktivnost u širokom opsegu pH i temperatura, kao i visoku termostabilnost. Oksidativna aktivnost značajno je uvećana dodatkom Cu^{2+} jona u enzimске eseje, što je u skladu sa podacima iz literature o enzimima lakazama.
- Sojevi roda *Pseudomonas* su dobar izvor enzima koji imaju potencijal za primenu u bioremedijaciji. Svi ćelijski ekstrakti sa rekombinantnim enzimima pokazali su dobar potencijal za razgradnju postojanih sintetičkih tekstilnih boja u prisustvu ABTS medijatora. Ćelijski ekstrakt sa rekombinantnim CopA enzimom iz *P. putida* F6 pokazao je najznačajniju aktivnost razgrađivši pet od sedam testiranih boja: amido crnu 10B, bromkrezol ljubičastu, Evans plavu, reaktivnu crnu 5 i remazol brilijant plavu.

6.2. Lipaze

- Pretraživanjem kolekcije sojeva roda *Pseudomonas* na prisustvo enzima lipaza ustanovljeno da dva od ukupno sedam ispitanih sojeva pokazuju lipolitičku aktivnost – *P. aeruginosa* PAO1 i *P. chlororaphis* B-561. S obzirom da su sojevi gajeni na 1 % maslinovom ulju kao jedinom izvoru ugljenika pokazali veću aktivnost nego sojevi gajeni na glukozi, zaključeno je da je maslinovo ulje dobar inducer aktivnosti lipolitičkih enzima u ovim sojevima.
- Sojevi roda *Pseudomonas* – *P. aeruginosa* PAO1 i *P. chlororaphis* B-561 su dobar izvor lipaza, enzima koji poseduju potencijal za upotrebu u tretmanu polimernih materijala prirodnog porekla, polihidroksialkanoata srednjeg lanca i sintetičkog poliestra polikaprolaktona:
 - U testovima biorazgradnje pokazano je da ukupni ćelijski proteini sojeva *P. aeruginosa* PAO1 i *P. chlororaphis* B-561 mogu da izazovu enzimsku razgradnju polimernih materijala mclPHA i PCL u sastavu čvrstih podloga i u puferu.
 - U model sistemu komposta obogaćenim bakterijskom kulturom *P. chlororaphis* B-561 detektovana je dodatna površinska erozija i gubitak mase u odnosu na kontrole kod oba polimerna materijala: PCL (nakon četiri nedelje) i mclPHA (nakon osam nedelja). Zaključeno je da ovaj soj može ubrzati razgradnju PCL i mclPHA polimera.
 - Umnožena su tri gena koji kodiraju vanćelijske lipolitičke enzime: *lipA* i *plcB* iz soja *P. aeruginosa* PAO1, kao i *lipA* iz *P. chlororaphis* B-561. Geni su eksprimirani u homologom domaćinu *P. putida* KT2440, ali je lipolitička aktivnost detektovana u frakcijama unutarćelijskih proteina, pa je zaključeno da je izostala adekvatna sekrecija rekombinantnih enzima. Potencijalna primena rekombinantnih enzima lipaza u biokatalizi i biorazgradnji polimernih materijala zahteva dodatnu optimizaciju procesa sekrecije u homologom domaćinu.

Ovo istraživanje potvrdilo je da su sojevi roda *Pseudomonas* dobar izvor novih, biotehnološki značajnih lakaza i lipaza. Rezultati koji su dobijeni tokom izrade ove doktorske teze predstavljaju dobru osnovu za nastavak istraživanja i optimizaciju procesa koji bi vodili u smeru primene ovih enzima u biorazgradnji i bioremedijaciji.

LITERATURA

Agrawal, Venkatesh and Pradeep (2018). "Fungal laccase discovered but yet undiscovered." Bioresources and Bioprocessing **5.1** 1-12.

Ahmed, E. H., T. Raghavendra and D. Madamwar (2010). "An alkaline lipase from organic solvent tolerant *Acinetobacter* sp. EH28: application for ethyl caprylate synthesis." Bioresource Technology **101**(10): 3628-3634.

Ahn, J. H., J. G. Pan and J. S. Rhee (2001). "Homologous Expression of the Lipase and ABC Transporter Gene Cluster *tlIDEFA* Enhances Lipase Secretion in *Pseudomonas* spp." Applied and Environmental Microbiology **67**(12): 5506-5511.

Akbari, N., K. Khajeh, S. Rezaie, S. Mirdamadi, M. Shavandi and N. Ghaemi (2010). "High-level expression of lipase in *Escherichia coli* and recovery of active recombinant enzyme through in vitro refolding." Protein Expression and Purification **70**(1): 75-80.

Al Hosni, A. S., J. K. Pittman and G. D. Robson (2019). "Microbial degradation of four biodegradable polymers in soil and compost demonstrating polycaprolactone as an ideal compostable plastic." Waste Manag **97**: 105-114.

Albuquerque, P. B. S. and C. B. Malafaia (2018). "Perspectives on the production, structural characteristics and potential applications of bioplastics derived from polyhydroxyalkanoates." International Journal of Biological Macromolecules **107**: 615-625.

Alcalde, M. (2007). Laccases: biological functions, molecular structure and industrial applications. Industrial enzymes. Dordrecht, Springer: 461-476.

Alexandre, G. and I. B. Zhulin (2000). "Laccases are widespread in bacteria." Trends in biotechnology **18**(2): 41-42.

Almeida, B. C., P. Figueiredo and A. T. P. Carvalho (2019). "Polycaprolactone Enzymatic Hydrolysis: A Mechanistic Study." ACS Omega **4**(4): 6769-6774.

Anayo, O. F., O. C. Peter, U. G. Nneji, A. Obinna, E. C. Scholastica and L. O. Mistura (2019). "The Beneficial Roles of *Pseudomonas* in Medicine, Industries, and Environment: A." *Pseudomonas Aeruginosa: An Armory Within*: 97.

Anobom, C. D., A. S. Pinheiro, R. A. De-Andrade, E. C. Agueiras, G. C. Andrade, M. V. Moura, R. V. Almeida and D. M. Freire (2014). "From structure to catalysis: recent developments in the biotechnological applications of lipases." BioMed Research International **2014**.

Aouf, C., E. Durand, J. Lecomte, M.-C. Figueroa-Espinoza, E. Dubreucq, H. Fulcrand and P. Villeneuve (2014). "The use of lipases as biocatalysts for the epoxidation of fatty acids and phenolic compounds." Green Chemistry **16**(4): 1740-1754.

Arakawa, C. K. and C. A. DeForest (2017). Chapter 19 - Polymer Design and Development. Biology and Engineering of Stem Cell Niches. A. Vishwakarma and J. M. Karp. Boston, Academic Press: 295-314.

Arias, M. E., M. Arenas, J. Rodríguez, J. Soliveri, A. S. Ball and M. Hernández (2003). "Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335." Applied and Environmental Microbiology **69**(4): 1953-1958.

Arregui, L., M. Ayala, X. Gómez-Gil, G. Gutiérrez-Soto, C. E. Hernández-Luna, M. Herrera de los Santos, L. Levin, A. Rojo-Domínguez, D. Romero-Martínez, M. C. N. Saparrat, M. A. Trujillo-Roldán and N. A. Valdez-Cruz (2019). "Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation." Microbial Cell Factories **18**(1): 200.

Artham, T. and M. Doble (2008). "Biodegradation of aliphatic and aromatic polycarbonates." Macromolecular Bioscience **8**(1): 14-24.

Arunkumar, T., D. Alex Anand and G. Narendrakumar (2014). "Production and partial purification of laccase from *Pseudomonas aeruginosa* ADN04." Journal of Pure & Applied Microbiology **8**(2): 727-731.

Avérous, L., L. Moro, P. Dole and C. Fringant (2000). "Properties of thermoplastic blends: starch-polycaprolactone." Polymer **41**(11): 4157-4167.

Avérous, L. and E. Pollet (2012). Biodegradable polymers. Environmental silicate nanobiocomposites, Springer: 13-39.

Azadfar, M., A. H. Gao, M. V. Bule and S. Chen (2015). "Structural characterization of lignin: A potential source of antioxidants guaiacol and 4-vinylguaiacol." International Journal of Biological Macromolecules **75**: 58-66.

Azevedo, H. S. and R. L. Reis (2005). "Understanding the enzymatic degradation of biodegradable polymers and strategies to control their degradation rate."
Baldrian, P. (2006). "Fungal laccases - occurrence and properties." FEMS Microbiology Reviews **30**(2): 215-242.

Banerjee, A., K. Chatterjee and G. Madras (2014). "Enzymatic degradation of polymers: a brief review." Materials Science and Technology **30**(5): 567-573.

Barker, A. P., A. I. Vasil, A. Filloux, G. Ball, P. J. Wilderman and M. L. Vasil (2004). "A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis." Molecular Microbiology **53**(4): 1089-1098.

Bartnikowski, M., T. R. Dargaville, S. Ivanovski and D. Hutmacher (2019). "Degradation mechanisms of polycaprolactone in the context of chemistry, geometry and environment." Progress in Polymer Science **96**: 1-20.

Bassanini, I., E. E. Ferrandi, S. Riva and D. Monti (2021). "Biocatalysis with Laccases: An Updated Overview." Catalysts **11**(1): 26.

Beckett, R. P., N. Ntombela, E. Scott, O. P. Gurjanov, F. V. Minibayeva and C. Liers (2015). "Role of laccases and peroxidases in saprotrophic activities in the lichen *Usnea undulata*." Fungal Ecology **14**: 71-78.

Ben Bacha, A., N. M. Moubayed and I. Abid (2015). "Thermostable, alkaline and detergent-tolerant lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus stearothermophilus*." Indian Journal of Biochemistry and Biophysics **52**(2): 179-188.

- Berdiev, N. S., J. F. Ziyavitdinov, A. M. Asrorov, S. S. Olimjonov and S. I. Salikhov (2019). "Characterization of a novel lipase from *Pseudomonas aeruginosa*." *Nova Biotechnologica et Chimica* **18**(1): 44-51.
- Berlanga, M., M. T. Montero, J. Fernández-Borrell and R. Guerrero (2006). "Rapid spectrofluorometric screening of poly-hydroxyalkanoate-producing bacteria from microbial mats." *International Microbiology* **9**(2): 95-102.
- Bhardwaj, H., R. Gupta and A. Tiwari (2013). "Communities of Microbial Enzymes Associated with Biodegradation of Plastics." *Journal of Polymers and the Environment* **21**(2): 575-579.
- Bhatwa, A., W. Wang, Y. I. Hassan, N. Abraham, X.-Z. Li and T. Zhou (2021). "Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli* and Strategies to Address Them for Industrial Applications." *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **9**(65).
- Bhave, P. P. and B. N. Kulkarni (2019). "Effect of active and passive aeration on composting of household biodegradable wastes: a decentralized approach." *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture* **8**(1): 335-344.
- Blackwell, C. J., K. Haernvall, G. M. Guebitz, M. Groombridge, D. Gonzales and E. Khosravi (2018). "Enzymatic Degradation of Star Poly(ϵ -Caprolactone) with Different Central Units." *Polymers* **10**(11): 1266.
- Blank, L. M., G. Ionidis, B. E. Ebert, B. Bühler and A. Schmid (2008). "Metabolic response of *Pseudomonas putida* during redox biocatalysis in the presence of a second octanol phase." *The FEBS journal* **275**(20): 5173-5190.
- Blatny, J. M., T. Brautaset, H. C. Winther-Larsen, P. Karunakaran and S. Valla (1997). "Improved broad-host-range RK2 vectors useful for high and low regulated gene expression levels in gram-negative bacteria." *Plasmid* **38**(1): 35-51.
- Bora, L., D. Gohain and R. Das (2013). "Recent advances in production and biotechnological applications of thermostable and alkaline bacterial lipases." *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **88**(11): 1959-1970.
- Bordes, F., E. Cambon, V. Dossat-Létisse, I. André, C. Croux, J. M. Nicaud and A. Marty (2009). "Improvement of *Yarrowia lipolytica* lipase enantioselectivity by using mutagenesis targeted to the substrate binding site." *ChemBioChem* **10**(10): 1705-1713.
- Borrelli, G. M. and D. Trono (2015). "Recombinant Lipases and Phospholipases and Their Use as Biocatalysts for Industrial Applications." *International Journal of Molecular Sciences* **16**(9): 20774-20840.
- Brady, L., A. M. Brzozowski, Z. S. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, S. Tolley, J. P. Turkenburg, L. Christiansen, B. Høge-Jensen and L. Norskov (1990). "A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase." *Nature* **343**(6260): 767-770.
- Brander, S., J. D. Mikkelsen and K. P. Kepp (2014). "Characterization of an alkali- and halide-resistant laccase expressed in *E. coli*: CotA from *Bacillus clausii*." *PLoS One* **9**(6): e99402.

- Byrom, D. (1994). "Plastics from microbes: microbial synthesis of polymers and polymer precursors." Munich: Hanser: 5-33.
- Cañas, A. I. and S. Camarero (2010). "Laccases and their natural mediators: biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes." Biotechnology advances **28**(6): 694-705.
- Cao, S.-L., Y.-M. Huang, X.-H. Li, P. Xu, H. Wu, N. Li, W.-Y. Lou and M.-H. Zong (2016). "Preparation and characterization of immobilized lipase from *Pseudomonas cepacia* onto magnetic cellulose nanocrystals." Scientific reports **6**(1): 1-12.
- Casas-Godoy, L., S. Duquesne, F. Bordes, G. Sandoval and A. Marty (2012). "Lipases: an overview." Lipases and phospholipases: 3-30.
- Chamas, A., H. Moon, J. Zheng, Y. Qiu, T. Tabassum, J. H. Jang, M. Abu-Omar, S. L. Scott and S. Suh (2020). "Degradation Rates of Plastics in the Environment." ACS Sustainable Chemistry & Engineering **8**(9): 3494-3511.
- Chandra, P., Enespa, R. Singh and P. K. Arora (2020). "Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review." Microbial cell factories **19**(1): 169-169.
- Chang, D. H.-E. and K. Sudesh (2013). "Densitometry based microassay for the determination of lipase depolymerizing activity on polyhydroxyalkanoate." AMB Express **3**(1): 1-11.
- Chapman, K. D., J. M. Dyer and R. T. Mullen (2012). "Biogenesis and functions of lipid droplets in plants: thematic review series: lipid droplet synthesis and metabolism: from yeast to man." Journal of lipid research **53**(2): 215-226.
- Chauhan, P. S., B. Goradia and A. Saxena (2017). "Bacterial laccase: recent update on production, properties and industrial applications." 3 Biotech **7**(5): 323-323.
- Chaurasia, P. K., R. Shanker, Singh Yadav and a. S. Yadava (2013). "A review on mechanism of laccase action." Research & Reviews in BioSciences **7.2**: 66-71.
- Chaurasia, S., K. Bhandaria, A. Sharma and A. Dalai (2016). "A review on lipase catalysed synthesis of DHA rich glyceride from fish oils." International Journal for Innovative Research in Science & Technology **3**: 9-19.
- Cheirsilp, B., P. Jeamjounkhaw and H. Aran (2009). "Optimizing an alginate immobilized lipase for monoacylglycerol production by the glycerolysis reaction." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **59**(1-3): 206-211.
- Chen, D., J. Bei and S. Wang (2000). "Polycaprolactone microparticles and their biodegradation." Polymer degradation and stability **67**(3): 455-459.
- Chen, H. (2012). "Assessment of Biodegradation in Different Environmental Compartments of Blends and Composites Based on Microbial Poly (hydroxyalkanoate) s." University of Pisa.
- Cherif, S., S. Mnif, F. Hadrich, S. Abdelkafi and S. Sayadi (2011). "A newly high alkaline lipase: an ideal choice for application in detergent formulations." Lipids in Health and Disease **10**(1): 221.

