

UNIVERZITET U BEOGRADU  
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Katarina R. Mihajlovski

**POLJOPRIVREDNI I INDUSTRIJSKI  
OTPAD KAO SUPSTRAT ZA  
PROIZVODNJU CELULAZA I AMILAZA  
POMOĆU NOVOG BAKTERIJSKOG  
SOJA *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1**

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Katarina R. Mihajlovski

**AGRICULTURAL AND INDUSTRIAL  
WASTE AS A SUBSTRATE FOR  
CELLULASE AND AMYLASE  
PRODUCTION BY NOVEL BACTERIAL  
STRAIN**  
***Paenibacillus chitinolyticus* CKS1**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

**MENTOR:**

---

Dr Suzana Dimitrijević–Branković, vanredni profesor,  
Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

**ČLANOVI KOMISIJE:**

---

Dr Mirjana Rajilić-Stojanović, naučni saradnik  
Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

Dr Slavica Šiler-Marinković, redovni profesor,  
Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

Dr Anita Klaus, docent  
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

---

Dr Dejan Bezbradica, vanredni profesor,  
Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

**DATUM ODBRANE:**

---

## ZAHVALNICA

*Posebno mesto u ovoj disertaciji pripada mom divnom mentoru dr Suzani Dimitrijević-Branković, izuzetnom učitelju a pre svega sjajnom čoveku, uz čiju sam nesebičnu pomoć, bezgraničnu podršku, veliko strpljenje i smirenost prošla kroz, za sebe, jedan vrlo trnovit put i uspeła da završim ovu doktorsku disertaciju. Hvala joj što je verovala u mene. Neizmerno i beskrajno joj hvala!*

*Posebno se zahvaljujem dr Mirjani Rajilić-Stojanović koja mi je svojim znanjem, sugestijama i velikim iskustvom pružila nesebičnu pomoć u svim segmentima naučno-istraživačkog rada a posebnotokom izrade ove doktorske disertacije. Hvala joj na velikoj podršci!*

*Hvala profesorima dr Dejanu Bezbradici, dr Slavici Šiler-Marinković i dr Aniti Klaus na korisnim savetima i sugestijama tokom izrade i pisanja ove doktorske disertacije.*

*Neizmernu zahvalnost dugujem svojim dragim koleginicama Nedi Radovanović, Slađani Davidović i Mioni Miljković na beskrajnoj pomoći tokom izrade eksperimentalnog dela ove doktorske disertacije. Bile su uvek tu za sve dobre i loše trenutke prilikom izrade ove disertacije. Hvala vam od srca!*

*Jedno veliko hvala koleginicama Milici Carević i dr Vesni Lazić na nesebičnoj pomoći u različitim fazama eksperimentalnog rada. Takođe, hvala kolegici Mariji Dević sa Instuta za primenu nuklearne energije u Beogradu, na realizaciji određenih eksperimenata i tumačenju njihovih rezultata koji su deo ove doktorske disertacije.*

*Svim prijateljima, kolegama, profesorima i tehničarkama sa Katedre za Biohemijско inženjerstvo i Biotehnologije Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, hvala na pomoći, svakodnevnoj podršci i druženju ovih godina koliko je trajala izrada ove doktorske disertacije.*

*Ogromnu zahvalnost dugujem svojoj porodici. Pre svega svojoj majci za sve godine mog školovanja, ljubav i veru. Sestri za ljubav, podršku i čuvanje moje dece. Mom sestriću Mateji za pomoć prilikom grafičke obrade rezultata ove doktorske disertacije. Najviše mom Đoletu za безусловnu ljubav, razumevanje i tehničku podršku prilikom izrade ove disertacije. Hvala mojim dečacima, Ognjenu i Stefanu, za strpljenje, ljubav i svaki njihov osmeh.*

## **Poljoprivredni i industrijski otpad kao supstrat za proizvodnju celulaza i amilaza pomoću novog bakterijskog soja *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1**

### **Rezime**

Predmet ove disertacije je iskorišćenje otpadnih sirovina, poljoprivrednog i industrijskog porekla, za proizvodnju enzima celulaza i amilaza pomoću novoizolovanog bakterijskog soja *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1.

Optimizacija procesa proizvodnje hidrolitičkih enzima celulaza i amilaza vršena je korišćenjem komercijalnih supstrata i otpadnih sirovina ivariranjem uticaja pojedinačnih parametara primenom metode planiranog eksperimenta i matematičko-statistička obrade eksperimentalnih podataka – metode odzivnih površina (RSM).

Proces proizvodnje celulaza (endoglukanaza i egzoglukanaza) je optimizovan na različitim komercijalnim podlogama ali i na otpadnim sirovinama. Soj CKS1 je pokazao predominantnu aktivnost egzoglukanaza (iskazanih kao Avicelazna aktivnost) što je netipično za većinu bakterijskih vrsta. Rezultati su pokazali da se *P. chitinolyticus* CKS1 može koristiti za dobijanje celulazu komercijalnoj podlozi (maksimalna CMC-azna i Avicelazna aktivnost iznose 0,532 U/mL i 1,83 U/mL, pojedinačno), ali i na otpadnim sirovinama: otpadnom lekovitom bilju (maksimalna CMC-azna i Avicelazna aktivnost iznose 0,203 U/mL i 1,94 U/mL, pojedinačno) i piljevini (maksimalna CMC-azna i Avicelazna aktivnost iznose 0,145 U/mL i 1,75 U/mL, pojedinačno). Soj CKS1 je pokazao mogućnost rasta i proizvodnje dve vrste celulaza: endoglukanaza (iskazanih kao karboksimetil celulazna (CMC-azna) aktivnost i egzoglukanaza (iskazanih kao Avicelazna) aktivnost tokom svog rasta na čvrstom otpadnom supstratu- repinom rezancu (maksimalna CMC-azna i Avicelazna aktivnost iznosi 3,159 U/g i 4,840 U/g). Metodom odzivnih površina optimizovana je proizvodnja endoglukanaza i egzoglukanaza u podlozi obogaćenoj ječmenim mekinjama (maksimalna CMC-aza i Avicelazna aktivnost iznosi 0,405 U/mL i 0,433 U/mL, pojedinačno). Dobijena je nešto niža vrednost Avicelazne aktivnosti, ali optimizovani procesi jasno ukazuju na mogućnost njihovog korišćenja, pošto su u skladu sa principima održive proizvodnje i brige o životnoj sredini.

*P. chitinolyticus* CKS1 soj je pokazao i amilolitičku aktivnost, netipičnu za vrstu kojoj pripada i stoga je metodom odzivnih površina optimizovana proizvodnja  $\beta$ -amilaza na podlozi dobijenoj korišćenjem otpadne vode iz industrije prerade kartonske ambalaže (0,333 U/mL) i na podlozi baziranoj na melasi i otpadnom repinom rezancu (2,237 U/mL).

U cilju što potpunije analize podobnosti primene dobijenih enzima u industrijskim procesima, izvršena je karakterizacija proizvoda hidrolize nastalih primenom obe klase enzima. Utvrđeno je da su proizvodi enzimske hidrolize dobijeni pomoću enzima *P. chitinolyticus* CKS1 vredni biotehnološki proizvodi – glukoza i maltoza.

Primenljivost bakterijskih celulaza i amilaza, koje proizvodi soj CKS1 se ogleda u mogućnosti hidrolize pamučnog materijala, kao celulozne sirovine i ječmenih mekinja, kao lignocelulozno-skrobne sirovine, pri čemu se oslobađa 0,589 mg/mL i 2,74 mg/mL redukujućih šećera pojedinačno. Time se otvaraju nove mogućnosti industrijske primene ovih enzima, prevashodno za saharifikaciju skrobnih sirovina i u industriji proizvodnje bioetanol.

Ključne reči: poljoprivredni i industrijski otpad, celulaze, amilaze, *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1, fermentacija, optimizacija, biotehnološki proizvod, industrijska primena

**Naučna oblast:** Tehnološko inženjerstvo

**Uža naučna oblast:** Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

**UDK:** 62-665.9:663.15:579.852.11(043.3)

## **Agricultural and industrial waste as a substrate for cellulase and amylase production by novel bacterial strain *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1**

### **Abstract**

The subject of this thesis is the utilization of waste materials of agricultural and industrial origin, for the production of enzymes cellulases and amylases using a novel isolated bacterial strain *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1.

Optimization of the process of production of hydrolytic enzymes cellulases and amylases was performed using commercial substrates and waste materials by varying the influence of individual parameters but also by employing the method of the planned experiment and mathematical-statistical processing of experimental data - Response Surface Methodology (RSM).

The process of producing cellulase (CMC-ase and Avicelase) was optimized using various commercial substrates but also using waste materials. The strain CKS1 showed predominant exoglucanase (Avicelase) activity which is not typical for most bacterial species. Results showed that *P. chitinolyticus* CKS1 could be used for cellulase (CMC-ase and Avicelase) production, in a liquid medium with commercial substrates (with maximum CMCase and Avicelase activity of 0,532 U/mL and 1,83 U/mL respectively), but also in a medium with waste substrates: waste medicinal herbs (with maximum CMCase and Avicelase activity of 0,203 U/mL and 1,94 U/mL, respectively) and sawdust (with maximum CMCase and Avicelase activity of 0,145 U/mL and 1,75 U/mL, respectively).

The strain CKS1 could produce two types of cellulase (CMC-ase and Avicelase) during its growth on solid waste substrate- sugar beet pulp (the maximum CMC-ase and Avicelase activity was 3,159 U/g and 4,840 U/g, respectively).

RSM was used for process optimization and CMC-ase and Avicelase activity in a medium supplemented with barley bran reached maximum activity of 0,405 U/mL and 0,433 U/mL, respectively. Although Avicelase activity was relatively lower, the contribution of optimized process clearly indicates the possibility of using the described processes that support the principles of sustainable production and environmental care.

*P.chitinolyticus* CKS1 strain also showed amyolytic activity, that a not typical for the type strain of the species and therefore RSM was used for optimization of  $\beta$ -amylase production using packaging-industry wastewater (maximum  $\beta$ -amylase activity 0,333 U/mL) and molasses and sugar beet pulp (maximum  $\beta$ -amylase activity 2,237 U/mL).

In order to complete characterization and to determine the suitability of these enzymes application in industrial processes, the characterization of the end product of hydrolysis by the strain CKS1 was characterized and it was found that glucose and maltose were produced as valuable biotechnological products.

The possibility of *P.chitinolyticus* CKS1 cellulases and amylases application is in the hydrolysis of a cotton material and barley bran was tested and hydrolysis yield 0,589 mg/mL and 2,74 mg/mL of reducing sugars, respectively. These results indicate new possibilities for industrial applications of these enzymes, primarily for the saccharification of starch raw materials and industrial production of bioethanol.