- Cherukuvada, S. L., A. S. N. Seshasayee, K. Raghunathan, S. Anishetty and G. Pennathur (2005). "Evidence of a double-lid movement in *Pseudomonas aeruginosa* lipase: insights from molecular dynamics simulations." *PLOS Computational Biology* **1**(3): e28.
- Chmelová, D., & Ondrejovič, M. (2016). "Purification and characterization of extracellular laccase produced by *Ceriporiopsis subvermispora* and decolorization of triphenylmethane dyes". *Journal of basic microbiology*, **56**(11), 1173-1182.
- Christopher, L. P., B. Yao and Y. Ji (2014). "Lignin biodegradation with laccase-mediator systems." *Frontiers in Energy Research* **2**: 12.
- Chua, T.-K., M. Tseng and M.-K. Yang (2013). "Degradation of Poly(ϵ -caprolactone) by thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* subsp. *thermoviolaceus* 76T-2." *AMB Express* **3**(1): 8-8.
- Coffen, D. L. (1997). "Enzyme-Catalyzed Reactions." *ChemInform* **28**(34)
- Cole, J. L., G. O. Tan, E. K. Yang, K. O. Hodgson and E. I. Solomon (1990). "Reactivity of the laccase trinuclear copper active site with dioxygen: an x-ray absorption edge study." *Journal of the American Chemical Society* **112**(6): 2243-2249.
- Contesini, F. J., M. G. Davanço, G. P. Borin, K. G. Vanegas, J. P. G. Cirino, R. R. d. Melo, U. H. Mortensen, K. Hildén, D. R. Campos and P. d. O. Carvalho (2020). "Advances in recombinant lipases: production, engineering, immobilization and application in the pharmaceutical industry." *Catalysts* **10**(9): 1032.
- Dalfard, A. B., K. Khajeh, M. R. Soudi, H. Naderi-Manesh, B. Ranjbar and R. H. Sajedi (2006). "Isolation and biochemical characterization of laccase and tyrosinase activities in a novel melanogenic soil bacterium." *Enzyme and microbial technology* **39**(7): 1409-1416.
- Davis, R., G. Duane, S. T. Kenny, F. Cerrone, M. W. Guzik, R. P. Babu, E. Casey and K. E. O'Connor (2015). "High cell density cultivation of *Pseudomonas putida* KT2440 using glucose without the need for oxygen enriched air supply." *Biotechnology and Bioengineering* **112**(4): 725-733.
- de Lorenzo, V. (2008). "Systems biology approaches to bioremediation." *Current opinion in biotechnology* **19**(6): 579-589.
- Delafield, F., M. Doudoroff, N. Palleroni, C. Lusty and R. Contopoulos (1965). "Decomposition of poly- β -hydroxybutyrate by pseudomonads." *Journal of Bacteriology* **90**(5): 1455.
- Dittmer, N. T. and M. R. Kanost (2010). "Insect multicopper oxidases: Diversity, properties, and physiological roles." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **40**(3): 179-188.
- Dizge, N., C. Aydiner, D. Y. Imer, M. Bayramoglu, A. Tanriseven and B. Keskinler (2009). "Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer." *Bioresource technology* **100**(6): 1983-1991.
- Driks, A. (2004). "The bacillus spore coat." *Phytopathology* **94**(11): 1249-1251.

- Du, G. and J. Yu (2002). "Green Technology for Conversion of Food Scraps to Biodegradable Thermoplastic Polyhydroxyalkanoates." Environmental Science & Technology **36**(24): 5511-5516.
- Du, M.-H., Z.-W. Yan, Y.-J. Hao, Z.-T. Yan, F.-L. Si, B. Chen and L. Qiao (2017). "Suppression of Laccase 2 severely impairs cuticle tanning and pathogen resistance during the pupal metamorphosis of *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae)." Parasites & Vectors **10**(1): 171.
- Dubé, E., F. Shareck, Y. Hurtubise, C. Daneault and M. Beauregard (2008). "Homologous cloning, expression, and characterisation of a laccase from *Streptomyces coelicolor* and enzymatic decolourisation of an indigo dye." Applied Microbiology and Biotechnol **79**(4): 597-603.
- Durán, N. and E. Esposito (2000). "Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review." Applied catalysis B: environmental **28**(2): 83-99.
- Durán, N., M. A. Rosa, A. D'Annibale and L. Gianfreda (2002). "Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review." Enzyme and microbial technology **31**(7): 907-931.
- Durand, É., A. Bernadac, G. Ball, A. Lazdunski, J. N. Sturgis and A. Filloux (2003). "Type II Protein Secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: the Pseudopilus Is a Multifibrillar and Adhesive Structure." Journal of Bacteriology **185**(9): 2749-2758.
- Ece, S., C. Lambertz, R. Fischer and U. Commandeur (2017). "Heterologous expression of a *Streptomyces cyaneus* laccase for biomass modification applications." AMB Express **7**(1): 86.
- Eldsäter, C., B. Erlandsson, R. Renstad, A.-C. Albertsson and S. Karlsson (2000). "The biodegradation of amorphous and crystalline regions in film-blown poly (ϵ -caprolactone)." Polymer **41**(4): 1297-1304.
- Enguita, F. J., L. O. Martins, A. O. Henriques and M. A. Carrondo (2003). "Crystal structure of a bacterial endospore coat component. A laccase with enhanced thermostability properties." Journal of Biological Chemistry **278**(21): 19416-19425.
- Espinosa, C., M. Á. Esteban and A. Cuesta (2016). "Microplastics in aquatic environments and their toxicological implications for fish." Toxicology—new aspects to this scientific conundrum. InTech, Rijeka: 113-145.
- Eugenio, M. E., M. Hrenández, R. Moya, R. Martín-Sampedro, J. C. Villar and M. E. Arias (2011). "Evaluation of a new laccase produced by *Streptomyces ipomoea* on biobleaching and ageing of kraft pulps." Bioresources **6**(3): 3231-3241.
- Faizal, I., M. Ohba, A. Kuroda, N. Takiguchi, H. Ohtake, K. Honda and J. Kato (2007). "Bioproduction of 3-methylcatechol from toluene in a two-phase (organic-aqueous) system by a genetically modified solvent-tolerant *Pseudomonas putida* strain T-57." Journal of Environment and Biotechnology Research **7**: 39-44.
- Farnet, A., S. Criquet, S. Tagger, G. Gil and J. L. Petit (2000). "Purification, partial characterization, and reactivity with aromatic compounds of two laccases from *Marasmius quercophilus* strain 17." Canadian Journal of Microbiology **46**(3): 189-194.

- Faure, D., M. L. Bouillant and R. Bally (1994). "Isolation of *Azospirillum lipoferum* 4T Tn5 Mutants Affected in Melanization and Laccase Activity." Applied and environmental microbiology **60**(9): 3413-3415.
- Fernandes, T. A. R., W. B. da Silveira, F. M. L. Passos and T. D. Zucchi (2014). "Laccases from Actinobacteria—what we have and what to expect." Advances in Microbiology **2014**.
- Ferreira-Dias, S., G. Sandoval, F. Plou and F. Valero (2013). "The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries." Electronic Journal of Biotechnology **16**(3): 12-12.
- Fessner, W. D. and T. Anthonsen (2009). *Modern biocatalysis: stereoselective and environmentally friendly reactions*. John Wiley & Sons.
- Folino, A., A. Karageorgiou, P. S. Calabrò and D. Komilis (2020). "Biodegradation of Wasted Bioplastics in Natural and Industrial Environments: A Review." Sustainability **12**(15): 6030.
- Fukushima, K., C. Abbate, D. Tabuani, M. Gennari, P. Rizzarelli and G. Camino (2010). "Biodegradation trend of poly (ϵ -caprolactone) and nanocomposites." Materials Science and Engineering: C **30**(4): 566-574.
- Fukushima, K., D. Tabuani, C. Abbate, M. Arena and L. Ferreri (2010). "Effect of sepiolite on the biodegradation of poly(lactic acid) and polycaprolactone." Polymer Degradation and Stability **95**: 2049-2056.
- Funabashi, M., F. Ninomiya and M. Kunioka (2009). "Biodegradability Evaluation of Polymers by ISO 14855-2." International Journal of Molecular Sciences **10**(8): 3635-3654.
- Gabdulkhakov, A. G., O. S. Kostareva, I. A. Kolyadenko, A. O. Mikhaylina, L. I. Trubitsina and S. V. Tishchenko (2018). "Incorporation of Copper Ions into T2/T3 Centers of Two-Domain Laccases." Molecular Biology **52**(1): 23-29.
- Galai, S., F. Limam and M. N. Marzouki (2009). "A new *Stenotrophomonas maltophilia* strain producing laccase. Use in decolorization of synthetic dyes." Biotechnology and Applied Biochemistry **158**(2): 416-431.
- Gan, Z., D. Yu, Z. Zhong, Q. Liang and X. Jing (1999). "Enzymatic degradation of poly (ϵ -caprolactone)/poly (DL-lactide) blends in phosphate buffer solution." Polymer **40**(10): 2859-2862.
- Gerritse, G., R. W. J. Hommes and W. J. Quax (1998). "Development of a Lipase Fermentation Process That Uses a Recombinant *Pseudomonas alcaligenes* Strain." Applied and Environmental Microbiology **64**(7): 2644-2651.
- Ghanbarzadeh, B. and H. Almasi (2013). "Biodegradable polymers." Biodegradation-life of science: 141-174.
- Ghasemi, S., M. Heidary, M. A. Faramarzi and Z. Habibi (2014). "Immobilization of lipase on Fe₃O₄/ZnO core/shell magnetic nanoparticles and catalysis of Michael-type addition to chalcone derivatives." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **100**: 121-128.

- Giardina, P., V. Faraco, C. Pezzella, A. Piscitelli, S. Vanhulle and G. Sannia (2010). "Laccases: a never-ending story." Cellular and Molecular Life Sciences **67**(3): 369-385.
- Gilbert, E. J. (1993). "Pseudomonas lipases: biochemical properties and molecular cloning." Enzyme and Microbial Technology **15**(8): 634-645.
- Givaudan, A., A. Effosse, D. Faure, P. Potier, M.-L. Bouillant and R. Bally (1993). "Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: Evidence for laccase activity in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*." FEMS Microbiology Letters **108**(2): 205-210.
- Gómez, E. F. and F. C. Michel (2013). "Biodegradability of conventional and bio-based plastics and natural fiber composites during composting, anaerobic digestion and long-term soil incubation." Polymer Degradation and Stability **98**(12): 2583-2591.
- Göpferich, A. (1996). "Mechanisms of polymer degradation and erosion." Biomaterials **17**(2): 103-114.
- Gouma, S., S. Fragoeiro, A. C. Bastos and N. Magan (2014). 13 - Bacterial and Fungal Bioremediation Strategies. Microbial Biodegradation and Bioremediation. S. Das. Oxford, Elsevier: 301-323.
- Granja-Travez, R. S. and T. D. H. Bugg (2018). "Characterization of multicopper oxidase CopA from *Pseudomonas putida* KT2440 and *Pseudomonas fluorescens* Pf-5: Involvement in bacterial lignin oxidation." Archives of Biochemistry and Biophysics **660**: 97-107.
- Guan, Z. B., Q. Luo, H. R. Wang, Y. Chen and X. R. Liao (2018). "Bacterial laccases: promising biological green tools for industrial applications." Cellular and Molecular Life Sciences **75**(19): 3569-3592.
- Gupta, R., N. Gupta and P. Rathi (2004). "Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties." Applied Microbiology and Biotechnology **64**(6): 763-781.
- Hakkarainen, M. (2002). "Aliphatic polyesters: abiotic and biotic degradation and degradation products." Degradable aliphatic polyesters: 113-138.
- Han, H., Y. Zhou, S. Li, Y. Wang and X. Z. Kong (2016). "Immobilization of Lipase from *Pseudomonas fluorescens* on Porous Polyurea and Its Application in Kinetic Resolution of Racemic 1-Phenylethanol." ACS Applied Materials & Interfaces **8**(39): 25714-25724.
- Hegazy, M.-E. F., T. A. Mohamed, A. I. ElShamy, A.-E.-H. H. Mohamed, U. A. Mahalel, E. H. Reda, A. M. Shaheen, W. A. Tawfik, A. A. Shahat, K. A. Shams, N. S. Abdel-Azim and F. M. Hammouda (2015). "Microbial biotransformation as a tool for drug development based on natural products from mevalonic acid pathway: A review." Journal of advanced research **6**(1): 17-33.
- Hermanová, S., J. Omelková, S. Voběrková, R. Bálková, L. Richtera, L. Mravcová and J. Jančář (2012). "The Effect of Processing of Polycaprolactone Films on Degradation Process Initiated by *Aspergillus Oryzae* Lipase." International Journal of Polymer Analysis and Characterization **17**(6): 465-475.
- Hessel, C., C. Allegre, M. Maisseu, F. Charbit and P. Moulin (2007). "Guidelines and legislation for dye house effluents." Journal of environmental management **83**(2): 171-180.

- Homaei, A. A., R. Sariri, F. Vianello and R. Stevanato (2013). "Enzyme immobilization: an update." Journal of chemical biology **6**(4): 185-205.
- Hong, H.-B., I.-H. Nam, K. Murugesan, Y.-M. Kim and Y.-S. Chang (2004). "Biodegradation of Dibenzo-p-dioxin, Dibenzofuran, and Chlorodibenzo-p-dioxins by *Pseudomonas veronii* PH-03." Biodegradation **15**(5): 303-313.
- Hou, C. T. (1994). "pH dependence and thermostability of lipases from cultures from the ARS culture collection." Journal of Industrial Microbiology **13**(4): 242-248.
- Hu, M. R., Y. P. Chao, G. Q. Zhang, Z. Q. Xue and S. Qian (2009). "Laccase-mediator system in the decolorization of different types of recalcitrant dyes." Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology **36**(1): 45-51.
- Huertas, M.-J., E. Duque, S. Marqués and J. L. Ramos (1998). "Survival in soil of different toluene-degrading *Pseudomonas* strains after solvent shock." Applied and Environmental Microbiology **64**(1): 38-42.
- Huertas, M. J., V. M. Luque-Almagro, M. Martínez-Luque, R. Blasco, C. Moreno-Vivián, F. Castillo and M. D. Roldán (2006). "Cyanide metabolism of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344: role of siderophores." Biochemical Society Transactions **34**(Pt 1): 152-155.
- Hunger, K. (2003). "Dyes, general survey." Industrial Dyes: Chemistry, Properties, Applications, Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, Frankfurt: 1-10.
- Hüsken, L., R. Beeftink, J. de Bont and J. Wery (2001). "High-rate 3-methylcatechol production in *Pseudomonas putida* strains by means of a novel expression system." Applied microbiology and biotechnology **55**(5): 571-577.
- Ihssen, J., R. Reiss, R. Luchsinger, L. Thöny-Meyer and M. Richter (2015). "Biochemical properties and yields of diverse bacterial laccase-like multicopper oxidases expressed in *Escherichia coli*." Scientific Reports **5**: 10465.
- Iizumi, T., K. Nakamura, Y. Shimada, A. Sugihara, Y. Tominaga and T. Fukase (1991). "Cloning, nucleotide sequencing, and expression in *Escherichia coli* of a lipase and its activator genes from *Pseudomonas* sp. KWI-56." Agricultural and Biological Chemistry **55**(9): 2349-2357.
- Inouye, S., A. Nakazawa and T. Nakazawa (1987). "Expression of the regulatory gene *xylS* on the TOL plasmid is positively controlled by the *xylR* gene product." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **84**(15): 5182-5186.
- Iwańczuk, A., M. Kozłowski, M. Łukaszewicz and S. Jabłoński (2015). "Anaerobic Biodegradation of Polymer Composites Filled with Natural Fibers." Journal of Polymers and the Environment **23**(2): 277-282.
- Iwata, T. and Y. Doi (2002). "Morphology and enzymatic degradation of poly(ϵ -caprolactone) single crystals: does a polymer single crystal consist of micro-crystals?" Polymer International **51**(10): 852-858.
- Jaeger, K.-E. (1993). "Bakterielle Lipasen: Biochemie, Molekulargenetik und biotechnologische Bedeuteng." BioEngineering **9**: 39-46.

Jaeger, K.-E. and M. T. Reetz (1998). "Microbial lipases form versatile tools for biotechnology." Trends in biotechnology **16**(9): 396-403.

Jaeger, K.-E. and F. Rosenau (2004). Overexpression and Secretion of Pseudomonas Lipases. Pseudomonas: Volume 3 Biosynthesis of Macromolecules and Molecular Metabolism. J.-L. Ramos. Boston, MA, Springer US: 491-508.

Jaeger, K.-E. and F. Rosenau (2004). Overexpression and secretion of Pseudomonas lipases. Pseudomonas, Springer: 491-508.

Jaeger, K. E., B. W. Dijkstra and M. T. Reetz (1999). "Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases." The Annual Review of Microbiology **53**: 315-351.

Jaeger, K. E. and F. Kovacic (2014). "Determination of lipolytic enzyme activities." Methods in Molecular Biology **1149**: 111-134.

Janes, B., J. Hollar and D. Dennis (1990). Molecular Characterization of the Poly- β -Hydroxybutyrate Biosynthetic Pathway of *Alcaligenes Eutrophus* H16. Novel Biodegradable Microbial Polymers. E. A. Dawes. Dordrecht, Springer Netherlands: 175-190.

Javed, S., F. Azeem, S. Hussain, I. Rasul, M. H. Siddique, M. Riaz, M. Afzal, A. Kouser and H. Nadeem (2018). "Bacterial lipases: A review on purification and characterization." Progress in Biophysics and Molecular Biology **132**: 23-34.

Jendrossek, D. and R. Handrick (2002). "Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates." Annual Review of Microbiology **56**(1): 403-432.

Jeon, J. R., P. Baldrian, K. Murugesan and Y. S. Chang (2012). "Laccase-catalysed oxidations of naturally occurring phenols: from in vivo biosynthetic pathways to green synthetic applications." Microbial biotechnology **5**(3): 318-332.

Jesus, G. J. d., C. R. Corso, A. d. Campos and S. M. M. Franchetti (2010). "Biodegradation of erythrosin B dye by paramorphic *Neurospora crassa* 74A." Brazilian Archives of Biology and Technology **53**(2): 473-480.

Jimenez-Juarez, N., R. Roman-Miranda, A. Baeza, A. Sánchez-Amat, R. Vazquez-Duhalt and B. Valderrama (2005). "Alkali and halide-resistant catalysis by the multipotent oxidase from *Marinomonas mediterranea*." Journal of biotechnology **117**(1): 73-82.

Jiménez, J. I., B. Miñambres, J. L. García and E. Díaz (2002). "Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440." Environmental microbiology **4**(12): 824-841.

Jin, K., L. Zhou, H. Jiang, S. Sun, Y. Fang, J. Liu, X. Zhang and Y.-W. He (2015). "Engineering the central biosynthetic and secondary metabolic pathways of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA1201 to improve phenazine-1-carboxylic acid production." Metabolic engineering **32**: 30-38.

Kahlon, R. S. (2016). "Biodegradation and bioremediation of organic chemical pollutants by *Pseudomonas*." Pseudomonas: Molecular and applied biology: 343-417.

Kandasamy, S. and S. Uthandi (2021). "Laccase producing *Streptomyces bikiniensis* CSC12 isolated from compost." Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences **2021**: 794-798.

Kanmani, P., K. Kumaresan, J. Aravind, S. Karthikeyan and R. Balan (2016). "Enzymatic degradation of polyhydroxyalkanoate using lipase from *Bacillus subtilis*." International Journal of Environmental Science and Technology **13**(6): 1541-1552.

Kapoor, M. and M. N. Gupta (2012). "Lipase promiscuity and its biochemical applications." Process Biochemistry **47**(4): 555-569.

Kasprzyk-Hordern, B. and D. R. Baker (2012). "Enantiomeric profiling of chiral drugs in wastewater and receiving waters." Environmental science & technology **46**(3): 1681-1691.

Khan, I., R. Nagarjuna, J. R. Dutta and R. Ganesan (2019). "Enzyme-Embedded Degradation of Poly(ϵ -caprolactone) using Lipase-Derived from Probiotic *Lactobacillus plantarum*." ACS Omega **4**(2): 2844-2852.

Kiiskinen, L.-L., M. Rättö and K. Kruus (2004). "Screening for novel laccase-producing microbes." Journal of Applied Microbiology **97**(3): 640-646.

Ko, E.-M., Y.-E. Leem and H. Choi (2001). "Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*." Applied microbiology and biotechnology **57**(1): 98-102.

Kodama, Y. (2013). "Degradability: Enzymatic and in Simulated Compost Soil of PLLA: PCL Blend and on Their Composites with Coconut Fiber." Biodegradation of Hazardous and Special Products: 105.

Kolvenbach, B. A., D. E. Helbling, H.-P. E. Kohler and P. F. X. Corvini (2014). "Emerging chemicals and the evolution of biodegradation capacities and pathways in bacteria." Current Opinion in Biotechnology **27**: 8-14.

Kudanga, T., B. Nemadziva and M. Le Roes-Hill (2017). "Laccase catalysis for the synthesis of bioactive compounds." Applied Microbiology and Biotechnology **101**(1): 13-33.

Kuddus, M., B. Joseph and P. Wasudev Ramteke (2013). "Production of laccase from newly isolated *Pseudomonas putida* and its application in bioremediation of synthetic dyes and industrial effluents." Biocatalysis and Agricultural Biotechnology **2**(4): 333-338.

Kues, U. and M. Ruhl (2011). "Multiple multi-copper oxidase gene families in basidiomycetes-what for?" Current Genomics **12**(2): 72-94.

Kumagai, Y., Y. Kaneshawa and Y. Doi (1992). "Enzymatic degradation of microbial poly(3-hydroxybutyrate) films." Die Makromolekulare Chemie **193**(1): 53-57.

Kumar, A., K. Dhar, S. S. Kanwar and P. K. Arora (2016). "Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications." Biological Procedures Online **18**(1): 2.

- Kumari, A. and R. Gupta (2013). "Phenylalanine to leucine point mutation in oxyanion hole improved catalytic efficiency of Lip12 from *Yarrowia lipolytica*." Enzyme and microbial technology **53**(6-7): 386-390.
- Kunamneni, A., F. J. Plou, A. Ballesteros and M. Alcalde (2008). "Laccases and their applications: a patent review." Recent patents on biotechnology **2**(1): 10-24.
- Kurniawati, S. and J. A. Nicell (2007). "Efficacy of mediators for enhancing the laccase-catalyzed oxidation of aqueous phenol." Enzyme and microbial technology **41**(3): 353-361.
- Kyrikou, I. and D. Briassoulis (2007). "Biodegradation of Agricultural Plastic Films: A Critical Review." Journal of Polymers and the Environment **15**(2): 125-150.
- Lacasse, K. and W. Baumann (2003). "Textile chemicals-data and facts for environmental protection." Melliand Textilberichte International Textile Reports **84**(10): 868-872.
- Lakshmi, B., P. Kanguane, B. Abraham and G. Pennathur (1999). "Effect of vegetable oils in the secretion of lipase from *Candida rugosa* (DSM 2031)." Letters in applied microbiology **29**(1): 66-70.
- Lawton, T., G. Kenney, J. Hurley and A. Rosenzweig (2016). "The CopC Family: Structural and Bioinformatic Insights into a Diverse Group of Periplasmic Copper Binding Proteins." Biochemistry **55**.
- Le, Q. A., J. C. Joo, Y. J. Yoo and Y. H. Kim (2012). "Development of thermostable *Candida antarctica* lipase B through novel in silico design of disulfide bridge." Biotechnology and Bioengineering **109**(4): 867-876.
- Lee, S. Y. (1996). "Bacterial polyhydroxyalkanoates." Biotechnology and Bioengineering **49**(1): 1-14.
- Lee, S. Y. and J.-i. Choi (1999). "Production and degradation of polyhydroxyalkanoates in waste environment." Waste Management **19**(2): 133-139.
- Legerská, B., D. Chmelová and M. Ondrejovič (2016). "Degradation of synthetic dyes by laccases—a mini-review." Nova Biotechnologica et Chimica **15**(1): 90-106.
- Leja, K. and G. Lewandowicz (2010). "Polymer Biodegradation and Biodegradable Polymers – a Review." Polish Journal of Environmental Studies **19**(2): 255-266.
- Li, W., W. Du, Y.-h. Li, D.-h. Liu and Z.-b. Zhao (2007). "Enzymatic transesterification of yeast oil for biodiesel fuel production." Chinese Journal of Process Engineering **7**(1): 133.
- Li, Z., J. Yang and X. J. Loh (2016). "Polyhydroxyalkanoates: opening doors for a sustainable future." NPG Asia Materials **8**(4): e265-e265.
- Lim, S. P., S. N. Gan and I. K. Tan (2005). "Degradation of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in tropical forest and mangrove soils." Biotechnology and Applied Biochemistry **126**(1): 23-33.
- Liu, C.-H., Y.-H. Lin, C.-Y. Chen and J.-S. Chang (2009). "Characterization of *Burkholderia* lipase immobilized on celite carriers." Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers **40**(4): 359-363.

- Liu, L., S. Li, H. Garreau and M. Vert (2000). "Selective enzymatic degradations of poly (L-lactide) and poly (ϵ -caprolactone) blend films." Biomacromolecules **1**(3): 350-359.
- Liu, W., M. Li and Y. Yan (2017). "Heterologous expression and characterization of a new lipase from *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 and used for biodiesel production." Scientific Reports **7**(1): 15711.
- Liu, Y., L. Huang, W. Guo, L. Jia, Y. Fu, S. Gui and F. Lu (2017). "Cloning, expression, and characterization of a thermostable and pH-stable laccase from *Klebsiella pneumoniae* and its application to dye decolorization." Process Biochemistry **53**: 125-134.
- Loeschcke, A. and S. Thies (2015). "Pseudomonas putida—a versatile host for the production of natural products." Applied Microbiology and Biotechnology **99**(15): 6197-6214.
- Loh, K.-C. and B. Cao (2008). "Paradigm in biodegradation using *Pseudomonas putida*—a review of proteomics studies." Enzyme and Microbial Technology **43**(1): 1-12.
- Lončar, N., N. Božić and Z. Vujčić (2016). "Expression and characterization of a thermostable organic solvent-tolerant laccase from *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **134**: 390-395.
- López-López, O., M. E Cerdan and M. I Gonzalez Siso (2014). "New extremophilic lipases and esterases from metagenomics." Current Protein and Peptide Science **15**(5): 445-455.
- Lovera, D., L. Márquez, V. Balsamo, A. Taddei, C. Castelli and A. J. Müller (2007). "Crystallization, Morphology, and Enzymatic Degradation of Polyhydroxybutyrate/Polycaprolactone (PHB/PCL) Blends." Macromolecular Chemistry and Physics **208**(9): 924-937.
- Lu, J., A. Takahashi and S. Ueda (2014). "3-Hydroxybutyrate oligomer hydrolase and 3-hydroxybutyrate dehydrogenase participate in intracellular polyhydroxybutyrate and polyhydroxyvalerate degradation in *Paracoccus denitrificans*." Applied and environmental microbiology **80**(3): 986-993.
- Lucas, N., C. Bienaime, C. Belloy, M. Queneudec, F. Silvestre and J.-E. Nava-Saucedo (2008). "Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques – A review." Chemosphere **73**(4): 429-442.
- Lysenko, O. (1961). "Pseudomonas - an attempt at a general classification." The Journal of General Microbiology **25**: 379-408.
- Mabrouk, M. M. and S. A. Sabry (2001). "Degradation of poly (3-hydroxybutyrate) and its copolymer poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by a marine *Streptomyces* sp. SNG9." Microbiological Research **156**(4): 323-335.
- Macrae, A. and R. Hammond (1985). "Present and future applications of lipases." Biotechnology and Genetic Engineering Reviews **3**(1): 193-218.
- Madhavi, V. and S. Lele (2009). "Laccase: properties and applications." BioResources **4**(4): 1694-1717.

- Madison, L. L. and G. W. Huisman (1999). "Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic." Microbiology and Molecular Biology Reviews **63**(1): 21-53.
- Maestre-Reyna, M., W.-C. Liu, W.-Y. Jeng, C.-C. Lee, C.-A. Hsu, T.-N. Wen, A. H.-J. Wang and L.-F. Shyur (2015). "Structural and functional roles of glycosylation in fungal laccase from *Lentinus* sp." PloS one **10**(4): e0120601.
- Majeau, J. A., S. K. Brar and R. D. Tyagi (2010). "Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants." Bioresource Technology **101**(7): 2331-2350.
- Mala, J. G. S. and S. Takeuchi (2008). "Understanding Structural Features of Microbial Lipases–An Overview." Analytical Chemistry Insights **3**: ACI. S551.
- Margot, J., C. Bennati-Granier, J. Maillard, P. Blázquez, D. A. Barry and C. Holliger (2013). "Bacterial versus fungal laccase: potential for micropollutant degradation." AMB Express **3**(1): 63.
- Martins, L. O., C. M. Soares, M. M. Pereira, M. Teixeira, T. Costa, G. H. Jones and A. O. Henriques (2002). "Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat." Journal of Biological Chemistry **277**(21): 18849-18859.
- Mataulj, M., and Molitoris H.P., (2000). "Biodegradation of polyhydroxyalkanoate-based plastic (BIOPOL) under different environmental conditions I. Weightloss of substrate." Hoppea (61):735-749.
- Mathews, S., C. Smithson and A. Grunden (2016). "Purification and characterization of a recombinant laccase-like multi-copper oxidase from *Paenibacillus glucanolyticus* SLM 1." Journal of applied microbiology **121**(5): 1335-1345.
- Matsumoto, K. i. and S. Taguchi (2013). "Enzyme and metabolic engineering for the production of novel biopolymers: crossover of biological and chemical processes." Current opinion in biotechnology **24**(6): 1054-1060.
- Mayer, A. M. and R. C. Staples (2002). "Laccase: new functions for an old enzyme." Phytochemistry **60**(6): 551-565.
- McMahon, A. M., E. M. Doyle, S. Brooks and K. E. O'Connor (2007). "Biochemical characterisation of the coexisting tyrosinase and laccase in the soil bacterium *Pseudomonas putida* F6." Enzyme and Microbial Technology **40**(5): 1435-1441.
- Meereboer, K. W., M. Misra and A. K. Mohanty (2020). "Review of recent advances in the biodegradability of polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastics and their composites." Green Chemistry **22**(17): 5519-5558.
- Melani, N. B., E. B. Tambourgi and E. Silveira (2020). "Lipases: From Production to Applications." Separation & Purification Reviews **49**(2): 143-158.
- Melim Miguel, A. S., T. Martins-Meyer, E. V. da Costa Figueiredo, B. Paulo Lobo and G. Dellamora-Ortiz (2013). "Enzymes in Bakery." Current and Future Trends(1): 287-321.

Menaka, S., T. A. Lone and R. A. Lone (2015). "Cloning of laccase gene from a newly isolated 2, 4-dichlorophenol degrading *Bacillus subtilis* from dyeing industry sites." *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science* **1**: 1602-1608.