**Keywords:** agricultural and industrial waste, cellulases and amylases, *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1, fermentation, optimization, biotechnological products, industrial applications

**Scientific area:** Technological engineering

**Scientific discipline:** Biochemical Engineering and Biotechnology

**UDC:** 62-665.9:663.15:579.852.11(043.3)



## SADRŽAJ

<b>UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>TEORIJSKI DEO .....</b>	<b>5</b>
<b>1. AGRO-INDUSTRIJSKI I INDUSTRIJSKI OTPAD .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1. Biotehnološki vredne komponente agro-industrijskog otpada- lignocelulozna biomasa, nus proizvodi iz industrije prerade šećerne repe i otpadne vode iz industrija prerade različitih sirovina.....</b>	<b>6</b>
<i>1.1.1. Celuloza .....</i>	<i>6</i>
<i>1.1.2. Skrob.....</i>	<i>8</i>
<b>1.2. Tipovi agro-industrijskog otpada.....</b>	<b>9</b>
<i>1.2.1. Lignocelulozna biomasa .....</i>	<i>9</i>
1.2.1.2. Primeri otpadne lignocelulozne biomase-izluženi repin rezanac, otpadno bilje i ječmene mekinje.....	12
<i>1.2.2. Industrijski otpad.....</i>	<i>13</i>
1.2.2.1. Otpadne vode iz industrijskih postrojenja .....	13
1.2.2.2. Melasa .....	15
<b>1.3. Tehnološki postupci za iskorišćenje otpada.....</b>	<b>16</b>
<i>1.3.1. Lignocelulozni predtretman .....</i>	<i>16</i>
<b>2.HIDROLITIČKI ENZIMI KOJI SE MOGU PROIZVODITI NA AGRO-INDUSTRIJSKOM OTPADU – CELULAZE I AMILAZE I MIKROORGANIZMI KAO NJIHOVI PRODUCENTI.....</b>	<b>19</b>

2.1. Celulaze .....	19
2.2. Amilaze.....	22
2.3. Mikroorganizmi producenti celulaza .....	24
2.4. Mikroorganizmi producenti amilaza .....	25
2.5. <i>Paenibacillus</i> .....	27
2.5.1. <i>Ćelijska struktura i morfologija</i> .....	27
2.5.2. <i>Karakteristike kolonija</i> .....	28
2.5.3. <i>Ishrana i metabolizam</i> .....	29
2.5.4. <i>Ekologija</i> .....	30
2.5.5. <i>Paenibacillus spp. kao producent celulaza i amilaza</i> .....	31
<b>3. MIKROBIOLOŠKI POSTUPCI PROIZVODNJE CELULAZA I AMILAZA</b> .....	<b>32</b>
3.1. Mikrobiološki procesi za proizvodnju celulaza .....	32
3.1.1. <i>Najvažniji faktori koji utiču na proizvodnju celulaza</i> .....	33
3.1.2. <i>Celulaze za biokonverziju- komercijalni preparati</i> .....	34
3.1.2.1. <i>Željene karakteristike celulaznih preparata za biokonverziju</i> .....	36
3.1.3. <i>Industrijska primena mikrobnih celulaza</i> .....	37
3.2. Mikrobiološki procesi za proizvodnju amilaza.....	39
3.2.1. <i>Najvažniji faktori koji utiču na proizvodnju amilaza</i> .....	41
3.2.2. <i>Amilaze-komercijalna proizvodnja</i> .....	42
3.2.3. <i>Industrijska primena amilaza</i> .....	43
3.3. <i>Povećanje efikasnosti procesa fermentacije -imobilizacija ćelija</i> .....	47
<b>CILJ RADA</b> .....	<b>50</b>
<b>EKSPERIMENTALNI DEO</b> .....	<b>51</b>
<b>4. MATERIJALI I OPREMA</b> .....	<b>51</b>
<b>5. METODE</b> .....	<b>55</b>

<b>5.1. Izolacijam mikroorganizma.....</b>	<b>55</b>
<b>5.2. Karakterizacija mikroorganizama.....</b>	<b>55</b>
<i>5.2.1. Identifikacija mikroorganizama metodom sekvencioniranja 16S ribozomalne RNK.....</i>	<i>55</i>
<i>5.2.2. Ispitivanje sposobnosti rasta mikroorganizma na različitim temperaturama...58</i>	<i>58</i>
<i>5.2.3. Ispitivanje sposobnosti rasta mikroorganizma pri različitim pH.....</i>	<i>59</i>
<i>5.2.4. Određivanje osnovnih biohemijskih karakteristika radnog mikroorganizma ...59</i>	<i>59</i>
<b>5.3. Određivanje enzimske aktivnosti .....</b>	<b>59</b>
<i>5.3.1. Dokazivanje celulolitičke aktivnosti- skrining.....</i>	<i>59</i>
<i>5.3.2. Dokazivanje amilolitičke aktivnosti- skrining .....</i>	<i>60</i>
<i>5.3.3. Izolovanje sirovog enzima iz fermentacione podloge .....</i>	<i>60</i>
<i>5.3.4. Određivanje aktivnosti celulaza .....</i>	<i>60</i>
<i>5.3.5. Određivanje aktivnosti amilaza .....</i>	<i>64</i>
<b>5.4. Proizvodnja celulaza .....</b>	<b>67</b>
<i>5.4.1. Proizvodnja celulaza u tečnim podlogama submerznim postupkom .....</i>	<i>67</i>
<i>5.4.1.1. Proizvodnja celulazau komercijalnim podlogama .....</i>	<i>67</i>
<i>5.4.1.2. Proizvodnja celulaza u podlogama obogaćenim otpadnim sirovinama .....</i>	<i>69</i>
<i>5.4.2. Proizvodnja enzima na čvrstom otpadnom supstratu .....</i>	<i>70</i>
<i>5.4.2.1. Proizvodnja celulaza na izluženom repinom rezancu .....</i>	<i>70</i>
<b>5.5. Proizvodnja amilaza .....</b>	<b>71</b>
<i>5.5.1. Proizvodnja amilaza u komercijalnoj podlozi.....</i>	<i>71</i>
<i>5.5.2. Proizvodnja amilaza na otpadnim sirovinama .....</i>	<i>72</i>
<b>5.6. Optimizacija procesa proizvodnje celulaza i amilaza-metoda odzivnih površina.....</b>	<b>73</b>
<i>5.6.1. Uslovi procesa optimizacije proizvodnje enzima .....</i>	<i>77</i>
<i>5.6.1.1. Optimizacija procesa proizvodnje celulaza u podlozi sa ječmenim mekinjama .....</i>	<i>77</i>
<i>5.6.1.2. Optimizacija procesa proizvodnje β-amilaza na otpadnoj vodi iz industrije prerade kartonske ambalaže .....</i>	<i>78</i>
<i>5.6.1.3. Optimizacija postupka proizvodnje β-amilaza na melasi i izluženom repinom rezancu .....</i>	<i>79</i>
<b>5.7. Karakterizacija celulaza.....</b>	<b>80</b>

<i>5.7.1. Određivanje optimalne temperature i optimalnog pH celulaza</i> .....	80
<i>5.7.2. Uticaj različitih metalnih jona i EDTA na aktivnost egzoglukanaza</i> .....	81
<i>5.7.4. Temperaturna stabilnost i uticaj različitih jona i EDTA na temperaturnu stabilnost egzoglukanaza</i> .....	81
<i>5.7.5. Analiza proizvoda hidrolize celuloze tečnom hromatografijom (HPLC)</i> .....	82
<i>5.7.6. Prečišćavanje celulaza</i> .....	82
5.7.6.1. Elektroforeza i zimogramska analiza celulazne aktivnosti.....	82
<b>5.8. Karakterizacija amilaza</b> .....	<b>83</b>
<i>5.8.1. Određivanje optimalne temperature i optimalnog pH amilaza</i> .....	<i>84</i>
<i>5.8.2. Uticaj različitih metalnih jona i površinski aktivnih materija</i> .....	<i>84</i>
<i>5.8.3. Analiza proizvoda hidrolize skroba tečnom hromatografijom visokih performansi (HPLC)</i> .....	<i>85</i>
<b>5.9. Primena dobijenih celulaza i amilaza za saharifikaciju pamučnog materijala i ječmenih mekinja</b> .....	<b>86</b>
<i>5.9.1. Enzimska hidroliza pamučnog materijala</i> .....	<i>86</i>
<i>5.9.2. Enzimska hidroliza ječmenih mekinja</i> .....	<i>86</i>
<b>6. REZULTATI I DISKUSIJA</b> .....	<b>87</b>

<b>6.1. Identifikacija, karakteristike radnog mikroorganizma i skrining na celulaze i amilaze .....</b>	<b>87</b>
<b>6.2. Proizvodnja celulaza .....</b>	<b>90</b>
<b>6.2.1. Proizvodnja celulaza u tečnim podlogama submerznim postupkom .....</b>	<b>90</b>
6.2.1.1. Proizvodnja celulaza u komercijalnim podlogama (eksperiment 1).....	90
6.2.2. Proizvodnja celulaza u podlozi sa komercijalnim supstratima i otpadnim lekovitim biljem i piljevinom(eksperiment 2 i 3).....	96
6.2.3. Proizvodnja celulaza u podlozi sa ječmenim mekinjama(eksperiment 4) .....	102
<b>6.2.2. Proizvodnja celulaza na čvrstom supstratu .....</b>	<b>103</b>
6.2.2.1. Proizvodnja celulaza na izluženom repinom rezancu .....	103
<b>6.3. Proizvodnja amilaza .....</b>	<b>107</b>
<b>6.3.1. Proizvodnja amilaza na komercijalnoj podlozi i u podlozi sa otpadnom vodom iz industrije prerade kartonske ambalaže (eksperiment 1 i eksperiment 2).....</b>	<b>107</b>
6.3.1.1. Uticaj pH na aktivnost sirovih amilaza .....	107
6.3.1.2. Uticaj vremena inkubacije i pasažiranja kulture na proizvodnju $\beta$ -amilaza ...	108
<b>6.3.2. Proizvodnja <math>\beta</math>-amilaza na malasi i izluženom repinom rezancu (eksperiment 3) .....</b>	<b>110</b>
<b>6.4. Primena eksperimentalnog dizajna za optimizaciju procesa proizvodnje enzima .....</b>	<b>113</b>
<b>6.4.1. Optimizacija procesa proizvodnje celulaza u podlozi sa ječmenim mekinjama .....</b>	<b>113</b>
6.4.1.1. Ocena značajnosti modela .....	114
6.4.1.1.1. Ocena značajnosti modela 1 –proizvodnja endoglukanaza .....	115
6.4.1.1.1.2. Ocena značajnosti modela 2 –proizvodnja egzoglukanaza .....	117

6.4.1.2. Uticaj procesnih promenljivih na CMC-aznu i Avicelaznu aktivnost .....	118
6.4.1.3. Validacija modela .....	122
<b>6.4.2. Optimizacija procesa proizvodnje <math>\beta</math>-amilaza na otpadnoj vodi iz industrije prerade kartonske ambalaže .....</b>	<b>123</b>
6.4.2.1. Ocena značajnosti modela .....	123
6.4.2.2. Uticaj procesnih promenljivih na proizvodnju $\beta$ -amilaza .....	126
6.4.2.3. Validacija modela .....	131
<b>6.4.3. Optimizacija procesa proizvodnje <math>\beta</math>-amilaza na melasi i repinom rezancu ....</b>	<b>131</b>
6.4.3.1. Ocena značajnosti modela .....	131
6.4.3.2. Uticaj procesnih promenljivih na proizvodnju $\beta$ -amilaza .....	134
6.4.3.3. Validacija modela .....	137
<b>6.5. Karakterizacija celulaza .....</b>	<b>139</b>
<b>6.5.1. Određivanje optimalne temperature i optimalnog pH celulaza .....</b>	<b>139</b>
<b>6.5.2. Uticaj metalnih jona i EDTA na aktivnost sirovih egzoglukanaza .....</b>	<b>142</b>
<b>6.5.3. Temperaturna stabilnost i uticaj jona i EDTA na temperaturnu stabilnost ...</b>	<b>142</b>
<b>6.5.4. Proizvodi hidrolize celuloze .....</b>	<b>144</b>
<b>6.5.5. Elektroforetska i zimogramska analiza celulazne aktivnosti .....</b>	<b>144</b>
<b>6.6. Karakterizacija amilaza .....</b>	<b>146</b>
<b>6.6.1. Određivanje optimalne temperature i optimalnog pH amilaza .....</b>	<b>146</b>
<b>6.6.2. Uticaj metalnih jona i površinski aktivnih materijana na aktivnost <math>\beta</math>-amilaza ....</b>	<b>147</b>
<b>6.6.3. Proizvodi hidrolize skroba .....</b>	<b>148</b>
<b>6.7. Primena celulaza i amilaza- hidroliza pamučnog materijala i ječmenih mekinja .....</b>	<b>149</b>
<b>ZAKLJUČAK .....</b>	<b>153</b>
<b>LITERATURA .....</b>	<b>157</b>
<b>PRILOG 1 .....</b>	<b>188</b>
<b>PRILOG 2 .....</b>	<b>190</b>
<b>PRILOG 3 .....</b>	<b>191</b>
<b>PRILOG 4 .....</b>	<b>194</b>
<b>PRILOG 5 .....</b>	<b>195</b>
<b>PRILOG 6 .....</b>	<b>196</b>

<b>BIOGRAFIJA .....</b>	<b>197</b>
-------------------------	------------

## UVOD

Agroindustrijski otpad širom sveta predstavlja obnovljive resurse (sirovine) koji se akumuliraju tokom cele godine. Nastale količine mogu biti značajne, a najnepogodniji način njihovog daljeg zbrinjavanja je odlaganje u vidu otpada. Pored stvaranja ekoloških problema i zagađenja životne sredine, odlaganje agroindustrijskih sporednih proizvoda u vidu otpada je i najmanje ekonomično, jer veliki deo i dalje poseduje određenu finansijsku vrednost. Zbog toga se uveliko istražuju mogućnosti revalorizacije različitim postupcima prerade agroindustrijskog otpada. Tokom poslednjih decenija, sve više pažnje se poklanja biokonverziji otpadnih sirovina pomoću mikroorganizama i dobijanju biotehnoških vrednih proizvoda iz istih.