Messerschmidt, A. and R. Huber (1990). "The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. Modelling and structural relationships." *The FEBS Journal* **187**(2): 341-352.

Minovska, V., E. Winkelhausen and S. Kuzmanova (2005). "Lipase immobilized by different techniques on various support materials applied in oil hydrolysis." *Journal of the Serbian Chemical Society* **70**(4): 609-624.

Mishra, G. and M. Tripathy (1993). "A critical review of the treatments for decolourization of textile effluent." *Colourage* **40**: 35-35.

Mishra, V. K. and H. Sharma (2014). *Decolourization of textile azo dyes by Bacillus spp.* In Proceedings of the International Conference on Emerging Trends in Traditional and Technical Textiles, Jalandhar, India.

Mochizuki, M. and M. Hiram (1997). "Structural Effects on the Biodegradation of Aliphatic Polyesters." *Polymers for Advanced Technologies* **8**(4): 203-209.

Mochizuki, M., M. Hirano, Y. Kanmuri, K. Kudo and Y. Tokiwa (1995). "Hydrolysis of polycaprolactone fibers by lipase: Effects of draw ratio on enzymatic degradation." *Journal of Applied Polymer Science* **55**(2): 289-296.

Mohanan, N., Z. Montazer, P. K. Sharma and D. B. Levin (2020). "Microbial and Enzymatic Degradation of Synthetic Plastics." *Frontiers in microbiology* **11**: 580709-580709.

Mok, P.-S., D. H.-E. Chang, S.-P. Ong, K. Numata and K. Sudesh (2016). "Characterization of the depolymerizing activity of commercial lipases and detection of lipase-like activities in animal organ extracts using poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) thin film." *AMB Express* **6**(1): 1-14.

Mondrinos, M. J., R. Dembzyński, L. Lu, V. K. Byrapogu, D. M. Wootton, P. I. Lelkes and J. Zhou (2006). "Porogen-based solid freeform fabrication of polycaprolactone-calcium phosphate scaffolds for tissue engineering." *Biomaterials* **27**(25): 4399-4408.

Mongkolthanaruk, W., S. Tongbopit and A. Bhoonobtong (2012). "Independent behavior of bacterial laccases to inducers and metal ions during production and activity." *African Journal of biotechnology* **11**(39): 9391-9398.

Morozova, O. V., G. P. Shumakovich, M. A. Gorbacheva, S. V. Shleev and A. I. Yaropolov (2007). ""Blue" laccases." *Biochemistry (Mosc)* **72**(10): 1136-1150.

Muhammadi, Shabina, M. Afzal and S. Hameed (2015). "Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications." *Green Chemistry Letters and Reviews* **8**(3-4): 56-77.

Muniasamy, S., O. Ofosu, M. J. John and R. D. Anandjiwala (2016). "Mineralization of poly (lactic acid)(PLA), poly (3-hydroxybutyrate-co-valerate)(PHBV) and PLA/PHBV blend in compost and soil environments." *Journal of Renewable Materials* **4**(2): 133-145.

- Murphy, C. A., J. A. Cameron, S. J. Huang and R. T. Vinopal (1996). "Fusarium polycaprolactone depolymerase is cutinase." Applied and Environ Microbiology **62**(2): 456-460.
- Murphy, M. E. P., P. F. Lindley and E. T. Adman (1997). "Structural comparison of cupredoxin domains: Domain recycling to construct proteins with novel functions." Protein Science **6**(4): 761-770.
- Muthukumarasamy, N. P., B. Jackson, A. Joseph Raj and M. Sevanan (2015). "Production of Extracellular Laccase from Bacillus subtilis MTCC 2414 Using Agroresidues as a Potential Substrate." Biochemistry Researc International **2015**: 765190.
- Nagarajan, S. (2012). "New tools for exploring "old friends—microbial lipases"." Applied biochemistry and biotechnology **168**(5): 1163-1196.
- Nair, L. S. and C. T. Laurencin (2007). "Biodegradable polymers as biomaterials." Progress in Polymer Science **32**(8): 762-798.
- Nam, I.-H., Y.-S. Chang, H.-B. Hong and Y.-E. Lee (2003). "A novel catabolic activity of Pseudomonas veronii in biotransformation of pentachlorophenol." Applied Microbiology and Biotechnology **62**(2): 284-290.
- Narancic, T., S. Verstichel, S. Reddy Chaganti, L. Morales-Gamez, S. T. Kenny, B. De Wilde, R. Babu Padamati and K. E. O'Connor (2018). "Biodegradable Plastic Blends Create New Possibilities for End-of-Life Management of Plastics but They Are Not a Panacea for Plastic Pollution." Enviromental Science and Technology **52**(18): 10441-10452.
- Narayanan, M., S. Murugan, A. Eva, S. Devina and S. Kalidass (2015). "Application of immobilized laccase from Bacillus subtilis MTCC 2414 on decolourization of synthetic dyes." Research Journal of Microbiology **10**: 421-432.
- Narayanan, N., M. Khan and C. P. Chou (2010). "Enhancing functional expression of heterologous lipase B in Escherichia coli by extracellular secretion." Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology **37**(4): 349-361.
- Niladevi, K. and P. Prema (2008). "Immobilization of laccase from Streptomyces psammoticus and its application in phenol removal using packed bed reactor." World Journal of Microbiology and Biotechnology **24**(7): 1215-1222.
- Niladevi, K. N., P. S. Sheejadevi and P. Prema (2008). "Strategies for enhancing laccase yield from Streptomyces psammoticus and its role in mediator-based decolorization of azo dyes." Applied Biochemistry and Biotechnology **151**(1): 9-19.
- Nishida, T. (1988). "Lignin biodegradation by wood-rotting fungi. I. Screening of lignindegrading fungi." Mokuzai gakkaiishi **34**: 530-536.
- Noda, I., P. R. Green, M. M. Satkowski and L. A. Schechtman (2005). "Preparation and properties of a novel class of polyhydroxyalkanoate copolymers." Biomacromolecules **6**(2): 580-586.
- Novik, G., V. Savich and E. Kiseleva (2015). An Insight Into Beneficial Pseudomonas bacteria. Microbiology in Agriculture and Human Health, IntechOpen: 73-105.

- O'Connor, K., C. M. Buckley, S. Hartmans and A. D. Dobson (1995). "Possible regulatory role for nonaromatic carbon sources in styrene degradation by *Pseudomonas putida* CA-3." Applied and Environmental Microbiology **61**(2): 544-548.
- Olusesan, A. T., L. K. Azura, F. Abubakar, N. S. A. Hamid, S. Radu and N. Saari (2009). "Phenotypic and molecular identification of a novel thermophilic *Anoxybacillus* species: a lipase-producing bacterium isolated from a Malaysian hot spring." World Journal of Microbiology and Biotechnology **25**(11): 1981-1988.
- Onwosi, C. O., V. C. Igbokwe, J. N. Odimba, I. E. Eke, M. O. Nwankwoala, I. N. Iroh and L. I. Ezeogu (2017). "Composting technology in waste stabilization: On the methods, challenges and future prospects." Journal of environmental management **190**: 140-157.
- Oshima-Hirayama, N., K. Yoshikawa, T. Nishioka and J. Oda (1993). "Lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. Production in *Escherichia coli* and activation in vitro with a protein from the downstream gene." The FEBS journal **215**(2): 239-246.
- Pace, C. N., F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley and T. Gray (1995). "How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein." Protein Science **4**(11): 2411-2423.
- Park, J. B., B. Bühler, S. Panke, B. Witholt and A. Schmid (2007). "Carbon metabolism and product inhibition determine the epoxidation efficiency of solvent-tolerant *Pseudomonas* sp. strain VLB120ΔC." Biotechnology and bioengineering **98**(6): 1219-1229.
- Park, J. W., I. S. Shin, U. H. Ha, S. R. Oh, J. H. Kim and K. S. Ahn (2015). "Pathophysiological changes induced by *Pseudomonas aeruginosa* infection are involved in MMP-12 and MMP-13 upregulation in human carcinoma epithelial cells and a pneumonia mouse model." Infection and Immunity **83**(12): 4791-4799.
- Pastorino, L., F. Pioli, M. Zilli, A. Converti and C. Nicolini (2004). "Lipase-catalyzed degradation of poly (ϵ -caprolactone)." Enzyme and microbial technology **35**(4): 321-326.
- Peng, H., P. Zhang, M. Bilal, W. Wang, H. Hu and X. Zhang (2018). "Enhanced biosynthesis of phenazine-1-carboxamide by engineered *Pseudomonas chlororaphis* HT66." Microbial cell factories **17**(1): 1-12.
- Peng, Q., X. Wang, M. Shang, J. Huang, G. Guan, Y. Li and B. Shi (2014). "Isolation of a novel alkaline-stable lipase from a metagenomic library and its specific application for milkfat flavor production." Microbial cell factories **13**(1): 1-9.
- Pereira, L., A. V. Coelho, C. A. Viegas, M. M. C. d. Santos, M. P. Robalo and L. O. Martins (2009). "Enzymatic biotransformation of the azo dye Sudan Orange G with bacterial CotA-laccase." Journal of Biotechnology **139**(1): 68-77.
- Peter, J. and P. Vandana (2014). "Congo red dye decolorization by partially purified laccases from *Pseudomonas aeruginosa*." International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences **3**: 105-115.
- Philip, S., T. Keshavarz and I. Roy (2007). "Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications." Journal of chemical technology & biotechnology: International research in process, Environmental & clean technology **82**(3): 233-247.

- Piscitelli, A., C. Pezzella, P. Giardina, V. Faraco and S. Giovanni (2010). "Heterologous laccase production and its role in industrial applications." Bioengineered bugs **1**: 252-262.
- Pleiss, J., M. Fischer, M. Peiker, C. Thiele and R. D. Schmid (2000). "Lipase engineering database: understanding and exploiting sequence–structure–function relationships." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **10**(5): 491-508.
- Pleiss, J., M. Fischer and R. D. Schmid (1998). "Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site." Chemistry and Physics of Lipids **93**(1-2): 67-80.
- Pogni, R., M. C. Baratto, A. Sinicropi and R. Basosi (2015). "Spectroscopic and computational characterization of laccases and their substrate radical intermediates." Cellular and molecular life sciences **72**(5): 885-896.
- Pollegioni, L., F. Tonin and E. Rosini (2015). "Lignin-degrading enzymes." The FEBS journal **282**(7): 1190-1213.
- Ponjavic, M., M. S. Nikolic, S. Jeremic, L. Djokic, J. Nikodinovic-Runic, V. R. Cosovic and J. Djonlagic (2018). "Influence of Short Central PEO Segment on Hydrolytic and Enzymatic Degradation of Triblock PCL Copolymers." Journal of Polymers and the Environment **26**(6): 2346-2359.
- Ponjavic, M., M. S. Nikolic, J. Nikodinovic-Runic, S. Jeremic, S. Stevanovic and J. Djonlagic (2017). "Degradation behaviour of PCL/PEO/PCL and PCL/PEO block copolymers under controlled hydrolytic, enzymatic and composting conditions." Polymer Testing **57**: 67-77.
- Poritsanos, N., C. Selin, W. G. Fernando, S. Nakkeeran and T. R. de Kievit (2006). "A GacS deficiency does not affect Pseudomonas chlororaphis PA23 fitness when growing on canola, in aged batch culture or as a biofilm." Canadian Journal of Microbiology **52**(12): 1177-1188.
- Prata, J. C., J. P. da Costa, I. Lopes, A. C. Duarte and T. Rocha-Santos (2020). "Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects." Science of The Total Environment **702**: 134455.
- Prieto, A. (2016). "To be, or not to be biodegradable... that is the question for the bio-based plastics." Microbial Biotechnology **9**(5): 652-657.
- Prins, A., L. Kleinsmidt, N. Khan, B. Kirby, T. Kudanga, J. Vollmer, J. Pleiss, S. Burton and M. Le Roes-Hill (2015). "The effect of mutations near the T1 copper site on the biochemical characteristics of the small laccase from Streptomyces coelicolor A3 (2)." Enzyme and microbial technology **68**: 23-32.
- Raghavan, P. and M. Vivekanandan (1999). "Bioremediation of oil-spilled sites through seeding of naturally adapted Pseudomonas putida." International biodeterioration & biodegradation **44**(1): 29-32.
- Rahman, A., A. Sarkar, O. P. Yadav, G. Achari and J. Slobodnik (2021). "Potential human health risks due to environmental exposure to nano- and microplastics and knowledge gaps: A scoping review." Science of The Total Environment **757**: 143872.

- Rai, H. S., M. S. Bhattacharyya, J. Singh, T. Bansal, P. Vats and U. Banerjee (2005). "Removal of dyes from the effluent of textile and dyestuff manufacturing industry: a review of emerging techniques with reference to biological treatment." Critical reviews in environmental science and technology **35**(3): 219-238.
- Rajeswari, M. and V. Bhuvaneshwari (2016). "Production of extracellular laccase from the newly isolated *Bacillus* sp. PK4." African Journal of Biotechnology **15**(34): 1813-1826.
- Ramani, K., E. Chockalingam and G. Sekaran (2010). "Production of a novel extracellular acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using slaughterhouse waste as a substrate." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **37**(5): 531-535.
- Ramos, J.-L., S. Marqués, P. van Dillewijn, M. Espinosa-Urgel, A. Segura, E. Duque, T. Krell, M.-I. Ramos-González, S. Bursakov, A. Roca, J. Solano, M. Fernández, J. L. Niqui, P. Pizarro-Tobias and R.-M. Wittich (2011). "Laboratory research aimed at closing the gaps in microbial bioremediation." Trends in Biotechnology **29**(12): 641-647.
- Rashid, N., Y. Shimada, S. Ezaki, H. Atomi and T. Imanaka (2001). "Low-temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp. strain KB700A." Applied and environmental microbiology **67**(9): 4064-4069.
- Rasmey, A.-H. M., A. A. Aboseidah, S. Gaber and F. Mahran (2017). "Characterization and optimization of lipase activity produced by *Pseudomonas monteilli* 2403-KY120354 isolated from ground beef." African Journal of Biotechnology **16**(2): 96-105.
- Rathi, P., S. Bradoo, R. Saxena and R. Gupta (2000). "A hyper-thermostable, alkaline lipase from *Pseudomonas* sp. with the property of thermal activation." Biotechnology Letters **22**(6): 495-498.
- Reetz, M. T. (2013). "Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: past, present, and future." Journal of the American Chemical Society **135**(34): 12480-12496.
- Reetz, M. T. and K.-E. Jaeger (1998). "Overexpression, immobilization and biotechnological application of *Pseudomonas* lipases." Chemistry and Physics of Lipids **93**(1): 3-14.
- Rehm, B. H. (2008). "Biotechnological relevance of *Pseudomonads*." Pseudomonas: model organism, pathogen, cell factory: 377-395.
- Reiss, R., J. Ihssen, M. Richter, E. Eichhorn, B. Schilling and L. Thöny-Meyer (2013). "Laccase versus laccase-like multi-copper oxidase: a comparative study of similar enzymes with diverse substrate spectra." PloS one **8**(6): e65633.
- Rengachari, S., P. Aschauer, M. Schittmayer, N. Mayer, K. Gruber, R. Breinbauer, R. Birner-Gruenberger, I. Dreveny and M. Oberer (2013). "Conformational plasticity and ligand binding of bacterial monoacylglycerol lipase." Journal of Biological Chemistry **288**(43): 31093-31104.
- Riva, S. (2006). "Laccases: blue enzymes for green chemistry." Trends in Biotechnology **24**(5): 219-226.
- Rivera-Hoyos, C. M., E. D. Morales-Álvarez, R. A. Poutou-Pinales, A. M. Pedroza-Rodríguez, R. Rodríguez-Vazquez and J. M. Delgado-Boada (2013). "Fungal laccases." Fungal Biology Reviews **27**(3-4): 67-82.