Većinu agroindustrijskog otpada čini lignocelulozni materijal odnosno lignocelulozna biomasa bogata celulozom. Lignocelulozna biomasa predstavlja prirodni obnovljivi resurs za proizvodnju biogoriva i drugih biološki vrednih proizvoda zato što je lako dostupna, jeftina, a proizvodnja je ekološki opravdana. Lignocelulozna biomasa obuhvata poljoprivredni otpad uključujući različite žitarice, lišće, slamu, stabljike kukuruza, rezance šećerne repe, trsku, pirinčanu ljusku i slično. Takođe, otpaci drveta, piljevinai drugi šumski otpad mogu poslužiti kao izvor lignocelulozne biomase (Anwar et al., 2014; Mussatto et al., 2012; Pérez et al., 2002).

Biokonverzija lignocelulozne biomase do bioetanola (biogoriva) zahteva primenu biokatalizatora, koji mogu efikasno raditi na visokim temperaturama i niskim pH vrednostima. Enzimi celulaze predstavljaju biokatalizatore koji hidrolizuju celulozu iz lignocelulozne biomase do fermentabilnih šećera koji se dalje koriste za proizvodnju bioetanola. Celulaze obuhvataju najmanje tri grupe enzima: endoglukanaze, egzoglukanaze i  $\beta$ -glukozidaze, čijim sinergističkim delovanjem se oslobađa glukoza kao glavni proizvod hidrolize celuloze (Anwar et al., 2014; Asgher et al., 2013; Assareh et al., 2012).

Celulaze mogu imati višestruku primenu u različitim industrijama: poljoprivrednoj, prehrambenoj, industriji deterdženata, prepade pulpe i papira, tekstilnoj industriji, u biorafinerijama za proizvodnju bioetanola (Kuhad et al., 2011; Sukumaran et al., 2005). S obzirom da životinje ne sintetišu enzim celulazu, a ishrana



im se bazira na celuloznoj hrani, jedna od najvažnijih primena celulaza je u industriji stočne hrane.

Pored celuloze, poljoprivredni otpad, a i neke vrste industrijskog otpada (otpadne vode) sadrže i skrob, čijom razradnjom pomoću enzima amilaza nastaju vredni proizvodi: glukoza, maltoza i malto-oligosaharidi (Van Der Maarel et al., 2002; Yang, 2011). Amilaze se mogu podeliti u dve osnovne kategorije, endoamilaze ( $\alpha$ -amilaze) i egzoamilaze (glukoamilaze i  $\beta$ -amilaze) (Gupta et al., 2003; Van Der Maarel et al., 2002).

Amilaze se najviše koriste u preradi skroba do maltoze i maltoznih sirupa, u tekstilnoj industriji, u industriji deterdženata i proizvodnji bioetanol (Gupta et al., 2003; Mitidieri et al., 2006; Souza, 2010). Enzimi celulaze mogu biti različitog porekla – biljnog i mikrobnog, dok amilazemogu biti biljnog, životinjskog ili mikrobnog. Međutim, najznačajniji su mikrobnog postupci proizvodnje celulaza i amilaza, zbog jednostavnosti procesa fermentacije, velike brzine rasta i razmnožavanja mikroorganizama, visoke aktivnosti i stabilnosti dobijenih enzima. Takođe, korišćenje različitih mikroorganizama, kao producentata enzima, omogućava da se odabere proizvodni mikroorganizam koji će proizvoditi enzim tačno određenih karakteristika za datu primenu.

Većinu ekstracelularnih celulaza proizvode plesni (fungi) i bakterije, uglavnom iz grupe bacilusa i aktinomiceta. Najviše proučavane su fungalne celulaze (Chaabouni et al., 1995; Hayashida et al., 1988; Ong et al., 2004; Sukumaran et al., 2005; Van Den Broeck et al., 2001). Izolacija, skrining i selekcija novih potentnih celulolitičkih sojeva je omogućila otkrivanje nekoliko novih celulolitičkih mikroorganizama (bakterija) izolovanih iz različitih prirodnih staništa. Nove bakterije producenti celulaza pripadaju *Paenibacillus* spp., *Bacillus* spp., *Geobacillus* spp., *Brevibacillus* spp. (Chaabouni et al., 1995; Hayashida et al., 1988; Ong et al., 2004; Sukumaran et al., 2005; Van Den Broeck et al., 2001).

Za komercijalnu proizvodnju amilaza koriste se uglavnom sojevi *Aspegillus* sp., iz grupe plesni i *Bacillus* sp., iz grupe bakterija (Pandey et al., 2000a). Kod amilaza mikrobnog porekla, treba posebno izdvojiti proizvodnju  $\beta$ -amilaza zato što mikroorganizmi uglavnom proizvode  $\alpha$ -amilaze dok manji broj proizvodi i  $\beta$ -amilaze.  $\beta$ -Amilaze su posebno interesantne jer se njihovim delovanjem na skrob (hidroliza

skroba) oslobađa maltoza koja predstavlja vredan biotehnološki proizvod sapsrimenomu prehrambenoj industriji.

*Paenibacillus* je novi rod sporogenih bakterija, izdvojenih iz roda *Bacillus*. Vrste ovog roda se karakterišu proizvodnjom različitih vrsta enzima (Aguilera et al., 2001; De Vos et al., 2009; Mavingui & Heulin, 1994; Sakiyama et al., 2001). Poslednjih decenija, izolovane su različite vrste roda *Paenibacillus* iz različitih prirodnih staništa (Jami Al Ahmadi et al., 2008; Kumar et al., 2012; Mihajlovski et al., 2015a; Pakdeedachakiat et al., 2008; Waeonukul et al., 2009; Wang et al., 2008). Skriningom je utvrđeno da većina izolovanih *Paenibacillus* vrsta proizvodi različite vrste celulaza (endoglukanaze i egzoglukanaze), ksilanaze, hitinaze, proteaze i druge. Proizvodnja amilaza je zabeležena kod *P.amyloliquefaciens* (Hameed et al., 2012), dok prirodni izolat *P.chitinolyticus* CKS1, pored različitih celulaza proizvodi i  $\beta$ -amilaze.

Da bi se smanjili troškovi proizvodnje enzima, poslednjih godina se u svetu koriste jeftine i obnovljive sirovine za proizvodnju različitih enzima. To su uglavnom sirovine poljoprivrednog porekla, sporedni proizvodi iz različitih industrija, ali i otpadne vode iz industrijskih postrojenja. Pored toga, sve se više ispituju različiti fermentacioni postupci u cilju povećanja produktivnosti enzima i bolje isplativosti celokupnog procesa.

U ovoj doktorskoj disertaciji je ispitana mogućnost proizvodnje enzima iz grupe celulaza i amilaza na različitim otpadnim sirovinama pomoću novog bakterijskog izolata *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1. U prvom delu istraživanja je prikazan postupak izolovanja i identifikacije novog soja CKS1 na osnovu morfoloških i biohemijskih karakteristika kao i sekvence 16S rRNK gena. Nakon identifikacije, izvršena je optimizacija sastava hranljivih podloga, koje sadrže otpadne sirovine i uslova gajenja mikroorganizma u cilju poboljšanja proizvodnje enzima celulaza i amilaza. Radi bolje preglednosti doktorske disertacije, prvo je prikazana proizvodnja enzima celulaza na komercijalnim tečnim supstratima i otpadnim sirovinama, optimizacija procesa fermentacije, karakterizacija enzima kao i prečišćavanje i izolovanje enzima celulaza. U okviru ovog istraživanja, praćena je aktivnost endoglukanaza (označenih kao karboksimetil celulazna aktivnost, CMC-azna aktivnost) i egzoglukanaza (označenih kao Avicelazna aktivnost). Zbog svoje karakterističnosti i visoke aktivnosti, egzoglukanaze su detaljno okarakterisane prilikom rasta soja CKS1

na otpadnoj sirovini. Takođe, ispitana je temperaturna stabilnost i pH aktivnost enzima egzoglukanaza kao i uticaj metalnih jona na aktivnost enzima. Proizvodi hidrolize celuloze su kvantifikovani tečnom hromatografijom visokih performansi. Takođe, celulaze iz otpadnih sirovina su prečišćene (jonoizmenjivačka hromatografija).

Ispitana je i mogućnost proizvodnje celulaza fermentacijom na čvrstom supstratu. Praćena je CMC-azna i Avicelazna aktivnost tokom fermentacije sojem *P.chitinolyticus* CKS1 na repinom rezancu kao čvrstom supstratu. Optimizovani su osnovni parametri procesa fermentacije u cilju postizanja maksimalne proizvodnje enzima.

U nastavku istraživanja ispitana je mogućnost korišćenja otpadne vode iz industrije prerade kartona, kao supstrata za proizvodnju enzima amilaza pomoću soja *P.chitinolyticus* CKS1. Prikazana je proizvodnja amilaza uz optimizaciju uslova za proizvodnju  $\beta$ -amilaza. Statistički obrađeni rezultati dali su uvid u pojedinačne i međusobne uticaje faktora na aktivnost i proizvodnju  $\beta$ -amilaza. Pored toga, ispitana je zavisnost aktivnosti  $\beta$ -amilaza od pH i temperature, kao i uticaj različitih metalnih jona, a tečna hromatografija visokih performansi je korišćena za identifikaciju produkta hidrolize skroba pomoću  $\beta$ -amilaza.

U sledećem koraku istraživanja, repin rezanac i melasa su korišćeni kao otpadne sirovine za proizvodnju  $\beta$ -amilaza. Skenirajuća elektronska mikroskopija je pružila informacije koje potvrđuju imobilizaciju ćelija *P.chitinolyticus* CKS1 na repinom rezancu, do koje dolazi tokom fermentacije, a za posledicu ima visoku aktivnost  $\beta$ -amilaza. Takođe, maltoza koja nastaje kao krajnji proizvod hidrolize skroba kvantifikovana je tečnom hromatografijom visokih performansi.

Poslednji korak istraživanja se odnosi na ispitivanje mogućnosti primenljivosti celulaza i amilaza, koje proizvodi soj *P.chitinolyticus* CKS1, u postupcima hidrolize pamučnih materijala i ječmenih mekinja, pojedinačno.

## TEORIJSKI DEO

### 1. AGRO-INDUSTRIJSKI I INDUSTRIJSKI OTPAD

Velike količine otpada nastaju svake godine prilikom industrijske prerade poljoprivrednih sirovina. Većina ovog otpada se koristi kao hrana za životinje ili se spaljuje, kako bise smanjile njegove količine. Ovakav otpad uglavnom ima visok sadržaj šećera, vlakana, minerala i proteina, i stoga se nemože smatrati “otpadom” već sirovim materijalom, koji se može upotrebiti u daljoj industrijskoj proizvodnji. Agro-industrijski otpad nastaje tokom industrijske proizvodnje poljoprivrednih ili čak životinjskih proizvoda. Otpad koji potiče od poljoprivrednih sirovina uključuje: slamu, stabljike biljaka, lišće, ljuske, kore, pulpu, oštećene mahunarke ili žitarice (pšenicu, pirinač, kukuruz, ječam, šećernu repu, šećernu trsku...), zrna otpadne kafe itd. Ove otpadne sirovine nastaju u velikim količinama tokom cele godine i predstavljaju najzastupljenije obnovljive izvore na Zemlji. Zbog svoje lake dostupnosti i bogatog sastava, postoji veliko interesovanje za ponovnu upotrebu ovih tipova otpada, kako sa ekonomske tako i sa ekološke strane (Anwar et al., 2014; Pérez et al., 2002). Ekonomski aspekt primene ovakvog tipa otpada zasniva se na činjenici da se otpad može koristiti kao jeftina polazna sirovina za proizvodnju drugih vrednih proizvoda sa očekivanim smanjenim troškovima proizvodnje. Sa ekološke strane, primena ovakvog otpada je takođe veoma opravdana, jer većina agro-industrijskog otpada sadži fenole ili druga toksična jedinjenja koja nastaju tokom njihove biorazgradnje, a koja mogu dovesti do zagađenja životne sredine ako bi se takav otpad ispuštao u prirodu.

## **1.1. Biotehnološki vredne komponente agro-industrijskog otpada- lignocelulozna biomasa, nus proizvodi iz industrije prerade šećerne repe i otpadne vode iz industrija prerade različitih sirovina**

Veći deo agro-industrijskog otpada se sastoji od hemiceluloze, celuloze i lignina, pa se ovakav tip otpada naziva i lignocelulozni otpadni materijal, lignocelulozna biomasa ili samo lignocelulozni otpad (Mussatto et al., 2012). Takođe, jedan deo agro-industrijskog otpada sadrži skrob i šećere kao glavni izvor ugljenih hidrata (Yang, 2011).

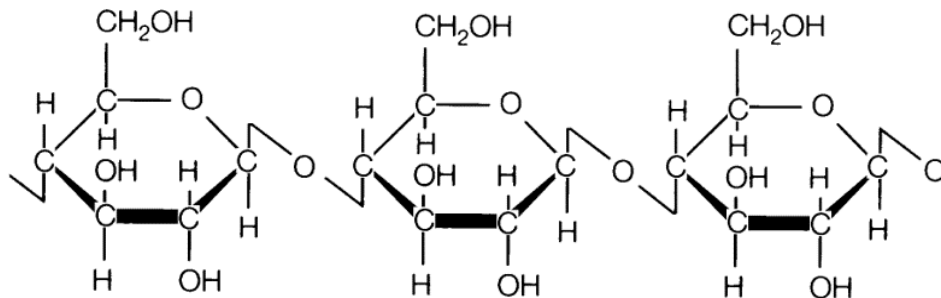
### ***1.1.1. Celuloza***

Celuloza je najrasprostranjeniji prirodni polisaharid koji ima veliku mogućnost korišćenja, prevashodno kao obnovljivi izvor ugljenih hidrata, za proizvodnju bioloških proizvoda i bioenergije (Rubin, 2008).

Celuloza je glavna komponenta ćelijskog zida viših biljaka (Feng et al., 2009); to je najčešći organski polimer koji obuhvata  $1,5 \times 10^{12}$  tona celokupne godišnje proizvodnje biomase tokom procesa fotosinteze i smatra se neiscrpnim izvorom sirovog materijala za proizvodnju različitih proizvoda (Sukumaran et al., 2005; Zhang & Lynd, 2004).

Celuloza je linearni polimer koji se sastoji od jedinica D-glukoze međusobno povezanih  $\beta$ -1,4-glikozidnim vezama sa stepenom polimerizacije (DP) od 100-20,000 (Heinze & Liebert, 2001; Zhang et al., 2006; Zhang & Lynd, 2004) (slika 1.1.). Jedinica koja se ponavlja u molekulu celuloze je anhidro celobioza. Važna karakteristika celuloze, je da celulozni lanci mogu da budu u paralelnom položaju i povezani mnogobrojnim vodoničnim vezama i van der Valsovim silama, što čini tzv. kristalne regione koji daju kompaktnost celulozi i osnovni su razlog njene biološke funkcije strukturnog polimera (Zhang & Lynd, 2004; Zhabankov, 1992). Kristalni delovi celuloze su međusobno isprepletani sa amorfnim regionima. Molekul celuloze je veoma stabilan, sa vremenom polu-života od nekoliko miliona godina za spontano kidanje  $\beta$ -glikozidnih veza na sobnoj temperaturi, što ukazuje da se u prirodi celokupna

degradacija (hidroliza) celuloze odvija pod dejstvom enzima (Wolfenden & Snider, 2001; Zhang et al., 2006).



Slika 1.1. Šematski prikaz celuloze

(<http://www.rsc.org/Education/Teachers/Resources/cfb/carbohydrates.htm>)

Obećavajuća strategija za efikasno korišćenje ovog obnovljivog prirodnog resursa je mikrobna hidroliza lignoceluloznog otpada i fermentacija nastalih redukujućih šećera za proizvodnju željenih metabolita i biogoriva. Prirodno, celulozni molekuli egzistiraju u obliku zavežljaja ili snopa koji su međusobno povezani u obliku mikrofibrila sa kristalnim i amorfnim regionima (Anwar et al., 2014; Iqbal et al., 2013; Lynd et al., 2002). Stepem kristalnosti celuloze je promenljiv i dovodi do pojma “bočnog rasporeda kristalnosti” koji prikazuje celulozna vlakna u statističkom smislu kao kontinuum sastavljen od čisto kristalne do čisto amorfne strukture, sa svim stepenima rasporeda između (Lynd et al., 2002; Marchessault & Howsmon, 1957).

Pored kristalnih i amorfnih regiona, celulozna vlakna sadrže različite vrste nepravilnosti kao što su uvijanja na mikrofibrilima, razne mikropore i kapilari. Celokupna površina celuloznih vlakana je mnogo veća u poređenju sa površinom idealno glatkih vlakana istih dimenzija (Lynd et al., 2002).

Prečišćenost celuloze, koja se koristi za mikrobnu hidrolizu, varira u svojoj finoj strukturi, a izbor takvog supstrata nesumnjivo utiče na dobijene rezultate. Mikrokrystalna celuloza (na primer, Avicel i Sigmacell) su vrlo čiste celuloze i blagi kiselinski tretman koji se koristi za njihovo dobijanje uklanja hemicelulozu i velike delove amorfnih regiona celuloznih vlakana. Promenljiva struktura, kompleksnost čiste celuloze i otežavajući rad sa nerastvornim supstratima vodio je ka sve većoj upotrebi visoko rastvornog derivata amorfne celuloze, karboksimetil celuloze (CMC), kao susprata za proučavanje celulaza (endoglukanaza). Korišćenje celulozne biomase je

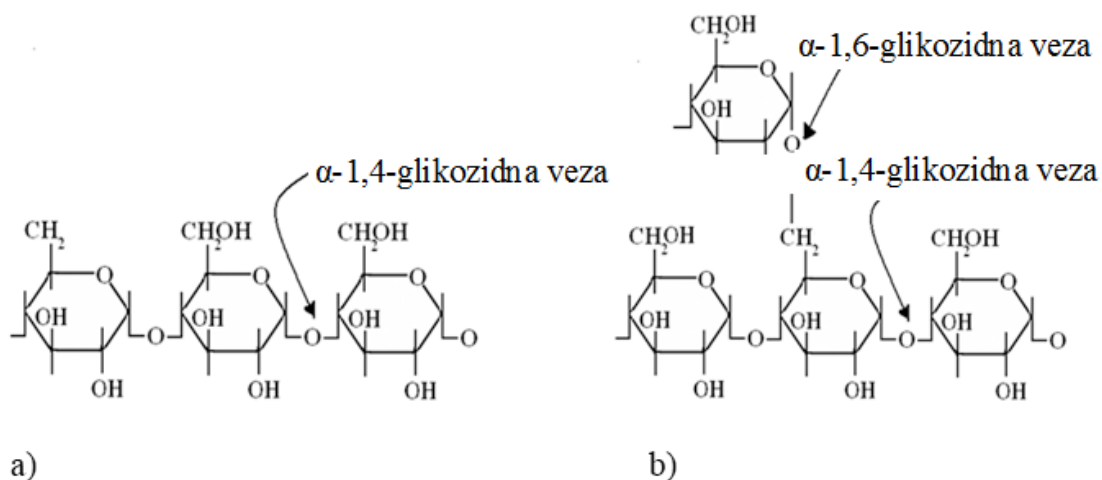
mnogo kompleksnije od korišćenja čiste celuloze, ne samo zbog složenog sastava i prisustva hemiceluloze i lignina već i zbog različite arhitekture samih biljnih ćelija (Lynd et al., 2002).

### **1.1.2. Skrob**

Skrob je glavni rezervni polisaharid kod većine žitarica kao što su pšenica, pirinač, kukuruz, krompir i tapioka (Van Der Maarel et al., 2002). Osnovna jedinica građe skroba je D-glukoza, čiji su ostaci međusobno povezani glikozidnim vezama. Skrob je nehomogenog sastava i može se razdvojiti na dve frakcije: amilozu i amilopektin. Sadržaj amiloze varira u zavisnosti od vrste skroba ali je prilično ustaljen za svaku botaničku vrstu. U najvećem broju slučajeva, sadržaj amiloze u skrobu kreće se u granicama od 15 do 30%, mada su poznati slučajevi kada ovaj sadržaj znatno odstupa od navedenih vrednosti (Knežević-Jugović, 1998).

Amiloza je linearna komponenta skroba koja sadrži 100-2000 ostataka D-glukoze u piranoznom obliku, koji su međusobno povezani  $\alpha$ -1,4-glikozidnom vezom (slika 1.2.a). Na jednom kraju lineranog lanca nalazi se slobodna C1 hidroksilna grupa zbog čega se taj kraj naziva redukujući kraj (Knežević-Jugović, 1998). Broj glukoznih ostataka koji se označava stepenom polimerizacije (DP) se razlikuje u zavisnosti od porekla skroba. Tako na primer, amiloza iz krompira ili iz tapioka skroba ima DP 1000-6000, dok amiloza iz pšenice ima DP 200-1200. Prosečan sadržaj amiloze u skrobu iznosi 0-75% dok je tipična vrednost 20-25% (Van Der Maarel et al., 2002).

Za razliku od amiloze, amilopektin je veoma razgranat molekul, pri čemu je razgranatost i veličina makromolekula specifična za pojedinu vrstu skroba. Generalno, reč je o makromolekulima koji su znatno veći od molekula amiloze i sastoje se od 6000 do 37000 ostataka glukoze. U molekulu amilopektina, ostaci D-glukoze su povezani  $\alpha$ -1,4-glikozidnim vezama i  $\alpha$ -1,6-glikozidnim vezama i to na mestima na kojima se molekul grana (slika 1.2.b). Lanac se grana na svakih 25-30 jedinica glukoze pri čemu se od bočnih grana mogu odvajati i sekundarni bočni lanci (Knežević-Jugović, 1998).



Slika 1.2. Šematski prilaz skroba: a) amiloza i b) amilopektin

(<http://usmle.biochemistryformedics.com/action-of-alpha-amylase-on-starch/>)

## 1.2. Tipovi agro-industrijskog otpada

Veći deo agro-industrijskog otpada čini lignocelulozna biomasa (Mussatto et al., 2012). Drugi deo otpada se može označiti kao industrijski otpad koji sadrži otpadne vode iz različitih industrijskih postrojenja kao i druge sporedne proizvode iz industrijske prerade različitih biljnih sirovina.