Roberts, S. A., A. Weichsel, G. Grass, K. Thakali, J. T. Hazzard, G. Tollin, C. Rensing and W. R. Montfort (2002). "Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(5): 2766-2771.

Rodríguez-Contreras, A., M. Calafell-Monfort and M. S. Marqués-Calvo (2012). "Enzymatic degradation of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by commercial lipases." Polymer degradation and stability **97**(4): 597-604.

Rodríguez-Couto, S. (2019). Fungal laccase: a versatile enzyme for biotechnological applications. Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi, Springer: 429-457.

Rosa, D. S., R. P. Filho, Q. S. H. Chui, M. R. Calil and C. G. F. Guedes (2003). "The biodegradation of poly- β -(hydroxybutyrate), poly- β -(hydroxybutyrate-co- β -valerate) and poly(ϵ -caprolactone) in compost derived from municipal solid waste." European Polymer Journal **39**(2): 233-237.

Royter, M., M. Schmidt, C. Elend, H. Höbenreich, T. Schäfer, U. T. Bornscheuer and G. Antranikian (2009). "Thermostable lipases from the extreme thermophilic anaerobic bacteria *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* SOL1 and *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *tengcongensis*." Extremophiles : life under extreme conditions **13**(5): 769-783.

Ruijsenaars, H. J. and S. Hartmans (2004). "A cloned *Bacillus halodurans* multicopper oxidase exhibiting alkaline laccase activity." Applied Microbiology and Biotechnology **65**(2): 177-182.

Ruiz, C., S. T. Kenny, T. Narancic, R. Babu and K. O. Connor (2019). "Conversion of waste cooking oil into medium chain polyhydroxyalkanoates in a high cell density fermentation." Journal of Biotechnology **306**: 9-15.

Salihu, A. and M. Z. Alam (2015). "Solvent tolerant lipases: a review." Process Biochemistry **50**(1): 86-96.

Salis, A., M. S. Bhattacharyya, M. Monduzzi and V. Solinas (2009). "Role of the support surface on the loading and the activity of *Pseudomonas fluorescens* lipase used for biodiesel synthesis." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **57**(1-4): 262-269.

Samantaray, S. and N. Mallick (2012). "Production and characterization of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) polymer from *Aulosira fertilissima*." Journal of Applied Phycology **24**(4): 803-814.

Sánchez-Safont, E. L., A. Aldureid, J. M. Lagarón, L. Cabedo and J. Gámez-Pérez (2020). "Study of the Compatibilization Effect of Different Reactive Agents in PHB/Natural Fiber-Based Composites." Polymers **12**(9): 1967.

Sangeetha, R., I. Arulpanandi and A. Geetha (2011). "Bacterial lipases as potential industrial biocatalysts: an overview." Research journal of microbiology **6**(1): 1.

Savin, I.-I. and R. Butnaru (2008). "Wastewater characteristics in textile finishing mills." Environmental Engineering & Management Journal (EEMJ) **7**(6).

- Seemann, T. (2014). "Prokka: rapid prokaryotic genome annotation". Bioinformatics, **30**(14), 2068-2069.
- Seggiani, M., P. Cinelli, S. Verstichel, M. Puccini, S. Vitolo, I. Anguillesi and A. Lazzeri (2015). "Development of fibres-reinforced biodegradable composites.", 1813-1818.
- Sekosan, G. and N. Vasanthan (2010). "Morphological changes of annealed poly- ϵ -caprolactone by enzymatic degradation with lipase." Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics **48**(2): 202-211.
- Selin, C., R. Habibian, N. Poritsanos, S. N. Athukorala, D. Fernando and T. R. de Kievit (2010). "Phenazines are not essential for Pseudomonas chlororaphis PA23 biocontrol of Sclerotinia sclerotiorum, but do play a role in biofilm formation." FEMS Microbiology Ecology **71**(1): 73-83.
- Sharma, P., R. Goel and N. Capalash (2007). "Bacterial laccases." World Journal of Microbiology and Biotechnology **23**(6): 823-832.
- Sharma, P. K., N. Mohanan, R. Sidhu and D. B. Levin (2019). "Colonization and degradation of polyhydroxyalkanoates by lipase-producing bacteria." Canadian Journal of Microbiology **65**(6): 461-475.
- Sharma, S. and S. S. Kanwar (2014). "Organic solvent tolerant lipases and applications." The Scientific World Journal **2014**.
- Sherif, M., D. Waung, B. Korbeci, V. Mavisakalyan, R. Flick, G. Brown, M. Abou-Zaid, A. F. Yakunin and E. R. Master (2013). "Biochemical studies of the multicopper oxidase (small laccase) from Streptomyces coelicolor using bioactive phytochemicals and site-directed mutagenesis." Microbial Biotechnology **6**(5): 588-597.
- Shi, K., J. Jing, L. Song, T. Su and Z. Wang (2020). "Enzymatic hydrolysis of polyester: Degradation of poly(ϵ -caprolactone) by Candida antarctica lipase and Fusarium solani cutinase." International Journal of Biological Macromolecules **144**: 183-189.
- Shim, H. and S. T. Yang (1999). "Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene by a coculture of Pseudomonas putida and Pseudomonas fluorescens immobilized in a fibrous-bed bioreactor." Journal of Biotechnology **67**(2-3): 99-112.
- Si, J. (1995). "Use of laccase in baking." Trends in Food Science & Technology **11**(6): 379.
- Singh, B. and N. Sharma (2008). "Mechanistic implications of plastic degradation." Polymer Degradation and Stability **93**(3): 561-584.
- Singh, D., S. Rawat, M. Waseem, S. Gupta, A. Lynn, M. Nitin, N. Ramchiary and K. K. Sharma (2016). "Molecular modeling and simulation studies of recombinant laccase from Yersinia enterocolitica suggests significant role in the biotransformation of non-steroidal anti-inflammatory drugs." Biochemical and Biophysical Research Communications **469**(2): 306-312.
- Singh, G., A. Bhalla, P. Kaur, N. Capalash and P. Sharma (2011). "Laccase from prokaryotes: a new source for an old enzyme." Reviews in Environmental Science and Bio/Technology **10**(4): 309-326.

- Singh, M., R. S. Singh and U. C. Banerjee (2010). "Enantioselective transesterification of racemic phenyl ethanol and its derivatives in organic solvent and ionic liquid using *Pseudomonas aeruginosa* lipase." Process biochemistry **45**(1): 25-29.
- Siroosi, M., M. A. Amoozegar, K. Khajeh and B. Dabirmanesh (2018). "Decolorization of dyes by a novel sodium azide-resistant spore laccase from a halotolerant bacterium, *Bacillus safensis* sp. strain S31." Water Science and Technology **77**(11-12): 2867-2875.
- Sivan, A. (2011). "New perspectives in plastic biodegradation." Current Opinion in Biotechnology **22**(3): 422-426.
- Sokolovská, I., C. Albasi, J.-P. Riba and V. Báleš (1998). "Production of extracellular lipase by *Candida cylindracea* CBS 6330." Bioprocess Engineering **19**(3): 179-186.
- Sondhi, S., P. Sharma, N. George, P. S. Chauhan, N. Puri and N. Gupta (2015). "An extracellular thermo-alkali-stable laccase from *Bacillus tequilensis* SN4, with a potential to biobleach softwood pulp." 3 Biotech **5**(2): 175-185.
- Sondhi, S., P. Sharma, S. Saini, N. Puri and N. Gupta (2014). "Purification and characterization of an extracellular, thermo-alkali-stable, metal tolerant laccase from *Bacillus tequilensis* SN4." PloS one **9**(5): e96951.
- Songulashvili, G., G. A. Jimenéz-Tobón, C. Jaspers and M. J. Penninckx (2012). "Immobilized laccase of *Cerrena unicolor* for elimination of endocrine disruptor micropollutants." Fungal biology **116**(8): 883-889.
- Spasić, J., M. Mandić, L. Djokić and J. Nikodinović-Runić (2018). "Streptomyces spp. in the biocatalysis toolbox." Applied Microbiology and Biotechnology **102**(8): 3513-3536.
- Spearman, S. S., F. Irin, S. Ramesh, I. V. Rivero, M. J. Green and O. L. Harrysson (2019). "Effect of pseudomonas lipase enzyme on the degradation of polycaprolactone/polycaprolactone-polyglycolide fiber blended nanocomposites." International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials **68**(7): 360-367.
- Steinbüchel, A. (1991). "Recent advances in the knowledge of the metabolism of bacterial polyhydroxyalkanoic acids and potential impacts on the production of biodegradable thermoplastics." Acta Biotechnologica **11**(5): 419-427.
- Steinbüchel, A., E. Hustede, M. Liebergesell, U. Pieper, A. Timm and H. Valentin (1992). "Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria." FEMS microbiology reviews **9**(2-4): 217-230.
- Steinbüchel, A. and T. Lütke-Eversloh (2003). "Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms." Biochemical Engineering Journal **16**(2): 81-96.
- Stoffels, M., R. Amann, W. Ludwig, D. Hekmat and K. H. Schleifer (1998). "Bacterial community dynamics during start-up of a trickle-bed bioreactor degrading aromatic compounds." Applied and environmental microbiology **64**(3): 930-939.
- Strong, P. and H. Claus (2011). "Laccase: a review of its past and its future in bioremediation." Critical Reviews in Environmental Science and Technology **41**(4): 373-434.

- Strong, P. J. and H. Claus (2011). "Laccase: A Review of Its Past and Its Future in Bioremediation." Critical Reviews in Environmental Science and Technology **41**(4): 373-434.
- Sumner, C., S. Krause, A. Sabot, K. Turner and C. J. McNeil (2001). "Biosensor based on enzyme-catalysed degradation of thin polymer films." Biosensors and bioelectronics **16**(9-12): 709-714.
- Sundaram, U. M., H. H. Zhang, B. Hedman, K. O. Hodgson and E. I. Solomon (1997). "Spectroscopic Investigation of Peroxide Binding to the Trinuclear Copper Cluster Site in Laccase: Correlation with the Peroxy-Level Intermediate and Relevance to Catalysis." Journal of the American Chemical Society **119**(51): 12525-12540.
- Suriyamongkol, P., R. Weselake, S. Narine, M. Moloney and S. Shah (2007). "Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants—a review." Biotechnology advances **25**(2): 148-175.
- Suzuki, M., Y. Tachibana and K.-i. Kasuya (2020). "Biodegradability of poly (3-hydroxyalkanoate) and poly (ϵ -caprolactone) via biological carbon cycles in marine environments." Polymer Journal: 1-20.
- Tao, F., Y. Shen, Z. Fan, H. Tang and P. Xu (2012). "Genome sequence of *Pseudomonas putida* S12, a potential platform strain for industrial production of valuable chemicals." Journal of bacteriology **194**(21): 5985-5986.
- Tarazona, N. A., R. Machatschek and A. Lendlein (2020). "Influence of Depolymerases and Lipases on the Degradation of Polyhydroxyalkanoates Determined in Langmuir Degradation Studies." Advanced Materials Interfaces **7**(17): 2000872.
- Tavares, A. P. M., R. O. Cristóvão, J. M. Loureiro, R. A. R. Boaventura and E. A. Macedo (2008). "Optimisation of reactive textile dyes degradation by laccase–mediator system." Journal of Chemical Technology & Biotechnology **83**(12): 1609-1615.
- Timmis, K. N. and D. H. Pieper (1999). "Bacteria designed for bioremediation." Trends in Biotechnology **17**(5): 200-204.
- Tiso, T., N. Wierckx and L. M. Blank (2014). "Non-pathogenic pseudomonas as platform hosts for industrial biocatalysis." Edited by Peter Grunwald. Aachen, Germany: Industrial Biocatalysis, Aachen University.
- Tokiwa, Y., B. P. Calabia, C. U. Ugwu and S. Aiba (2009). "Biodegradability of Plastics." International Journal of Molecular Sciences **10**(9): 3722-3742.
- Tony, B. D., D. Goyal and S. Khanna (2009). "Decolorization of textile azo dyes by aerobic bacterial consortium." International Biodeterioration & Biodegradation **63**(4): 462-469.
- Trubitsina, L., S. Tishchenko, A. Gabdulkhakov, A. Lisov, M. Zakharova and A. Leontievsky (2015). "Structural and functional characterization of two-domain laccase from *Streptomyces viridochromogenes*." Biochimie **112**: 151-159.
- Udiković-Kolić, N., C. Scott and F. Martin-Laurent (2012). "Evolution of atrazine-degrading capabilities in the environment." Applied microbiology and biotechnology **96**(5): 1175-1189.

- Uscátegui, Y., C. Jiménez-Junca, C. Suárez and E. Prieto-Correa (2012). "Evaluation of the induction of lipolytic enzymes from a *Pseudomonas aeruginosa* isolated from african palm fruit (*Elaeis guineensis*)." Vitae **19**: 280-286.
- Van der Walle, G. v., G. De Koning, R. Weusthuis and G. Eggink (2001). "Properties, modifications and applications of biopolyesters." Biopolyesters: 263-291.
- Vandevivere, P. C., R. Bianchi and W. Verstraete (1998). "Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: Review of emerging technologies." Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental AND Clean Technology **72**(4): 289-302.
- Vázquez, M. and M. Soto (2017). "The efficiency of home composting programmes and compost quality." Waste Management **64**: 39-50.
- Verma, A. P., K. Dhiman and P. Shirkot (2016). "Hyper-Production of Laccase By *Pseudomonas putida* LUA15.1 through Mutagenesis." Journal of microbiology & experimentation **3**.
- Vidaurre, A., J. M. M. Duenas, J. M. Estelles and I. C. Cortazar (2008). Influence of Enzymatic Degradation on Physical Properties of Poly (ϵ -caprolactone) Films and Sponges. Macromolecular symposia, Wiley Online Library.
- Vishwe, V. and A. Chowdhary "Production and Immobilization of extracellular Lipase from *Pseudomonas aeruginosa*."
- Vroman, I. and L. Tighzert (2009). "Biodegradable Polymers." Materials **2**(2): 307-344.
- Walsh, M., K. O'Connor, R. Babu, T. Woods and S. Kenny (2015). "Plant oils and products of their hydrolysis as substrates for polyhydroxyalkanoate synthesis." Chemical and Biochemical Engineering Quarterly **29**(2): 123-133.
- Wang, S., J. Cui, M. Bilal, H. Hu, W. Wang and X. Zhang (2020). "Pseudomonas spp. as cell factories (MCFs) for value-added products: from rational design to industrial applications." Critical Reviews in Biotechnology **40**(8): 1232-1249.
- Wang, Y., K. C. Srivastava, G.-J. Shen and H. Y. Wang (1995). "Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus*, strain A30-1 (ATCC 53841)." Journal of Fermentation and Bioengineering **79**(5): 433-438.
- Wecker, P., X. Moppert, C. Simon-Colin, B. Costa and V. Berteaux-Lecellier (2015). "Discovery of a mcl-PHA with unexpected biotechnical properties: the marine environment of French Polynesia as a source for PHA-producing bacteria." AMB Express **5**(1): 74-74.
- Weissenfels, W. D., M. Beyer and J. Klein (1990). "Degradation of phenanthrene, fluorene and fluoranthene by pure bacterial cultures." Applied Microbiology and Biotechnology **32**(4): 479-484.
- Weng, S.-S., S.-M. Liu and H.-T. Lai (2013). "Application parameters of laccase–mediator systems for treatment of sulfonamide antibiotics." Bioresource technology **141**: 152-159.