### 1.2.1. Lignocelulozna biomasa

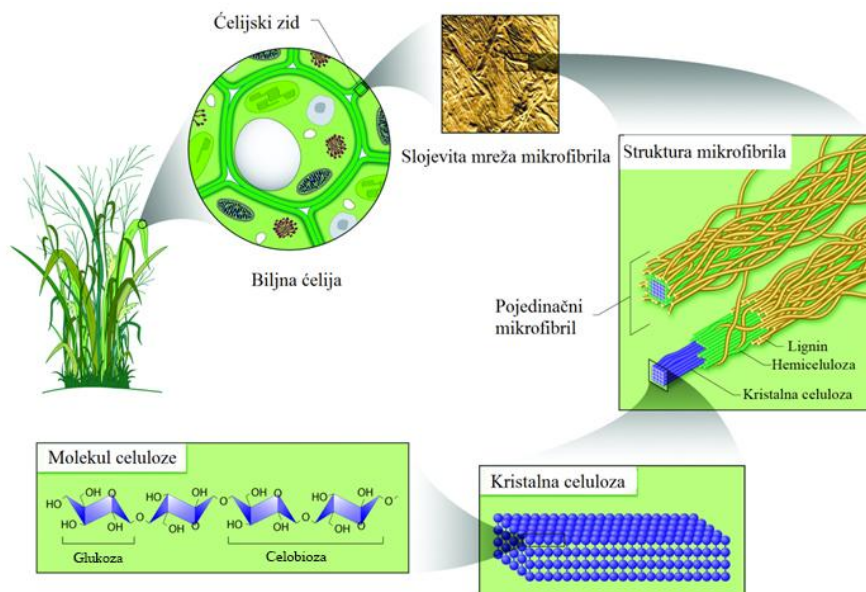
Imajući u vidu rast cena sirove nafte, zbog sve veće tražnje, potreba za alternativnim izvorima energije sve više raste. Među potencijalnim alternativnim sirovinama, lignocelulozni materijali predstavljaju primarni izvor biogoriva i ostalih vrednih sekundarnih proizvoda. Lignocelulozna biomasa je posebno korisna za proizvodnju bioenergenata zbog svoje lake dostupnosti, niske cene i neškodljivosti (Anwar et al., 2014; Lynd et al., 2005). Da bi se zadovoljili zahtevi što ekonomičnije industrijske proizvodnje, sve više se koriste jeftini izvori ugljenika kojih ima u lignoceluloznoj biomasi (Pervez et al., 2014). Lignocelulozni materijali, uključujući poljoprivredni, industrijski i šumski otpad predstavljaju većinu ukupne biomase prisutne u svetu (Kumar et al., 2008). Dostupne celulozne sirovine iz poljoprivrednih i



drugih izvora obuhvataju količinu od 180 miliona tona godišnje (Demain et al., 2005; Kumar et al., 2008). Troškovi proizvodnje različitih produkata fermentacije (šećeri, organske kiseline, lepak, rastvarači...) direktno zavise od cene sirovih korišćenih materijala, pa su lignocelulozne sirovine i dalje vrlo atraktivan izvor ugljenika. Prema proceni Organizacije za hranu i poljoprivredu ujedinjenih nacija (Food and Agriculture Organization - FAO, poljoprivrednog, odnosno, lignoceluloznog otpada ima u izobilju (FAOSTAT, 2006; Kumar et al., 2008). Godišnje se na svetu proizvede oko  $2,9 \times 10^3$  miliona tona lignoceluloznog otpada iz žitaričnih useva,  $1,4 \times 10^1$  miliona tona iz semena uljarica i  $5,4 \times 10^2$  miliona tona iz plantažnih useva (Rajaram & Varma, 1990). Raliti tipovi lignoceluloznih otpadnih sirovina (trava, pirinač, kukuruz...) sadrže različiti sastav celuloznih komponenti. Procenjeno je da je godišnja proizvodnja celulozne biomase  $1,5 \times 10^{12}$  tona što čini lignoceluloznu biomasu neiscrpnim izvorom sirovina za ekološku i biokompatibilnu proizvodnju (Kim et al., 2006). Iz tog razloga, biokonverzija velikih količina lignocelulozne biomase u fermentabilne šećere ima potencijalnu primenu u proizvodnjibioenergenata(Kumar et al., 2008).

Lignocelulozni materijali su obećavajuće sirovine, kao prirodni i obnovljivi izvori, neophodni za funkcionisanje modernog industrijskog društva. Velike količine lignocelulozne biomase se mogu potencijalno iskoristiti i pretvoriti u različite vredne proizvode, uključujući biogoriva, ili se mogu koristiti kao jeftin izvor energije za mikrobne fermentacije i proizvodnju enzima (Anwar et al., 2014; Asgher et al., 2013). Poslednjih godina povećan je interes za korišćenje poljoprivrednog lignoceluloznog otpada kao jeftine sirovine za proizvodnju enzima celulaza (Assareh et al., 2012).

Lignocelulozna biomasa se sastoji od tri glavne jedinice: celuloze, hemiceluloze i lignina. Tipično, većina poljoprivredne lignocelulozne biomase se sastoji od 10-25% lignina, 20-30%hemiceluloze i 40-50 % celuloze (Anwar et al., 2014) (slika 1.3.).



Slika 1.3. Sastav ćelijskog zida lignocelulozne biomase  
(Buckeridge & Goldman, 2011; Quiroz-Castañeda & Folch-Mallo, 2013)

Sadržaj celuloze, hemiceluloze i lignina je različit kod lignoceluloznih sirovina što zavisi od porekla same lignocelulozne biomase. Prosečni sadržaj glavnih komponenti u nekim lignoceluloznim otpadnim sirovinama dat je u tabeli 1.1.

Tabela 1.1. Glavne komponente nekih lignoceluloznih tipova otpada

Lignocelulozni otpad	Celuloza (%)	Hemiceluloza (%)	Lignin (%)
Ječmena slama	33,8	21,9	13,8
Kukuruzni klip	33,7	31,9	6,1
Kukuruzna stabljika	35,0	16,8	7,0
Pamučna stabljika	58,5	14,4	21,5
Ovsena slama	39,4	27,1	17,5
Pirinčana slama	36,2	19,0	9,9
Ražana slama	37,6	30,5	19,0
Sojina stabljika	34,5	24,8	19,8
Šećerna trska	40,0	27,0	10,0
Suncokretova stabljika	42,1	29,7	13,4
Pšenična stabljika	32,9	24,0	8,9
Pulpa šećerne repe (repin rezanac) (Sun & Hughes, 1998).	22-24	30	15-25

### 1.2.1.2. Primeri otpadne lignocelulozne biomase-izluženi repin rezanac, otpadno bilje i ječmene mekinje

Šećerna repa predstavlja važnu sirovinu koja se koristi za proizvodnju šećera (Šušić S., 1965). Izluženi repin rezanac je otpadni proizvod koji nastaje u velikim količinama tokom proizvodnje šećera (Šušić S., 1965; Šušić S., 1995; Šušić S., 1994). Izlužen repin rezanac je jeftina sirovina koja se uglavnom koristi kao stočna hrana (Kracher et al., 2014; Olmos & Hansen, 2012). Sastoji se od polisaharida, (računato na suhu materiju), i to 22-24% celuloze, 30% hemiceluloze i 15-25% pektina (Sun & Hughes, 1998). Repin rezanac predstavlja lignoceluloznu otpadnu sirovinu, bogatu ugljenim hidratima stoga se sve više koristi za proizvodnju različitih enzima (Olsson et al., 2003) i obnovljive bioenergije (Rezic et al., 2013).

Velike količine biljne biomase koje zaostaju tokom industrijske prerade poljoprivrednih proizvoda takođe predstavljaju ekonomski i ekološki problem zbog visokih troškova skladištenja. Jedan od takvih primera jeste biljni otpad koji zaostaje nakon alkoholne ekstrakcije lekovitog bilja. Ovakav otpad može da sadrži pojedinačno bilje ili mešavinu različitog bilja. Prvenstveno, zbog visokog sadržaja celuloze, mešavina otpadnog lekovitog bilja koja sadrži delove biljke: nevena (*Calendulae flos*), kamilice (*Chamomillae flos*), matičnjaka (*Melissae folium*), artičoke (*Cynarae folium*), koprive (*Urticae folium*), timjana (*Thymi folium*), hajdučke trave (*Millefolii herba*), divljeg kestena (*Hippocastani semen*), jagorčevine (*Primulae radix*), lincure (*Gentianae radix*) i valerijane (*Valerianae radix*), može se koristiti za proizvodnju enzima celulaza (Mihajlovski et al., 2015a). Takođe, lignocelulozni otpad, koji zaostaje nakon prerade pojedinačnih biljaka citronele (*Cymbopogon winterianus*) i slatkog pelina (*Artemisia annua*) služi kao dobar supstrat za proizvodnju celulaza (Chandra et al., 2009). U literaturi je zabeležena uspešna primena otpadnog rastavića (*Equisetum arvense*) i hajdučke trave (*Achillea millefolium*) za ekstrakciju antioksidanasa (Milutinović et al., 2015; Milutinović et al., 2014).

Ječam je žitarica koja se prvenstveno koristi u prehrambenoj i stočnoj industriji. Ječmene mekinje predstavljaju spoljni deo semena ječma i sastoje se od celuloze, hemiceluloze i lignina. Prilikom procesa proizvodnje mekinja, jedan deo unutrašnjeg dela zrna zaostaje na mekinjama, tako da pored osnovnih navedenih komponenti

ječmene mekinje sadrže i skrob. Ječmena trava, kao lignocelulozna sirovina, se poslednjih godina aktivno koristi za proizvodnju bioetanola pomoću mikroorganizama (Yang, 2015). Prevrelo zrno ječma (eng. *barley spent grains*), kao otpadni proizvod iz industrije piva, sadrži visoku koločinu proteina i vlakana, dugi niz godina se uspešno koristio kao stočna hrana ali i kao supstrat za rast mikroorganizama u procesima proizvodnje različitih enzima (Dehnavi et al., 2011).

### ***1.2.2. Industrijski otpad***

U okviru industrijskog otpada razmatrane su otpadne vode iz prerade različitih sirovina kao i melasa koja nastaje kao sporedni proizvod prilikom industrijske proizvodnje šećera.

#### ***1.2.2.1. Otpadne vode iz industrijskih postrojenja***

Otpadne vode, kao i sam otpad, predstavljaju značajan izvor zagađenja životne sredine. Dosadašnja iskustva srpskih fabrika za izradu transportne ambalaže u očuvanju životne sredine nisu reprezentativna. Netretirana otpadna voda iz fabrike transportne ambalaže ima veliko organsko zagađenje HPK (hemijska potrošnja kiseonika) i BPK (biološka potrošnja kiseonika) i kao takva predstavlja ozbiljan ekološki problem. Ovakva otpadna voda sadrži značajne koncentracije biorazgradljive organske materije, koja se sastoji od ostataka skrobnog lepka koji se koristi u proizvodnji talasastog kartona (Jančić, 2014). Na osnovu ovoga, neophodno je razviti biotehnološki postupak koji će smanjiti zagađenje otpadne vode.

Biotehnološkim tretmanom različitih industrijskih otpadnih voda mogu se dobiti različiti vredni proizvodi (Barros et al., 2008; Hernández et al., 2006) dok se sama voda na taj način prečišćava (Jin et al., 2002).

Zbog sve veće zabrinutosti o zagađenju životne sredine, javila se potreba za novom čistijom industrijskom proizvodnjom koja koristi specifične enzime i tako znatno smanjuju stepen zagađenja (Liu et al., 2013). Danas se celulaze koriste za poboljšanje hidrolize lignocelulozne biomase (Adsul et al., 2014; Culbertson et al.,

2013), proteaze u industriji kože za uklanjanje sitnih dlačica (Abraham et al., 2014) dok lakaze imaju sposobnost uklanjanja boja (Gioia et al., 2014) i smanjenja zagađenja (Liu et al., 2013; Spina et al., 2015).

Otpadne vode, sa visokim sadržajem ugljovodonika, koje se ne mogu prerađivati za životinjsku ili ljudsku upotrebu su posebno pogodne za konverziju u visoko vredne proizvode (Angenent et al., 2004). Korišćenje otpadnih voda kao sirovog materijala za proizvodnju novih proizvoda je ekonomski veoma privlačan postupak (Laufenberg et al., 2003). Neki primeri visoko vrednih proizvoda (biohemikalija) koji se dobijaju tokom procesa fermentacije organske materije u otpadnim vodama su prikazani u tabeli 1.2.

Tabela 1.2. Proizvodnja različitih proizvoda korišćenjem različitih poljoprivrednih i industrijskih otpadnih tokova (voda) pomoću različitih mikroorganizama

Otpadni tok (voda)	Industrija	Proizvod	Funkcija	Mikroorganizam	Referenca
Kukuruz	Prerada kukuruza	Lipaze	Enzim	<i>Galactomyces geotrichum</i>	(Burkert et al., 2004)
Pšenica	Prerada pšenice	Proteaze	Enzim	<i>Mucor spp.</i>	(Tubesha & Al-Delaimy, 2003)
Bezglutenska voda	Prerada pšenice	Glicerol	Rastvarač	<i>Pichia farinosa</i>	(Wang et al., 2002)
Šećerna trska	Šećer	Ksilitol	Zaslađivač	<i>Pichia guilliermondii</i>	(Carvalho et al., 2002)
Obrada skroba	Skrob	Biomasa proteina	Stočna hrana	<i>Rhizopus sp.</i>	(Jin et al., 1999)

Strategije za poboljšanje biokonverzije organske materije iz otpadnih voda su glavni fokus većine istraživača iz ove oblasti. Nizak stepen konverzije je možda i najveći problem i zbog toga se mnogo truda ulaže u povećanje količine proizvoda koji nastaje (Angenent et al., 2004). Glavni pristupi koji vode ka ostvarenju ovog cilja su otkrivanje i primena novih mikroorganizama, primena metaboličkog inženjerstva za heterolognu ekspresiju gena, manipulacija ćelijskih genoma i kontrola tokova ugljenika dodavanjem supstrata ili inhibitora (Aldor & Keasling, 2003; Angenent et al., 2004; Bramucci & Nagarajan, 2000). Biokonverzije se takođe mogu poboljšati modifikacijom određenih procesa, kao što je imobilizacija ćelija mikroorganizama (Carvalho et al.,

2002). Druga obećavajuća strategija je korišćenje ko-kultura u procesu fermentacije. U okviru ove strategije jedna vrsta mikroorganizama najčešće izvodi proces hidrolize i stvara sporedne metaboličke produkte za drugu vrstu koja potom formira željeni proizvod (Collet et al., 2003). Takođe, druga potencijalna prednost korišćena ko-kultura jeste da one mogu biti manje osetljive nego pojedinačne kulture na promene sastava industrijskih i poljoprivrednih otpadnih voda (npr. otpadna voda može sadržati višestruke organske materije čiji se sastav može menjati na dnevnom nivou)(Angenent et al., 2004).

#### *1.2.2.2. Melasa*

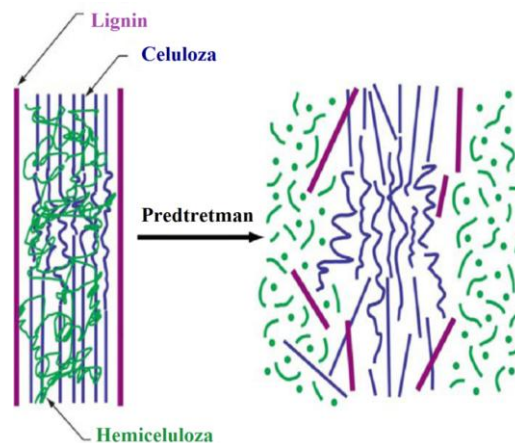
Melasa nastaje kao nusproizvod pri proizvodnji rafinisanog šećera iz šećerne repe ili iz šećerne trske. Melasa je sirup, gusta tečnost, tamnosmeđe boje, svojstvenog mirisa i slatkog ukusa. Ima visok sadržaj suve materije (oko 80%) i sadrži, u proseku, oko 51% saharoze, 1% rafinoze, 0,25% glukoze i fruktoze, 5% belančevina, 6% betaina, 1,5% nukleozida, purinskih i pirimidinskih baza, organske kiseline i pektine. Pored navedenih sastojaka, melasa šećerne repe predstavlja značajan izvor brojnih mikronutritijenata (vitamina i minerala), naročito kalijuma, kalcijuma, natrijuma i magnezijuma. Melasa sadrži i vitamine grupe B, a ne sadrži masti i vlaknaste materije (Koprivica et al., 2009). S obzirom da predstavlja jeftinu sirovinu koristi se kao dodatak u industriji stočne hrane. Melasa koja nastaje prilikom proizvodnje šećera iz šećerne repe sadrži do 54% šećera (Šušić S., 1995) i kao takva može se direktno, bez prethodnih modifikacija, koristiti u procesima mikrobne fermentacije (Vučurović & Razmovski, 2012a). Srbija raspolaže sa značajnim viškovima šećerne repe i 2011. godine izvoz melase je iznosio 59,655 tona (Mojović et al., 2011) što takođe ukazuje na mogućnost iskorišćenja melase kao supstrata za mikrobne fermentacije. Takođe, zbog visokog sadržaja šećera melasa se koristi i kao medijum za fermentaciju i proizvodnju enzima (Sharan & Darmwal, 2007) i bioetanolu (Vučurović & Razmovski, 2012b).

## 1.3. Tehnološki postupci za iskorišćenje otpada

### 1.3.1. Lignocelulozni predtretman

U cilju postizanja što bolje konverzije lignocelulozne biomase u fermentabilne šećere, nekada je potrebno izvršiti predtretman sirovine. Nakon završenog predtretmana odigrava se enzimska hidroliza lignocelulozne sirovine (Buckeridge & Goldman, 2011; Jørgensen et al., 2007).

Iako predtretman može da se izvrši na različite načine, njegov glavni cilj je da se uklone hemiceluloza i lignin, da se povećaju pore i celokupna površina sirovine i da se smanji stepen polimerizacije i kristalnost celuloze (Slika 1.4.). Ovakvim pristupom se povećava enzimska raspoloživost odnosno enzimsko iskorišćenje predtretirane sirovine i povećava se prinos fermentabilnih šećera (Buckeridge & Goldman, 2011; Mosier et al., 1999; Zhang & Lynd, 2004).



Slika 1.4. Predtretman lignoceluloznog materijala (Bhatia et al., 2012)

Idealno, predtretman treba da: (1) poveća (dovede do maksimuma) enzimsku raspoloživost predtretirane sirovine; (2) minimizira gubitak šećera; (3) optimizuje stvaranje sporednih nusproizvoda; (4) minimizira troškove i; (5) bude efikasan na više različitih sirovina (Buckeridge & Goldman, 2011).

S obzirom da je ćelijski zid biljaka nepropusan za velike molekule, uključujući proteine kao što su enzimi celulaze, pretpostavlja se da je za efikasnu enzimsku saharifikaciju celuloze neophodna primena hemikalija (kiselina ili baza) koje će omogućiti rastvaranje hemiceluloze i lignina i samim tim povećati poroznost matriksa.

Fizički predtretmani koji uključuje mlevenje sirovine, primenu pritiska, temperature i pare, mogu se koristiti za povećanje slobodne površine i smanjenja kristalnosti celuloze i na taj način mogu favorizovati enzimsku saharifikaciju. Takođe, sve više se koristi mikrotalasno zračenje zbog jednostavne toplotne primene i lakog upravljanja procesom. Mikrotalasno zračenje menja strukturu celuloze, degradira lignin i hemicelulozu u lignocelulozne materijale i povećava stepen enzimskog iskorišćenja lignoceluloznog materijala (Binod et al., 2010).

Za hemijski predtretman lignoceluloznih sirovina neophodno je korišćenje razblaženih kiselina i/ili baza. Hidroliza hemiceluloze razblaženim rastvorima kiseline pri visokim temperaturama, praćena trenutnom dekompresijom (eksplozijom) je jedna od vodećih primenjivanih tehnika (Buckeridge & Goldman, 2011). Ovakav vid predtretmana je široko primenjivan u laboratorijskim istraživanjima, uspešno testiran u pilot postrojenjima sa potencijalnom primenom u industrijskoj proizvodnji (Jørgensen et al., 2007). Tokom kiselinske hidrolize razblaženom kiselinom, lignocelulozni materijal (sirovina) se meša sa vodenim rastvorom kiseline ( $H_2SO_4$ , uglavnom), zagreva do željene temperature i nakon određenog perioda vremena hladi do sobne temperature. Uklanjanjem hemiceluloze povećavaju se pore i celokupna površina predtretiranog materijala, omogućavajući bolju pristupačnost enzimima (Buckeridge & Goldman, 2011). Treba napomenuti da tretman razblaženom kiselinom predominantno utiče na hemicelulozu dok delovi lignina ostaju netaknuti pa je prinos šećera još uvek nije optimalan (Binod et al., 2010).

Bazni predtretman uključuje primenu razblaženih rastvora baza NaOH ili KOH, koji uklanjaju lignin i delove hemiceluloze i efikasno povećavaju pristup enzimima do celuloze. Bazni tretman se izvodi na niskim temperaturama nekoliko sati. Poređenjem sa kiselinskim tretmanom, bazni tretman je nešto efikasniji u razbijanju estarskih veza između lignina, hemiceluloze i celuloze izbegavajući fragmentaciju hemiceluloznih polimera (Binod et al., 2010; Gáspár et al., 2007).

Biološki predtretmani sa plesnima i bakterijama mogu izvršiti delimičnu degradaciju lignina i hemiceluloze ali ovakvi tretmani obično daju niske prinose. Stoga, obično se koriste predtretmani kojikombinuju fizičke ili hemijske metode za frakcionisanje lignoceluloznih sirovina (Buckeridge & Goldman, 2011).



Biološki predtretman ima određenih prednosti, a to je smanjena upotreba hemikalija ali dobro kontrolisani, brzi i efikasni sistem biološkog predtretmana nije još u potpunosti razvijen. Hemijski predtretmani imaju niz nedostataka, koji obuhvataju primenu opreme otpornu na koroziju, intenzivno pranje i odlaganje hemijskog otpada. Biološki predtretmani su po pitanju sigurnosti i zaštite životne sredine bezbedniji (Binod et al., 2010).

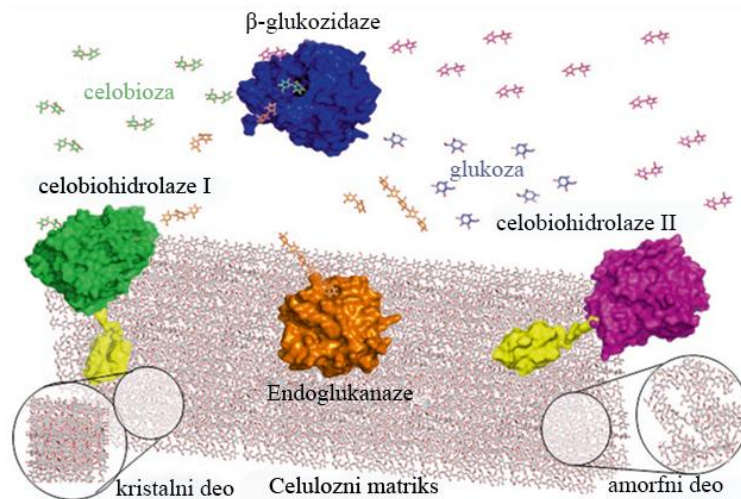
## **2.HIDROLITIČKI ENZIMI KOJI SE MOGU PROIZVODITI NA AGRO- INDUSTRIJSKOM OTPADU – CELULAZE I AMILAZE I MIKROORGANIZMI KAO NJIHOVI PRODUCENTI**

Mnogi enzimi su uključeni u razgradnju različitih polimera, koji predstavljaju lignocelulozni materijal. Predominantni polimer lignocelulozne biomase je celuloza a enzimi koji ga razlažu (hidrolizuju) su celulaze. Pored celuloze, otpadni materijali sadrže polisaharid škrob, a enzimi koji ga razlažu su amilaze.

### **2.1. Celulaze**

Celulaze su multienzimski kompleks koji se sastoji od tri različita enzima: endoglukanaze (endo  $\beta$ -1,4-D glukan glukanohidrolaze, EC 3.2.1.4); egzoglukanaze ili celobiohidrolaze ( $\beta$ -1,4-D-glukan celobiohidrolaze, EC 3.2.1.91) i  $\beta$ -glukozidaze ili celobiazaze ( $\beta$ -D-glukozid glukohidrolaze, EC3.2.1.21). Prva grupa enzimskog celulolitičkog kompleksa endoglukanaze su enzimi koji katalizuju hidrolitičku razgradnju  $\beta$ -1,4-glikozidnih veza na bilo kom mestu u unutrašnjosti molekula celuloze nasumično pri čemu nastaju glukoza, celobioza i celo-oligosaharidi. Ovi enzimi su sposobni da deluju na amorfne delove celuloze, kao i na derivate celuloze (karboksimetil celulozu i hidroksietil celulozu), dok slabo deluju na kristalne delove celuloze. Druga grupa enzima su egzoglukanaze ili celobiohidrolaze i oni katalizuju hidrolitičku razgradnju  $\beta$ -1,4-glikozidnih veza postepeno, počevši od kraja makromolekula. Treba naglasiti da oni mogu efikasno da razgrade kristalne delove celuloze. Treća grupa enzima je poznata kao celobiazaza i ona može da razgradi samo molekule manje molekulske mase kao što su disaharid celobioza i druge rastvorljive oligosaharide do glukoze. Samo one vrste mikroorganizama koje istovremeno proizvode sva tri tipa celulaza mogu efikasno da razgrade celulozu (Knežević-Jugović, 1998).

Enzimi, endoglukanaze, egzoglukanaze i  $\beta$ -glukozidaze deluju sinergistički da bi oslobodili glukozu kao glavni proizvod hidrolize celuloze (slika 2.1.) (Buckeridge & Goldman, 2011; Zhang et al., 2006).