- Wery, J., D. M. Da Silva and J. De Bont (2000). "A genetically modified solvent-tolerant bacterium for optimized production of a toxic fine chemical." Applied microbiology and biotechnology **54**(2): 180-185.
- Widada, J., H. Nojiri, T. Yoshida, H. Habe and T. Omori (2002). "Enhanced degradation of carbazole and 2, 3-dichlorodibenzo-p-dioxin in soils by *Pseudomonas resinovorans* strain CA10." Chemosphere **49**(5): 485-491.
- Wierckx, N., T. Narancic, C. Eberlein, R. Wei, O. Drzyzga, A. Magnin, H. Ballerstedt, S. Kenny, E. Pollet and L. Avérous (2018). "Plastic biodegradation: Challenges and opportunities." Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids: Biodegradation and Bioremediation: 1-29.
- Wilkes, R. A. and L. Aristilde (2017). "Degradation and metabolism of synthetic plastics and associated products by *Pseudomonas* sp.: capabilities and challenges." Journal of Applied Microbiology **123**(3): 582-593.
- Winkler, F., A. d'Arcy and W. Hunziker (1990). "Structure of human pancreatic lipase." Nature **343**(6260): 771-774.
- Wohlfarth, S., C. Hoesche, C. Strunk and U. K. Winkler (1992). "Molecular genetics of the extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1." Journal of General Microbiology **138**(7): 1325-1335.
- Wong, D. W. (2009). "Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes." Applied biochemistry and biotechnology **157**(2): 174-209.
- Woolley, P. (1994). "Lipases; their structure, biochemistry and application." Sequence analysis of lipases, esterases and related proteins: 27-28.
- Woolnough, C. A., T. Charlton, L. H. Yee, M. Sarris and L. J. R. Foster (2008). "Surface changes in polyhydroxyalkanoate films during biodegradation and biofouling." Polymer International **57**(9): 1042-1051.
- Xin, X.F., Kvitko, B. and He, S.Y., (2018). *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. Nature Reviews Microbiology, **16**(5): 316-328.
- Xu, G., J. Wang, Q. Yin, W. Fang, Y. Xiao and Z. Fang (2019). "Expression of a thermo- and alkali-philic fungal laccase in *Pichia pastoris* and its application." Protein Expression and Purification **154**: 16-24.
- Yang, H.-S., J.-S. Yoon and M.-N. Kim (2005). "Dependence of biodegradability of plastics in compost on the shape of specimens." Polymer Degradation and Stability **87**: 131-135.
- Yang, J., W. Li, T. B. Ng, X. Deng, J. Lin and X. Ye (2017). "Laccases: Production, Expression Regulation, and Applications in Pharmaceutical Biodegradation." Frontiers in Microbiology **8**(832).
- Yaropolov, A. I., O. V. Skorobogat'ko, S. S. Vartanov and S. D. Varfolomeyev (1994). "Laccase." Applied Biochemistry and Biotechnology **49**(3): 257-280.

Yee, M. S.-L., L.-W. Hii, C. K. Looi, W.-M. Lim, S.-F. Wong, Y.-Y. Kok, B.-K. Tan, C.-Y. Wong and C.-O. Leong (2021). "Impact of Microplastics and Nanoplastics on Human Health." Nanomaterials **11**(2): 496.

Yesilada, O., E. Birhanli and H. Geckil (2018). Bioremediation and Decolorization of Textile Dyes by White Rot Fungi and Laccase Enzymes. Mycoremediation and Environmental Sustainability: Volume 2. R. Prasad. Cham, Springer International Publishing: 121-153.

Yu, H. and H. Huang (2014). "Engineering proteins for thermostability through rigidifying flexible sites." Biotechnology Advances **32**(2): 308-315.

Yu, J. (2001). "Production of PHA from starchy wastewater via organic acids." Journal of Biotechnology **86**(2): 105-112.

Zarevúcka, M. (2012). "Olive oil as inductor of microbial lipase." Olive Oil-Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions, InTech Europe, Rijeka, Croatia: 457-470.

Zechner, R., R. Zimmermann, T. O. Eichmann, S. D. Kohlwein, G. Haemmerle, A. Lass and F. Madeo (2012). "FAT SIGNALS-lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling." Cell metabolism **15**(3): 279-291.

Zeng, J., X. Lin, J. Zhang, X. Li and M. H. Wong (2011). "Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the bacterial laccase CueO from *E. coli*." Applied microbiology and biotechnology **89**(6): 1841-1849.

Zeng, J., Q. Zhu, Y. Wu and X. Lin (2016). "Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons using *Bacillus subtilis* CotA with high laccase activity and copper independence." Chemosphere **148**: 1-7.

Zhang, H., F. Zhang and Z. Li (2009). "Gene analysis, optimized production and property of marine lipase from *Bacillus pumilus* B106 associated with South China Sea sponge *Halichondria rugosa*." World Journal of Microbiology and Biotechnology **25**(7): 1267-1274.

Zhang, Y., Z. Lv, J. Zhou, Y. Fang, H. Wu, F. Xin, W. Zhang, J. Ma, N. Xu and A. He (2020). "Amperometric biosensors based on recombinant bacterial laccase CotA for hydroquinone determination." Electroanalysis **32**(1): 142-148.

Zhou, L., H.-X. Jiang, S. Sun, D.-D. Yang, K.-M. Jin, W. Zhang and Y.-W. He (2016). "Biotechnological potential of a rhizosphere *Pseudomonasaeruginosa* strain producing phenazine-1-carboxylic acid and phenazine-1-carboxamide." World Journal of Microbiology and Biotechnology **32**(3): 50.

Zumstein, M. T., D. Rechsteiner, N. Roduner, V. Perz, D. Ribitsch, G. M. Guebitz, H.-P. E. Kohler, K. McNeill and M. Sander (2017). "Enzymatic hydrolysis of polyester thin films at the nanoscale: effects of polyester structure and enzyme active-site accessibility." Environmental science & technology **51**(13): 7476-7485.

PRILOZI

Prilog I: Rezultati BLAST analize nukleotidnih sekvenci fragmenata umnoženih upotrebom izrođenih prajmera u „touchdown“ PCR metodi

soj <i>P. putida</i> F6		
Veličina fragmenta	Deo očitane nukleotidne sekvence	BLAST poklapanje
Između 1000 bp i 1200 bp	GCATCGGCCCGGAGATCATGGCCGAGGCCGTGAAG GTGCTGGAGCTGGCCAACGACAAGTTCCAGCTGGG CTTCAGCCTGGAGCACGACGTGATCGGCGGCGCCG CCATCGACAAGCACGGCGTGCCGCTGGCCGACGAG ACCCTGGAGCGCGCCCGCAAGGCCGACGCCGTGCT GCTGGGCGCCGTGGGCGGCCCGAAGTGGGACAAGA TCGAGCGCGACATCCGCCCAGGAGCGCGGCCTGCTG AAGATCCGCAGCCAGCTGGGCCTGTTCCGCAACCT GCGCCCGGCCATCCTGTACCCGCAGCTGGCCGACG CCAGCAGCCTGAAGCCGGAGATCGTGAGCGGCCTG GACATCCTGATCGTGCGGAGCTGACCGGCGGCAT CTACTTCGGCGCCCCGCGCGGCCAGCGCGAGCTGG AGGGCGGCGAGCGCCAGGCCTACGACACCCTGCCG TACAGCGAGAGCGAGG	3-izopropil malat dehidrogenaza iz vrste <i>P. putida</i> (<i>Arthrobacter siderocapsulatus</i>)
~1000 bp	AAGACCACCCTGCTGCGCATCATCGCCGGCCTGGA GACCCCGGACGACGGCAACATCGTGTTCCACGGCG AGGACGTGAGCGGCCACGACGTGCGCGACCGCAAC GTGGGCTTCGTGTTCCAGCACTACGCCCTGTTCCGC CACATGAGCGTGTTTCGACAACGTGGCCTTCGGCCT GCGCATGAAGCCGAAGGGCGAGCGCCCGAGCGAG AGCAAGATCGCCGAGAAGGTGCACGAGCTGCTGAA CATGGTGCAGCTGGACTGGCTGAGCGACCGCTACC CGGAGCAGCTGAGCGGCGGCCAGCGCCAGCGCATC GCCCTGGCCCGCGCCCTGGCCGTGGAGCCGAAGGT GCTGCTGCTGGACGAGCCGTTTCGGCGCCCTGGACG CCAAGGTGCGCAAGGAGCTGCGCCGCTGGCTGGCC CGCCTGCACGAGGACATCAACCTGACCAGCGTGTT CGTGACCCACGACCAGGAG	ATP-vezujući protein CysA koji unosi sulfat/tiosulfat, iz vrste <i>P. putida</i> (<i>A. siderocapsulatus</i>)

<p>Između 700 bp i 800 bp</p>	<p>TGCCTGCTGTGGCTGGGCGTGGCCCTGATCGTGGAC GGCCTGGACGGCGCCCTGGCCCGCCGCGTGAACGT GCAGAGCGTGCTGCCGAGCTTCGACGGCAGCATCC TGGACCTGGTGATCGACTACCTGACCTACGTGTTCA TCCCGGCCCTGTTCATCTACCGCTACATCCCGCTGC CGGACTACACCCTGCTGCTGACCGTGAGCCTGATCC TGGTGAGCAGCCTGTTCTGCTTCTGCAACGTGAACA TGAAGAGCAAGGACAACACTACTTCCAGGGCTTCCCG GCCGCCTGGAACGTGGTGGCCCTGTGCCTGTACATC ATCGCCCCGAGCCCGTGGATCACCTTCTGACCGTG ATCGGCCTGGCCCTGCTGACCGTGACCCGCATGAA GTTCTGCACCCGTTCCGCGTGCGCCGCTTCATGCC GATCAACATCGCCGTGACCGCCATCTGGCTGCTGTG CAGCCTGAGCCTGGTGATCAA</p>	<p>Fosfatidilholin sintaza, iz vrste <i>P. putida</i> (<i>A. siderocapsulatus</i>)</p>
<p>~600 bp</p>	<p>GACCTGGCCGCCGACGCCATCGCCCACTTCAGCGC CGCCACCCTGGTGGCCGCCGGCACCCCGGAGGACG TGCGCGACGCCGCCAGGCCTTCGAGGCCAAGCTG AGCGCCGAGACCCTGGAGGAGTTCCTGGCCGCCGA CGCCGTGGTGATCGGCGCCCCGATGTACAACTTCA CCGTGCCGACCCAGCTGAAGGCCTGGATCGACCGC GTGGCCGTGGCCGGCAAGACCTTCCGCTACACCGA GGCCGGCCCGCAGGGCCTGTGCGGCAACAAGAAGG TGGTGCTGGTGAGCACCGCC GGCGGCCTGCACGCCGGCCAGCCGACCGGCGCCGG CCACGAGGACTTCTGAAGGTGTTCTGGGCTTCAT CGGCATCACCGACCTGGAGATCGTGCGCGCCACG GCCTGGCCTACGGC</p>	<p>FMN-zavisna NADH:hinon oksidoreduktaza, iz vrste <i>P. putida</i> (<i>A. siderocapsulatus</i>)</p>
<p>Između 400 bp i 500 bp</p>	<p>CGAGACCCTGGCCCCGTGGACCCTGCTGGACCAGT ACGACCAGCCGTACAGCCTGGGCGCCGACACCCGC ATCCTGCTGGTGGCCCGCGACATGGACGGCGCCAA GCTGGTGAAGGCCGCCCTGGCCGAGCAGCCGAAGG GCTACCTGGAGGCCCGCGGCGCCGTGTTCTGTTGCC GACATCCAGCGCATGCCGGCCCTGATCAGCAAGCT GTTCCGATCCCGGCCATGCGCGACTACAGCTACC GCGTGCTGCTGGACCGCGAGGGCCGCGTGGCCAGC CGCTACGCCGGCGAGCAGGGCAAGGTGCTGTGGCT GAGCCTGGACAACGGCGTGCTGGTGGGCCAGAAGA GCTACACCGCCGCCGACGACCTGAAGGCCGCCCTG GACCAGGCCAGCCGC</p>	<p>Dehidrogenaza koja sadrži FAD/FMN iz vrste <i>P. putida</i> (<i>A. siderocapsulatus</i>)</p>

Između 400 bp i 500 bp	CTGGCCGCCCACGGCGTGGCGCTGCACCCTGCTGGAGGA GGCCCCGCGCCTGGGCGGCGTGGTGTACCGCGGCCCGC TGCGCGACGGCGTGAGCCTGGACTACCTGGGCCCGCGC TACCGCGAGGCCCTGAACACCCTGCACGGCGAGTTCCG CCAGTACGCCGGCCTGATCGACGTGCGCCTGGGCAGCC GCGTGATCGGCGCCGAGGGCTTCCGCGCCCTGATGCTGC TGGACGCCGACGAGCGCCTGCGCGAGGTGGCCTACAGC CACCTGGTGCTGGCCGCCGGCTGCCACGAGCGCAGCGT GCCGTTCCCGGGCTGGACCCTGCCGGGCGTGATGCTGCT GGGCGGCCTGCAGCTGCAG	Fragment hidrogen cijanid sintaze B iz vrste <i>P. putida</i> (<i>A. siderocapsulatus</i>)
Između 200 bp i 300 bp	ATGGGCAACGGCATCAGCGACGTGCTGAGCTTCGAGGA CCTGCAGCGCATCACCGGCTACCAGCGCCGCAGCGACG TGGAGCGCACCCCTGGTGCAGCAGGGCATCCGCATGTTCC GCGGCAAGAGCGGCCCGTGGACCACCATCGACCTGATC AACCGCGCCGGCGGCGTGGGCGCCGGCCAGCCGGAGCG CTACGACGCCGACATCCTG	Protein koji sadrži DUF4224 iz vrste <i>P. putida</i> (<i>A. siderocapsulatus</i>)

soj <i>P. putida</i> mt-2		
Veličina fragmenta	Deo očitane nukleotidne sekvence	BLAST poklapanje
Između 600 bp i 700 bp	AAGCTGGCCCTGAGCGCCCTGTGCCTGGGCCTGGT GCTGGGCCTGCTGGGCGCCCTGGCCAAGACCAGCC CGTACAAGCCGCTGCAGTGGCTGGGCGGCACCTAC AGCACCCCTGGTGCAGCGGCATCCCGGAGCTGCTGTG GGTGCTGCTGATCTACTTCGGCACCGTGAACCTGAT GCGCGCCCTGGGCGAGTTCTTCGGCAACCCGGACC TGGAGCTGAACGCCTTCGCCGCCGGCGTGATCGCC CTGGGCCTGTGCTTCGGCGCCTACGCCACCGAGGT GTTCCGCGGCGCCATCCTGGCCATCCCGAAGGGCC ACCGCGAGGCCGGCGTGGCCCTGGGCCTGAGCAAG TTCCGCATCTTCACCAAGCTGATCATGCCGCAGATG TGGCGCATCGCCCTGCCGGGCTGGGCAACCTGTTC ATGATCCTGATGAAGGACACCGCCCTGGTGAGCGT GATCGGCCTGGAGGAGATCATG	ABC transporter permeaza iz vrste <i>P. putida</i> (<i>A. siderocapsulatus</i>)

soj <i>P. putida</i> CA-3		
Veličina fragmenta	Deo očitane nukleotidne sekvence	BLAST poklapanje
~700 bp	ACTCAGGCGTTGCTGTTCCCCGACTGGCCGGCCCCG GCCTCGGTACGCGCCTGTGTCACCACCCGTCAGGG CGGCGTCAGCTTGCCGCCTTACGAAACCTTCAACCT CGGCGACCATGTTGGGGATGACCCTGCCGCGGTCG CCGAGAACCGCCGCCGCCTGAGCGAACAGTTCACC ATCCAACCGGCCTGGCTCAAACAGGTGCATGGGCG GGTGGTGGCGGATGCCGACCCGGCGGTGGTCGCCG AGGCCGATGCCAGTGGACCCACCAGCCTGGCATTG CCTGCACCGTGATGACCGCCGATTGCCTGCCTGCGC TGTCTGCGACCGTGCCGGCACCCGCGTGGCGGCG GCACATGCGGGCTGGCGCGGGCTGCGGGTGGCGTG CTGGAAGCCACGCTGGACCGGCTGGCGCTGCCGCC AGAAGAGGTGCTGGTGTGGTTGGGGCCTGCCATCG GCCCCGAGCGTT	Multi-bakar polifenol oksidoreduktaza iz vrste <i>P. putida</i> (<i>A. siderocapsulatus</i>)

soj <i>P. putida</i> KT2440		
Veličina fragmenta	Deo očitane nukleotidne sekvence	BLAST poklapanje
~700 bp	GCCTGTGTCACCACCCGTCAGGGCGGGCGTCAGCCT GCCGCCTTACGAAACCTTCAACCTCGGCGACCATGT TGGGGATGACCCTGCCGCGGTCGCCGAGAACCGCC GCCGCCTGAGCGAACAGTTCACCATCCAACCGGCC TGGCTCAAGCAGGTGCATGGGCGGGTGGTGGCGGA TGCCGACCCGACCGTGGTGGCCGAGGCCGATGCCA GCTGGACCCGCCAGCCTGGCATTGCCTGCACCGTG ATGACCGCCGATTGCCTGCCTGCGCTGTTCTGCGAC CGCGCGGGCACCCGCGTGGCGGCGGGCGCATGCTGG CTGGCGTGGGCTGGCGGGTGGCGTGCTGGAAGCCA CGCTGGACCGGCTGGCGCTGCCGCCAGAAGAGGTG CTGGTGTGGTTGGGGCCTGCCATCGGCCCGCAAGC ATTCGAAGTGGGGCTGGAAGTGCGTGATGCCTTTA CCGCCGTGCACCCGCAAGCAGCT	Multi-bakar polifenol oksidoreduktaza iz vrste <i>P. putida</i> (<i>A. siderocapsulatus</i>)

soj <i>P. putida</i> S12		
Veličina fragmenta	Deo očitane nukleotidne sekvence	BLAST poklapanje
~700 bp	GACGCCGTGATCGAGGGCGGCGGCATCGTGGACAG CGACCAGGCCCTGGTGGCCGAGGTGGCCGCCCTGG CCAGCGTGCGCCTGACCGGCTGCCGCATCGTGAGC GTGCGCAGCGAGGAGGAGACCGACGCCCTGTGCGC CCTGATCGCCAGGCCTTCGCCGTGCAGGCCAAGG TGGCCACCCGGTGC GCGAGATGGCCGGCGTGCGC AACGGCTACGACGACTACCAGCGCCTGGGCATGGA CCGCTGGCTGGCCGCCCTGGGCGCCTTCCACCTGGC CAAGGGCGCCTGCCTGGTGATCGACCTGGGCACCG CCGCCAAGGCCGACTTCGTGAGCGCCGACGGCGAG CACCTGGGCGGCTACATCTGCCCGGGCATGCCGCT GATGCGCAGCCAGCTGCGCACCCACACCCGCCGC	Pantotenat kinaza tip III iz vrste <i>P. putida</i> (<i>A. siderocapsulatus</i>)

soj <i>P. aeruginosa</i> PAO1		
Veličina fragmenta	Deo očitane nukleotidne sekvence	BLAST poklapanje
~1000 bp	ACCTACTTCGCCTTCGCCGCCCCGACCGCCAGCGCC CCGGACCTGCCGGCCGTGCTGCCGGGCCCGCTGCC GGACGTGCTGAGCGGCCGCTACCGCCTGGAGCGCA TGCTGGGCGCCGGCGGCATGGGCACCGTGTACCGC GCCCCGACCTGCTGCACGAGCAGTTCGGCGACCC GGCCCCGCTGGTGGCCCTGAAGCTGCTGAACGAGA GCGTGGCCGAGAGCCC GGACGCCAGCGCCCTGCTG TACAGCGAGTTCGCCCTGACCCGCCCGCCTGCGCCA CCCGAACGTGGTGC GCCTGTTCACCTTCGACGTGGA CACCGCCTGCCAGCGCGCCTACATCGTGATGGAGC TGATGCCGGGCCCTGCCGCTGGACCGCCTGCTGTGC GAGCGCCCCGAGGGCCCTGCCGTGGAGCGAGCTGAG CGCCATCGCCCGCCCGCTGCTGGACGTGCTGGCCTA CGT	Nespecifična serin-treonin protein kinaza iz vrste <i>P. aeruginosa</i> (soj ATCC 15692 / DSM 22644 / CIP 104116 / JCM 14847 / LMG 12228 / 1C / PRS 101 / PAO1)

soj *P. chlororaphis* B-561

Veličina fragmenta	Deo očitane nukleotidne sekvence	BLAST poklapanje
Između 400 bp i 500 bp	<p>GCCCCGTGGACCCTGCTGGACCAGTTCGACCGCGC CTACAGCCTGGACGGCCAGACCCGCACCCTGCTGG TGGCCCGCAGCATGGACGGCGCCAAGCTGGTGAAC ACCGCCCTGCAGGACCGCCCGGCCGGCTACCTGGA GGCCCGCCACACCGTGTTTCGTGGCCGACATCCAGC GCATGCCGGCCGTGATCGCCAAGATGTTTCGCCGTG CCGGCCATGCGCGACTACGGCTACCGCATCATGCT GGACCGCGACGGCCGCGTGGCCCCGCGCTACGCCG GCGCCGTGGACAAGGTGCTGTGGCTGCAGCTGGAC AACGGCCGCTGGTGGCCAGCGCGAGTACGGCAC CGCCACCGAG</p>	<p>Dehidrogenaza koja sadrži FAD/FMN iz vrste <i>P. chlororaphis</i></p>

Prilog II: Rezultati BLAST analize nukleotidnih sekvenci fragmenata umnoženih u PCR-u upotrebom specifičnih prajmera CbpF/CbpR i CopAF/CopAR

soj <i>P. putida</i> F6		
Veličina fragmenta	Očitana nukleotidna sekvenca	BLAST poklapanje
348 bp	<p>ATGACTCACCATTCCGAAGACCACCGGTCTCAGGC CATGAACGAGTGCATCGACAACCTGCACGCAATGCC ACGCGATTTGCCTTGAGACCATCAACTATTGCCTGA GCAAAGGAGGTGCCACGCAGCCCCGGAGCACATC GCCCTGCTGGCGACGTGTGCCGATATCTGCGCCACC AGCGCCGACGCCATGTTGCGTGGCGCCAGCGCTCA CTCGGTGGTTTGCAGTGCCTGCGCGGAGATCTGCCG CCAGTGCGCCGAAGCATGCGACGCCATGAACGACC CGGAGATGGCGCGCTGCGCCGAAGTTTGTCCGCGT TGCGCGGAAAGCTGCAGCGCCATGGCGGCT</p>	Protein koji sadrži jezgro od 4 α -zavojnice i vezuje bakar iz soja <i>P.putida</i>
1869 bp	<p>ATGTCGCATGATGATTTTCGTGGTCCACACGGTGGA CCGCCGCTGCTACCTTCGCGGCGGCGATTTGTCCAG GGCTTGGCCTTGGGAGGCGCAGTCGCAGGATTAGG TTTCTGGCCAAAGCCAGTTGGGCGCTCAAGGGCC CGGGACAACCAACGTACTATCGGGCACCGAGTTT GACCTAACCATCGGCGAGACGCCGATGAACTTAC CGGCAAGACCCGCACCGCGATCACCGTCAATGGGT CCGTTCGCGCGCCGTTGCTGCGTTGGCGGGAAGGC ACCACGGTCAACCTGCGTGTCTCCAATGCATTGCCC GCTAACTCCCTCCATGGCGCGGACACCTCCATCCAT TGGCACGGCATCATTTTGCCGGCCAACATGGACGG CGTGCCGGGCTGAGCTTTGACGGTATCGGACGTG GTGAGACCTACCACTACCGGTTACCCCTGCATCAG GCGGCGACCTACTGGTACCACAGCCACTCGGGGTT CCAGGAACAAGCCGGGCTCTATGGCCCGATCATCA TCGACCCATTGGAGCCGGAGCCCTTCAGCTTCGATC GCGACTACGTCGTGATGCTGAGCGATTGGACAGAC CTGGACCCGACGGCCCTGTTTCGATCGTTTGAAGAA GATGCCGGGCCATGACAATTACTACAAGCGCACGG TCGGCGATTTTGC GCGCGATGTGAAGCGCAACGGC CTGTCCGGCCACGTTGGAAGATCGCAAGATGTGGGG CGTGATGCGGATGACGCCACGGATCTGTCCGACG TCAACGCCAACACCTACACCTACCTGATGAACGGC ACGACCTCGCTGGGCAACTGGACCGGTTTGTTCGGC AGTGGCGAGAAGGTGCGCCTGCGTTTCATCAATGG</p>	multi-bakar oksidaza sa sistemom za rezistenciju na bakar iz familije <i>Xantomonadaceae</i>

CTCTGCCATGACGTA CTTTCGATGTGCGTATTCCGGG
GCTAAAGATGACCGTGGTGGCAGCAGATGGCTTGT
ATGTCCATCCGGTTTCCGTCGACGAGTTCCGCATCG
CGGTAGCAGAAACCTTCGATGTGATCGTGGAGCCC
TCCGGGCAGGACGCATTCACCATCTTTGCCCAAGA
CTCCGGTCGCACCGGCTACGTCAGCGGCACGCTCG
CCGTGCGCGAAGGATTACGCGCGCCCGTTCCGTCT
GTGGATCCCCGGCCGCTGCTGACGATGGCAGACAT
GGGCATGGATCATGGATCGATGGATATGTCTGGCG
GCAGCAAGGGCATGGAAGGCGGCTGTGGTGCGGCC
ATGGGCATGCCTGGCATGACCCACCTGCCAGCGG
TAACGCGACCTCGGCCCATGCAGGCCATGCGATGC
CCGCCGCCGGCGATGGTGCCATGGCAGGCATGCAG
CACGGGGGCATGCAATCACACCCTGCCAGCGAGAC
CAACAATCCCCTGTTGGACAACCAGGCCATGAGCG
TGAGTTCGCGCTTGGATGATCCGGGTAATGGCCTGC
GCGATAACGGCCGTCATGTACTGACGTATTCCATGC
TCAAGAGCACCTTTGAAGACCCTGACGGACGCGAC
CCCGGTTCGCGAGATCGAGCTGCATCTGACCGGACA
TATGGAGAAATTCTCCTGGGGCTTCAACGGTCAGA
AGTTCTCCGATGTCAAGCCGCTGCGGCTGAACTAC
GGCGAGCGTATGCGCATCGTATTGGTTAACGACAC
GATGATGACCCATCCCATCCATTTGCACGGCATGTG
GAGTGACGTGGAGGACGACAACGGCAACTTCATGG
TGCGCAAGCACACGGTGGATATGCCGCCGGGTAGC
CGACGCACGTATCGCGTGCGTGCCGATGCGTTGGG
CAGCTGGGCGTTCCATTGCCACCTGCTTTATCACAT
GGAAGCCGGAATGATGCGCACGGTGAGGGTTCGACG
AA

Prilog III: Rezultati analize aminokiselinskih sekvenci Cbp i CopA proteina u PDBsum bazi podataka koja pronalazi slične 3D proteinske strukture dobijene kristalografijom X zraka (prikazano je prvih 10 pogodaka)

A. Analiza CopA aminokiselinske sekvence



Sequence search results

Sequence:

```
MSHDDFRGPHGGPPLLPSRRRFVQGLALGGAVAGLGFWPKASWALKGPGQPNVLSGTEFDLTIGETPMNFTGKTRTAITVN
GSVPAPLLRWREGTTVNLRVSNALPANSLHGADTSIHWHGIIIPANMDGVPGLSFDGIGRGETYHYRFTLHQGGTYWYHSH
SGFQEQAGLYGPIIIDPLEPEPFSFDRDYVVMLSDWTDLDPTALFDRLLKMPGHNDNYKRTVGFARDVKRNGLSATLEDR
KMWGVMRMTPTDLSVDNANTYTYLMNGTSLGNWTGLFRSGEKVRLRFINGSAMTYFDVRIPLKMTVVAADGLYVHPVSV
DEFRIAVAETFDVIVEPSGQDAFTIFAQDSGRTGYVSGTLAVREGLRAPVPSVDRPLLTMDMGMHDHGSMDMSGGSKGME
GGCGAAMGMPGMTPPASGNATSAHAGHAMPAAAGDGAMAGMQHGGMQSHPASETNPNLLDNQAMSVSRLDDPGNGLRDNGR
HVLTYSMRLKSTFEDPDGRDPGREIELHLTGHEKFSWGFNGQKFSVVKPLRLNYGERMRIVLVNDTMMTHPIHLHGMSWSDV
EDDNGNFMVRKHTVDMPPGSRRTYRVRADALGSAWAFHCHLLYHMEAGMMRTVVRVDE
```

Sequence length: 623 residues.

Your sequence search returned the following 399 hits:

	PDB code	Model	Length	%-tage identity	a.a. overlap	z-score	Ligands	Protein name
1.	4f7k(A)	X-ray 2.20Å	377	27.2%	430	429.8	GOL.	Crystal structure of lac15 from a marine microbial metagenome
2.	4x4k(A)	X-ray 2.30Å	525	32.2%	286	417.2	NAG-NAG-BMA, NAG-NAG-BMA-MAN-MAN-MAN, NAG, MAN, SO4.	Structure of laccase from botrytis aclada with full copper content
3.	3sqtr(A)	X-ray 1.67Å	539	32.2%	286	416.9	NAG-NAG-BMA, NAG-NAG-BMA-MAN-MAN-MAN, NAG, MAN, SO4.	Crystal structure of laccase from botrytis aclada at 1.67 a resolution
4.	3v9e(A)	X-ray 1.70Å	539	32.2%	286	416.9	NAG-NAG-BMA, GOL, NAG, MAN.	Structure of the I499m mutant of the laccase from b.Aclada
5.	3g5w(A)	X-ray 1.90Å	318	38.4%	151	414.3	C1O, GOL, C2O.	Crystal structure of blue copper oxidase from nitrosomonas europaea
6.	4e9x(A)	X-ray 1.14Å	317	28.5%	316	393.0	OXY.	Multicopper oxidase mglac (data3)
7.	4e9w(A)	X-ray 1.45Å	317	28.5%	316	393.0	OXY, __O.	Multicopper oxidase mglac (data2)
8.	4e9y(A)	X-ray 1.50Å	317	28.5%	316	393.0	OXY.	Multicopper oxidase mglac (data4)
9.	2zwn(A)	X-ray 1.70Å	317	28.5%	316	393.0	C2O.	Crystal structure of the novel two-domain type laccase from a metagenome
10.	4e9v(A)	X-ray 1.80Å	317	28.5%	316	393.0	__O, __OH.	Multicopper oxidase mglac (data1)

B. Analiza Cbp aminokiselinske sekvence



Sequence search results

Sequence:

MTHHSEDHRSQAMNECIDNCTQCHAICLETINYCLSKGGAHAPEHIALLATCADICATSADAMLRGASAHSVVCSACAEI
CRQCAEACDAMNDPEMARCAEVCRRCAESCSAMAA

Sequence length: **116** residues.