Slika 2.1. Šematski prikaz mehanizma delovanja celulaza na celuloznom matriksu (Buckeridge & Goldman, 2011)

Primarnu hidrolizu, koja se odvija na površini čvrstog supstrata, vrše egzoglukanaze i endoglukanaze pri čemu se iz molekula celuloze oslobađaju rastvorni šećeri sa stepenom polimerizacije (DP) do 6 u tečnu fazu. Sekundarna hidroliza se odvija u tečnoj fazii uključuje hidrolizu celobioze do glukoze  $\beta$ -glukozidazama (Zhang et al., 2006).

Kada se komercijalni celulozni preparati dodatno obogate sa  $\beta$ -glukozidazama povećava se stepen hidrolize celuloze što predstavlja bitan faktor prilikom celulozne saharifikacije u industrijskoj proizvodnji. Na primer, dodatak  $\beta$ -glukozidaze celuloznim preparatima poboljšava hidrolizu celuloze do glukoze za 40% (Buckeridge & Goldman, 2011). Sinergizam između endoglukanaza i egzoglukanaza je najproučavaniji tip sinergije i spada među važnije faktore koji utiču na hidrolizu kristalne celuloze (Buckeridge & Goldman, 2011).

Glavne komponente celulaza *Trichoderma reesei* su egzoglukanaze CBHI i CBHII, koje čine skoro 80% proteinskog dela apoenzima koje produkuje ova plesan. CBHI predstavlja egzoglukanazu koja hidrolizuje  $\beta$ -1,4-veze celuloznog lanca sa redukujućih krajeva dok CBHII hidrolizuje  $\beta$ -glukozidne veze sa neredukujućih krajeva (Slika 3)(Buckeridge & Goldman, 2011).

CBHI i CBHII su veoma moćni enzimi, koji mogu postići kompletnu, iako sporu, hidrolizu kristalne celuloze, postepeno smanjujući stepen polimerizacije, čak i bez pomoći endoglukanaza (Teeri, 1997). Ovakav proces je dosta spor zato što se

egzoglukanaze prvo vezuju na nerastvornu celulozu, razgrađuju čvrste slojeve i olakšavaju pristup pojedinačnog celuloznog lanca aktivnom centru enzima (Buckeridge & Goldman, 2011; Teeri, 1997).

Po svojoj strukturi većina hidrolaza se sastoji od domena (Carrard et al., 2000; Jørgensen et al., 2007). Domeni predstavljaju strukturno odvojene i nezavisne jedinice i imaju sve karakteristike malog globularnog proteina (obično se satoje od 50-150 aminokiselinskih ostataka). Kod enzima koji se sastoje iz domena aktivni centar se nalazi na sastavu između svih domena, dok se supstrati ili kofaktor vezuju za različite domene (Knežević-Jugović, 1998). Domeni su prvobitno otkriveni na celulazama ali je kasnije utvrđeno da ih poseduje većina ugljeno-hidratnih hidrolaza koje deluju kako na čvrstim tako i na rastvornim supstratima. Funkcija domena je da približe aktivni centar tako da on bude u bliskom kontaktu sa supstratom obezbeđujući odgovarajuću orijentaciju između njih (Jørgensen et al., 2007; Wang et al., 2003)(Coutinho & Henrissat, 1999; Gilkes et al., 1991). Prisustvo domena je neophodno za brzo i pravilno vezivanje celulaza na celulozu (Jørgensen et al., 2007). Uklanjanje domena značajno smanjuje stepen hidrolize celuloze (Suurnäkki et al., 2000). Prisustvo domena kod nekih celulolitičkih enzima može delimično da objasni razlike u adsorpcionoj sposobnosti celulaza (Gilkes et al., 1991).

Dodatak domena, koji potiče od CBHII *Trichoderma reesei* u hitinaze iz *T. harzianum* omogućava veću sposobnost vezivanja i povećava hidrolitičku aktivnost premanerastvornim supstratima (Limón et al., 2001).

Celulaze trenutno predstavljaju treću veliku grupu industrijskih enzima, koji imaju široku primenu u različitim industrijama (industrija papira, prehrambena industrija, industrija deterdženata i industrija stočne hrane). Svakako, celulaze mogu u budućnosti postati najviše korišćena grupa industrijskih enzima ako etanol, koji nastaje primenom celulaza na lignoceluloznoj biomasi i daljom fermentacijom, postane glavno transportno gorivo (Singhania et al., 2010).

Celulaze su veoma skupi enzimi i značajno smanjenje troškova prilikom njihove proizvodnje će biti veoma važan faktor za komercijalnu upotrebu u biorafinerijama. Strategije za proizvodnju celulaza koje bi omogućile ekonomičnije procese biorafinerijama uključuju: povećanje komercijalne enzimске proizvodnje, korišćenje jeftinih sirovina za enzimsku proizvodnju, proizvodnja enzima bolje

stabilnosti i proizvodnja celulaza sa visokom specifičnom aktivnošću na čvrstim supstratima (Zhang et al., 2006).

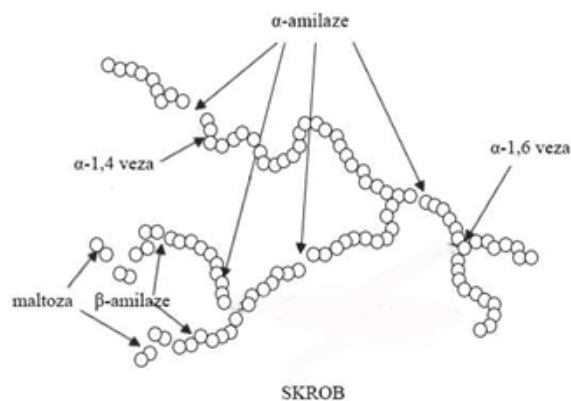
Optimizacija proizvodnje celulazaje vrlo složena sa bioanalitičkog aspekta, pošto se radi o kompleksnoj smeši enzima. Iz tog razloga primenjuju se različite metode određivanja aktivnosti sa ciljem identifikacije određenog tipa enzima iz kompleksne celulolitičke smeše. Najpreciznije i najjednostavnije su metode za detektovanje i kvantifikovanje aktivnosti  $\beta$ -glukozidaza jer je jasno da se kao supstrat koristi celobioza. Međutim, izbor supstrata za potpunu diferencijaciju endoglukanaza i egzoglukanaza nije tako jednostavan. Često se u tu svrhu koriste dva supstrata: karboksimetil celuloza (CMC) i Avicel, komercijalni preparat kristalne celuloze (Lynd et al., 2002). Pošto je CMC derivat celuloze sa amorfnom strukturom, nema prepreka za dejstvo celulaza u celokupnom molekulu pa ja ovo supstrat za detekciju aktivnosti endoglukanaza. S druge strane, Avicel ima mikrokristalnu strukturu pa se smatra da hidrolizu ovog preparata mogu izvesti samo egzoglukanaze. Iz tog razloga su u ovoj disertaciji upravo korišćena ova dva supstrata. Mada, treba naglasiti da se Avicelazna aktivnost ne može u potpunosti poistovetiti sa egzoglukanaznom pošto postoje primeri u literaturi da je na ovom polimeru ustanovljena i endoglukanazna aktivnost (Bronnenmeier & Staudenbauer, 1990).

## 2.2. Amilaze

Amilaze su enzimi koji katalizuju delimičnu ili potpunu hidrolizu skroba do glukoze (Knežević-Jugović, 1998).  $\alpha$ -Amilaze (EC 3.2.1.1) su endoamilaze na osnovu načina dejstva na makromolekul-skrob jer katalizuju hidrolitičku razgradnju  $\alpha$ -1,4-glikozidnih veza na bilo kom mestu u unutrašnjosti molekula skroba nasumično. Apsolutno su specifične prema  $\alpha$ -1,4-glikozidnim vezama, odnosno ne mogu da hidrolizuju  $\alpha$ -1,6-glikozidne veze u tačkama grananja amilopektina. Pri delovanju  $\alpha$ -amilaze na amiloznu frakciju skroba kao prvi proizvodi hidrolize dobijaju se dekstrini i oligosaharidi sa 6-7 glukoznih jedinica. Pri delovanju  $\alpha$ -amilaze na amilopektin, kao prvi proizvodi nastaju dekstrini, zbog čega se ova amilaza naziva dekstrinogena amilaza.

Za razliku od  $\alpha$ -amilaza,  $\beta$ -amilaze i glukoamilaze su egzoamilaze na osnovu načina dejstva na makromolekul-skrob jer katalizuju hidrolitičku razgradnju  $\alpha$ -1,4-glikozidnih veza počevši od neredukujućeg kraja makromolekula. Pošto  $\beta$ -amilaze raskidaju svaku drugu vezu, odnosno otkidaju po dve glukoze jedinice počevši od neredukujućeg kraja makromolekula, maltoza je osnovni proizvod koji se dobija pri dejstvu ovog enzima. Zbog toga se  $\beta$ -amilaze često nazivaju maltogene amilaze.

$\beta$ -Amilaze (EC 3.2.1.2) su kao i  $\alpha$ -amilaze apsolutno specifične prema  $\alpha$ -1,4-glikozidnim vezama, odnosno ne mogu da hidrolizuju  $\alpha$ -1,6-glikozidne veze u molekulu amilopektina ili drugog razgranatog polisaharida. Naziv enzima ukazuje da proizvodi hidrolize nakon njihovog dejstva imaju  $\beta$ -konfiguraciju na C1 atomu. Enzimska hidroliza  $\beta$ -amilazama je nepotpuna i one mogu da razlože 55% amilopektina u maltozu. Preostali, nerazloženi deo molekula velike molekulske mase, naziva se granični dekstrin (Knežević-Jugović, 1998).



Slika 2.2. Hidroliza skroba pomoću  $\alpha$ -amilaza i  $\beta$ -amilaza

$\alpha$ -Amilaze se mogu dobiti iz različitih prirodnih izvora, npr., biljaka, životinja i mikroorganizama. Svakako, bakterijske i fungalne  $\alpha$ -amilaze su dominantne u komercijalnoj proizvodnji zbog njihove lake manipulacije, isplativosti i efikasne proizvodnje željenih karakteristika enzima (Roy & Mukherjee, 2013).

Amilaze obuhvataju oko 25% ukupne industrijske enzimске proizvodnje na svetu. Sa napretkom biotehnologije, njihova primena je proširena na različitim poljima kao što je medicina, klinička i analitička hemija.  $\beta$ -Amilaze su manje rasprostranjene od  $\alpha$ -amilaza i dobijaju se uglavnom iz ceralija i drugih viših biljaka.

Termostabilnije  $\beta$ -amilaze koje mogu biti interesantne za industrijsku primenu proizvode se iz mikroorganizama i to iz različitih vrsta roda *Bacillus* (npr. *Bacillus* sp. KYJ963 (Ha et al., 2001) i *B.circulans* (Siggins, 1987)), *Pseudomonas* i *Streptomyces* (Knežević-Jugović, 1998). Takođe, *Clostridium thermosulfurogenes* (Shen et al., 1988), *Hallobacillus* sp. (Li & Yu, 2011) i *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1 (Mihajlovski et al., 2016) su u dostupnoj literaturi zabeleženi kao producenti  $\beta$ -amilaza.

Mikroorganizmi su najbolji izvori za proizvodnju enzima. Pronalaženje odgovarajućeg mikroorganizma ima važnu ulogu u dobijanju željenih karakteristika enzima.

### 2.3. Mikroorganizmi producenti celulaza

Mikroorganizmi koji produkuju celulaze primarno razgrađuju ugljene hidrate i generalno ne mogu da koriste proteine ili masti kao izvor energije za svoj rast (Lynd et al., 2002; Sukumaran et al., 2005).

Mogućnost stvaranja velikih količina ekstracelularnih proteina je karakteristika određenog broja plesni i takvi sojevi su najpogodniji za proizvodnju većih količina ekstracelularnih celulaza. Jedna od najviše proučavanih plesni je *Trichoderma reesei* koja konvertuje prirodnu celulozu do glukoze. Veoma često proučavani celulolitički mikroorganizmi su: plesni roda - *Trichoderma*, *Humicola*, *Penicillium*, *Aspergillus* (Chaabouni et al., 1995; Hayashida et al., 1988; Ong et al., 2004; Van Den Broeck et al., 2001); bakterije roda: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Cellulomonas*, *Cellovibrio* i *Cytophaga* i *Actinomycetes* - *Actinomucor* i *Streptomyces* (Lynd et al., 2002; Sukumaran et al., 2005).