Your sequence search returned the following **89** hits:

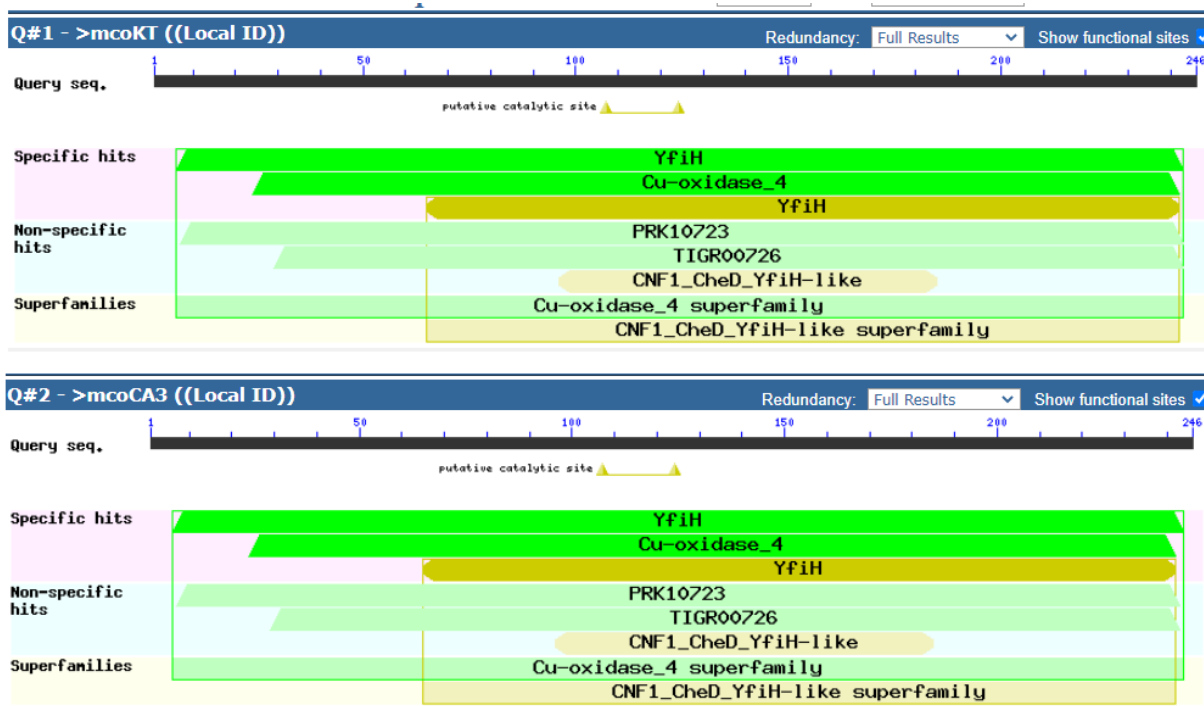
PDB code	Model	Length	%-tage identity	a.a. overlap	z-score	Ligands	Protein name
1. 3lmf(A)	X-ray 2.30Å	109	43.0%	107	472.0		Crystal structure of nmul_a1745 protein from nitrosospira multiformis, northeast structural genomics consortium target nmr72
2. 6wkt(A)		106	34.0%	106	345.8		Cu(i)-bound copper storage protein bscsp3
3. 5fig(A)	X-ray 1.70Å	100	35.6%	101	333.7		Apo-csp3 (copper storage protein 3) from bacillus subtilis
4. 5fig(F)	X-ray 1.70Å	103	34.7%	101	331.0		Apo-csp3 (copper storage protein 3) from bacillus subtilis
5. 6r01(A)	X-ray 1.18Å	119	32.1%	112	312.2		Streptomyces lividans ccsp mutant - h107a/h111a
6. 5fig(D)	X-ray 1.70Å	90	35.6%	101	307.1		Apo-csp3 (copper storage protein 3) from bacillus subtilis
7. 5fig(C)	X-ray 1.70Å	93	34.7%	101	306.8		Apo-csp3 (copper storage protein 3) from bacillus subtilis
8. 6qyb(A)	X-ray 1.18Å	120	31.2%	112	305.9		Streptomyces lividans ccsp mutant - h111a
9. 6q58(B)	X-ray 1.50Å	118	31.2%	112	304.8		Copper loading to a cytosolic copper storage protein from streptomyces lividans (five coppers)
10. 6q6b(B)	X-ray 1.90Å	118	31.2%	112	304.8		Structure of the copper storage protein, ccsp, from streptomyces lividans loaded with 10 copper equivalents

Prilog IV:

A. Poravnanje aminokiselinskih sekvenci multi-bakar oksidaza McoCA3 i McoKT

mcoKT	MSDLTQALLFPDWPAPASVRACVTTTRQGGVSLPPYETFNLGDHVGDDPAAVAENRRRLSE	60
mcoCA3	MSGLTQALLFPDWPAPASVRACVTTTRQGGVSLPPYETFNLGDHVGDDPAAVAENRRRLSE ** .*****	60
mcoKT	QFTIQPAWLKQVHGRVVADADPTVVAEADASWTRQPGIACVTMTADCLPALFCDRAGTRV	120
mcoCA3	QFTIQPAWLKQVHGRVVADADPAVVAEADASWTRQPGIACVTMTADCLPALFCDRAGTRV *****.*****.*****	120
mcoKT	AAAHAGWRGLAGGVLEATLDRALALPPEEVLVWLGP AIGPQAFEVGLEVRDAFTAVHPQAA	180
mcoCA3	AAAHAGWRGLAGGVLEATLDRALALPPEEVLVWLGP AIGPQAFEVGLEVRDAFTAVHPQAA *****	180
mcoKT	RAFVDGERPGKLLADIYELARIRLAARGVTAVYGGGLCTVSDARFFSYRRTTPQGGRFASL	240
mcoCA3	RAFVDGERPGKLLADIYELARIRLAARGVTAVYGGGLCTVSDARFFSYRRTTPQGGRFASL *****	240
mcoKT	VWLDPR	246
mcoCA3	VWLEPQ	246
	***:*	

B. Upoređivanje domena odgovornih za lakaznu aktivnost kod enzima McoKT i McoCA3



Prilog V: Sekvence gena koji kodiraju lipolitičke enzime (geni koji su uklonirani u ekspresioni vektor pJB861)

soj <i>P. aeruginosa</i> PAO1		
Naziv i veličina gena	Očitana nukleotidna sekvenca	BLAST poklapanje
<i>lipA</i> 936 bp	ATGAAGAAGAAGTCTCTGCTCCCCCTCGGCCTGGCC ATCGGTCTCGCCTCTCTCGCTGCCAGCCCTCTGATCC AGGCCAGCACCTACACCCAGACCAATACCCCATCG TGCTGGCCACGGCATGCTCGGCTTCGACAACATCC TCGGGGTCGACTACTGGTTCGGCATTCCCAGCGCCT TGCGCCGTGACGGTGCCAGGTCTACGTCACCGAAG TCAGCCAGTTGGACACCTCGGAAGTCCGCGGCGAGC AGTTGCTGCAACAGGTGGAGGAAATCGTCGCCCTCA GCGGCCAGCCCAAGGTCAACCTGATCGGCCACAGC CACGGCGGGCCGACCATCCGCTACGTCGCCGCCGTA CGTCCCGACCTGATCGCTTCCGCCACCAGCGTCGGC GCCCCGCACAAGGGTTTCGGACACCGCCGACTTCCTG CGCCAGATCCCACCGGGTTCGGCCGGCGAGGCAGTC CTCTCCGGGCTGGTCAACAGCCTCGGCGCGCTGATC AGCTTCCTTTCCAGCGGCAGCACCGGTACGCAGAAT TCACTGGGCTCGCTGGAGTCGCTGAACAGCGAGGGT GCCGCGCGCTTCAACGCCAAGTACCCGCAGGGCATC CCCACCTCGGCCTGCGGCGAAGGCGCCTACAAGGTC AACGGCGTGAGCTATTACTCCTGGAGCGGTTCTCG CCGCTGACCAACTTCCTCGATCCGAGCGACGCCTTC CTCGGCGCCTCGTCGCTGACCTTCAAGAACGGCACC GCCAACGACGGCCTGGTCGGCACCTGCAGTTCGCAC CTGGGCATGGTGATCCGCGACAACCTACCGGATGAAC CACCTGGACGAGGTGAACCAGGTCTTCGGCCTCACC AGCCTGTTCGAGACCAGCCCGGTCAGCGTCTACCGC CAGCACGCCAACCGCCTGAAGAACGCCAGCCTGTA G	<i>lip</i> gen koji kodira triacilglicerol lipazu iz vrste <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (soj ATCC 15692 DSM 22644 CIP 104116 JCM 14847 LMG 12228 1C PRS 101 PAO1)

<p><i>plcB</i> 987 bp</p>	<p>ATGAAAACCTTCGCCCCGCTGGCCGCGGTCTCTGCATCT GCGCCATCGCCAGCCAGGCCAACGCCTGGTCGCAACCGA CCCACAAGAACATCGTCAAGGATGCCCTGGCCTTCATGA ACTCCTCTACGCCACCGAGGAGATGCGCCAGGCCTACC GGTTCTACGTGAGCGCCCGCCGCGAGCGAGGCGCAGGCCG GGGAGATCCTCGGCCAGGCGGCCTTCGACGTGGACGACT TCAAGGACACCCGTCTCGGTGGCTGGTGGGTCGGCTACG AACACGCGCCGCTGTGGGGCGCGGCTTCGGGCATCGTCA ACTACACCTCGTACTGGCACTTCTCAACCTGGCCCCGGG ACGGCGACTCCCATGGCAACCCCCACGGCGGCTACGACT ACCGTACCACAAGGTGACGGCGGCATCGCCGACGTCG ACTGGTACGCCATGGTCTACCTCTACAACCGCGAGCTGA AGCGCGAGGACTTCGACACCACCGAGGCGCACTACCGCC AGGGCACCCGCTCGGACTGGCAGGAGCACTACGGCGACT TCCAGACCGCCGCCTTCCAGCCGATCGATAACCTCGCCA CCTACTGGTTCGAGCAGTTCCGCGCCGCGCCTTCGCTGCA GACCATCGGCTATGCCCTGCATGCCACCGGCGACGTGGC CCAGCCGCACCATGTGTGGATCACCTCGGCCAACGGCCA TTCCAGCTGGGAAGGCTGGGTGACGACCACTACGCCAG CGAGAAGCTCAACGACCCGGCGGGTGGCCAACCTGGT GGGGCGCTACGACCCGAGCAAGAGCATCCGCGACCTGCT CACCCAGACCGGCCAGGTCGCCTACGCGCGCCCCGAGCC GCTCTACGACACCAGCTACGAGACGCGCCTGCGGGTGGC GAAGGAGCTGATTCGAGTCCATCGCCCTGACCGTCAC CGTACTGACCAAGGGCGCCAACAGCTTCGATGCACCGAC TGCTCTCTGA</p>	<p>PlcB gen koji kodira fosfolipazu C iz vrste <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (soj ATCC 15692 DSM 22644 CIP 104116 JCM 14847 LMG 12228 1C PRS 101 PAO1)</p>
-------------------------------	---	--

soj *P. chlororaphis* B-561

Naziv i veličina gena	Deo očitane nukleotidne sekvence	BLAST poklapanje
<i>lipA</i> 891 bp	ATGTCCCAAGAGCTTGCCACGCGTTACCCGTTGGT CCTGGTTCCCGGCATGCTGGGGTTTATTCGGCTGG TGCTGTATTCGTA CTGGTTCGGCATCGAGTCGGCG CTGCGTCGCGGCGGCGCCACGGTAATTGCGGTGCA GGTTTCGCCGCTGCATTCGACCCAGGTGCGGGGCG AGCAGCTGTTGCTGCGGATCGAGGAAATACGCCG CGAAACCGGCGCCGACAAGGTCAACCTGATCGGC CATAGCCAGGGTGCCTCACTGCCCGGTATGCCGC GGCCAAACGGCCGGACTGGGTGGCCTCGGTGACC TCGGTGGCCGGGCCCAATCATGGCTCGGAGCTGGC CGATTACATTGAGCGCCACCACTCCATCGACACCC TGCGCGGGCGTGTGCTGAGTTTTATCCTGCGGGTG ATTGCCGTGCTGATGTGCTGGCTGGACACCGGCTA TCGCGGGCCGAAGCTGCCGGCGGACATCCATGCC GCACATCGCTCGCTGACCTGCGAGGGCGTGGCGCT GTTCAACCGCGAATATCCCCAGGGCCTGCCGAGA CCTGGGGCGGGCAGGGGCGGAAGTGGTCAACGG GGTGCGCTATTACTCCTGGTCCGGCACCTTGCAGC CGGGCAAGACCAATCGTGGGCGCAACCTGTTTCA CGGCACCAACCGCACCTGCCGGCTGTTTCGCCAGGA CCTTTGTCCGCGAGGCGGGCAGTGCGATGGCATG GTCGGCCGCTACAGCTCGCACCTGGGCACGGTGAT TGGCGACGATTACCCCTCGACCACTTCGATATCG TCAACCAGTCGCTGGGGCTGGTGGGGCGGGGCGC CGAGCCGGTCCGGCTGTTTGTGCGAGCATGCCCGGC GGTGAAGGCGGCGGGGGTATAG	alfa/beta hidrolaza iz vrste <i>Pseudomonas</i> sp. MF4836)

BIOGRAFIJA AUTORA

Mina Mandić rođena je 4. 8. 1985. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu „Despot Stefan Lazarević“ i VI beogradsku gimnaziju. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija upisala je 2004. godine. Diplomski rad pod nazivom „Produkcija MDA u osmotski dehidriranom mesu; Antimikrobna aktivnost LAB“ uradila je na Katedri za mikrobiologiju Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu pod rukovodstvom prof. dr Slaviše Stankovića i odbranila ga 2011. godine. Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija, modul Prokarioti, upisala je 2013. godine. Eksperimentalni deo doktorske teze uradila je u Laboratoriji za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, pod mentorstvom dr Sanje Jeremić. Kao FEMS stipendista (Federation of European Microbiological Societies) uradila je deo istraživanja pod rukovodstvom dr Evangelosa Topakasa u Biotehnološkoj laboratoriji Škole za hemijsko inženjerstvo Nacionalnog Tehničkog Univerziteta u Atini, Grčka. Dobitnik je i FEMS-ove stipendije za učešće na 6. evropskom kongresu mikrobiologa. Tokom svog rada bila je uključena u dva nacionalna i dva međunarodna projekta. Do sada je kao autor ili koautor objavila šest radova u časopisima od međunarodnog značaja u kategorijama M21 (3), M22 (1) i M23 (2), i imala osam saopštenja na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima. Učestvovala je i u aktivnostima vezanim za promociju i popularizaciju nauke. Član je Udruženja mikrobiologa Srbije i Federacije evropskih mikrobioloških udruženja (FEMS).

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora Mina M. Mandić

Broj indeksa M3006/2013

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom: „Biotehnološki značajni enzimi iz sojeva roda *Pseudomonas*: Identifikacija i rekombinantna ekspresija lakaza i lipaza“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena doktorska disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije

Ime i prezime autora Mina M. Mandić

Broj indeksa M3006/2013

Studijski program Molekularna biologija, modul Prokarioti

Naslov rada „Biotehnoški značajni enzimi iz sojeva roda *Pseudomonas*: Identifikacija i rekombinantna ekspresija lakaza i lipaza“

Mentor dr Sanja Jeremić, viši naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu i dr Đorđe Fira, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stanicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Biotehnološki značajni enzimi iz sojeva roda *Pseudomonas*: Identifikacija i rekombinantna ekspresija lakaza i lipaza“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, _____

1. **Autorstvo** – Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo – bez prerade.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo - deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.