Izolacija, skrining i selekcija su omogućili otkrivanje nekoliko novih celulolitičkih bakterija iz raznih prirodnih okruženja. Zbog velike raznolikosti među bakterijama, identifikacija novih bakterija producenata celulaza zahteva inovativnost (Maki et al., 2009).

Nedavno, termostabilne celulaze su pronađene u novoizolovanom *Bacillus subtilis* DR iz termalnih izvora. Visoka temperatura izvora odakle je mikroorganizam izolovan omogućila je proizvodnju termostabilnih endocelulaza CelDR sa temperaturnim optimumom od 50 °C. Ovaj soj takođe nudi mogućnost primene u

biorafinerijama, zbog visoke tolerancije prema visokim temperaturama (Li et al., 2008; Maki et al., 2009).

Uzgajanje termofilnih mikroorganizama ima niz prednosti, smanjuje se rizik od kontaminacije, smanjuje se viskoznost pa je mešanje podloge olakšano i postiže se veći stepen rastvorljivosti supstrata što je važno u industrijskoj primeni celulaza.

Nova termofilna bakterija koja proizvodi celulaze je izolovana iz svinjskog otpada i identifikovana kao *Brevibacillus* sp. soj JXL. Ova bakterija koristi širok spektar supstrata kao što su kristalna celuloza, CMC, ksilan, celobioza, glukoza i ksiloza za proizvodnju celulaza. Enzim je visoko stabilan jer na 100 °C u toku jednog sata inkubacije zadržava 50% svoje početne aktivnosti (Liang et al., 2009; Maki et al., 2009).

#### **2.4. Mikroorganizmi producenti amilaza**

Amilaze proizvode različite vrste mikroorganizama ali kada se radi o komercijalnoj primeni, bakterije iz roda *Bacillus* se smatraju njihovim najvećim producentima. Termostabilne  $\alpha$ -amilaze koje proizvodi *B.licheniformis*, *B.stearothermophilus* i *B.amyloliquefaciens* imaju veliku primenu u prehrambenoj, fermentacionoj, tekstilnoj i papirnoj industriji. Termostabilnost je važna karakteristika amilaza s obzirom na to da se gelatinizacija i enzimska saharifikacija skroba izvode pri visokim temperaturama (100-110 °C). Termostabilni amilolitički enzimi se koriste za poboljšanje mnogih procesa industrijske degradacije skroba. Takođe, amilaze koje proizvode neki halofilni mikroorganizmi su stabilne na visokim temperaturama i mogu se koristiti u industrijskim procesima u kojima se koriste koncentrovani rastvori soli. Halofilni mikroorganizmi koji proizvode amilaze su *Chromohalobacter* sp., *Halobacillus* sp., *H.hispanica* i *H.meridian* (Sivaramakrishnan et al., 2006; Souza, 2010; Sundarram & Murthy, 2014).

Filamentozne gljive se takođe koriste za proizvodnju amilaza. S obzirom da su plesni glavni producenti ekstracelularnih proteina, odnosno, enzima, one se koriste širom sveta za proizvodnju  $\alpha$ -amilaza. Plesni koje pripadaju rodu *Aspergillus* i *Penicillium* su najčešće korišćene za proizvodnju amilaza (Naidu, 2013; Souza, 2010). Filamentozne plesni kao što su *Aspergillus oryzae* i *A.niger*, proizvode značajne



količine amilaza koje imaju industrijsku primenu. Jedna od važnih karakteristika *A. niger*, u pogledu hidrolitičkih osobina i  $\alpha$ -amilazne sekrecije, jeste njegova visoka tolerancija u kiseljoj sredini (pH<3) što sprečava pojavu bakterijskih kontaminacija (Souza, 2010). Nekoliko vrsta *Penicillium* sp. se koristi za proizvodnju amilaza i to su *P. brunneum*, *P.fellutanum*, *P.expansium* MT-1, *P.chrysogenum* (Sundarram & Murthy, 2014). U tabeli 2.3. dati su neki primeri mikroorganizama producenata amilaza i neke osnovne osobine amilaza.

Tabela 2.3. Primeri mikroorganizama producenata amilaza i njihove osnovne karakteristike (Pandey et al., 2000a)

Poreklo	Molekulska masa(kDa)	pH optimum	Temperaturni optimum, °C	Reference
Bakterijske $\alpha$ -amilaze				
<i>Bacillus lentus</i>	42	6,1	70	(El-Aassar et al., 1992)
<i>B.flavothrmus</i>	-	5,5-6,0	50	(Bolton et al., 1997)
<i>B.subtilis</i>	54,7	5,8	60	(Uguru et al., 1997)
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	66	6,5	50	(Lee et al., 1997)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	50	5,5	65	(Giraud et al., 1993)
<i>Lactobacillus brevis</i>	75,9	6,9	55	(Ilori et al., 1995)
<i>Streptococcusbovis</i>	77	5-6	50	(Freer, 1993)
Fungalne $\alpha$ -amilaze				
<i>Aspergillus sp.</i>	56	5,5	40	(Park et al., 1995)
<i>Rhizopus sp.</i>	64	4,0-5,6	60-65	(De Almeida Siqueira et al., 1997)
$\beta$ -amilaze				
<i>Bacillus circulans</i>	64	7,0	5,0	(Kwan et al., 1994)
<i>Bacillus polymyxa</i>	56	5,5	45	(SOHN et al., 1996)
<i>Clostridium thermosulfurogenes</i>	180	6,0	70	(Reddy et al., 1997)
<i>Hendersonula toruloidea</i>	60	6,0	60	(Odibo et al., 1992)
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	-	5,0	60	(Ray & Chakraverty, 1998)

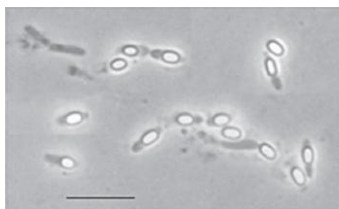
## 2.5. *Paenibacillus*

Rod *Paenibacillus* je definisan 1993.godine nakon ekstenzivne komparativne analize 16S RNA sekvence 51 vrste roda *Bacillus* (Ash et al., 1991; Ash et al., 1993). U to vreme, rod je sadržao 11 vrsta, uključujući *P.polymyxa* kao tipsku vrstu (type species) (da Silva et al., 2003). 2002. godine rod *Paenibacillus* obuhvata 37 vrsta i dve podvrste (da Silva et al., 2003). Većina ovih vrsta su fenotipski i genetički vrlo različite (Heyndrickx et al., 1996). Značajan broj *Paenibacillus* spp. ima industrijski i poljoprivredni značaj zbog razlaganja poliaromatičnih ugljovodonika (Daane et al., 2002), proizvodnje hitinaza, amilaza i proteaza (Aguilera et al., 2001; Mavingui & Heulin, 1994; Sakiyama et al., 2001), butandiola (Mallonee & Speckman, 1988) i antibiotika i bakteriocina (Mavingui & Heulin, 1994; Piuri et al., 1998; Rosado & Seldin, 1993).

Vrste iz roda *Paenibacillus* mogu biti toksične za insekte (Pettersson et al., 1999) ili mogu uticati na rast i zdravlje biljaka direktno, tako što proizvode fitohormone, skladište nutijente, fiksiraju azot i/ili suzbijaju štetne mikroorganizme (da Silva et al., 2003).

### 2.5.1. Čelijska struktura i morfologija

Paenibacili su štapićasti mikroorganizmi dužine oko 2- 5µm i širine 0.5-0.8 µm. Iako imaju Gram-pozitivnu strukturu ćelijskog zida, starije kulture se mogu videti kao Gram-negativne pod mikroskopom. Sve vrste proizvode endospore koje su većeg prečnika nego majka ćelija (Slika 2.3.) (De Vos et al., 2009) .



Slika 2.3. Fazno kontrastni mikrografsporulacije ćelija *Paenibacillus polymyxa* DSM 36T. Bar = 5 µm (De Vos et al., 2009)

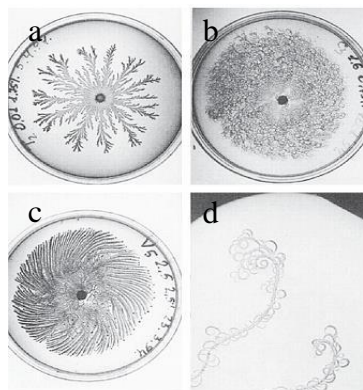
Spore *P.macerens* i *P.polymyxa* imaju veoma grubu spoljšnju površinu, dok *P. borealis* imaju prugastu morfologiju (Elo et al., 2001).

Većina vrsta se pokreće pomoću peritrahijalnih flagela, ali postoje i vrste kod kojih je kretanje ograničeno samo na pojedine ćelije (npr. *P. popilliae*) kao i vrste koje su nepokretne (*P. lentimorbus*)(De Vos et al., 2009).

Peptidoglukan ćelijskog zida svih vrsta koje su proučavane uvek je pripadao tipu *mezo*-diaminopimelinskih (DAP) kiselina. Neke vrste proizvode kapsule pod odgovarajućim uslovima rasta. Na primer, *P. polymyxa* sintetiše levan kapsule kada se gaji na saharozi kao izvoru ugljenika. Takođe, neke vrste produkuju ekstracelularne polisaharide pod određenim uslovima rasta (De Vos et al., 2009).

### **2.5.2.Karakteristike kolonija**

Na čvrstoj agarnoj podlozi paenibacili obično prave male, providne ili svetlo braon, a ponekad i ružičaste ili žute kolonije. Kolonije čiste kulture često pokazuju promene u providnosti. Ove promene su posledica različitog stepena sporulacije ćelija- kolonije su manje providne tokom sporulacije. Većina paenibacila ne poseduje pigment, izuzetak je *P. larvae* subsp. *pulvificiens*, koji produkuje žuto-narandžaste kolonije i *P.chinjuensis* sa ružičastim kolonijama. *P.alvei* ima pokretne mikrokolonije koje brzo migriraju preko agarnog medijuma čak ikada je on dobro osušen. Ostale vrste sa pokretnim kolonijama uključuju *P.glucanolyticus*, *P.campinasensis* i *P.curdlanolyticus*. Pokretljivost tih kolonija se može uočiti već pri uvećanju od x50 pri transmitovanoj svetlosti (De Vos et al., 2009). Kod paenibacila je primećen da formira kompleksne oblike kolonija kada se uzgaja pri uslovima koji su ispod optimalnih, kao na primer, sa nedovoljno nutrijenata (Cohen et al., 2000) ili u prisustvu antibiotika (Ben-Jacob et al., 2000). Izraz morfotip se koristi da opiše kapacitet mikroorganizama da formira mustre. Različiti morfotipovi *P.dendritiformis* proizvode kako "hiralne" mustre tako i mustre "sa podeljenim vrhom" (slika 2.4.) kada se uzgajaju bez dovoljno hranljivih materija, kao na primer, na 0.2% peptonskom agaru (Tcherpakov et al., 1999).



Slika 2.4. Različiti morfotipovi *Paenibacillus* sp.: (a) razdvajajući, (b) hiralni, (c) vortex i (d) hiralni: (a) i (b) su dve varijante rasta *P. dendritiformis* koje su uzgajane pri različitim koncentracijama agara na agarnoj ploči; (c) je izolat *Paenibacillus* sp. koji je najviše srodan *P. lautus* (De Vos et al., 2009)

### 2.5.3. Ishrana i metabolizam

Većina paenibacila raste na hranljivom agaru pri neutralnoj pH vrednosti ali će dodavanje fermentabilnog izvora ugljenika (npr. 0.5% glukoze) uglavnom ubrzati rast. Trypton soja agar je dobra zamena za hranljivi agar. Izuzetak predstavljaju *P. campinasensis* i *P. daejeonensis*, koji su alkalofilni i ne rastu ukoliko je pH ispod 7.5 Neke nedavn oopisane vrste (*P. cookie* i *P. cineris*) zahtevaju niži pH za optimalan rast.

*P. larvae* raste na hranljivom agaru ali najbolji rast postiže na kompleksnim podlogama. Većina vrsta ima optimalan rast pri temperaturi od 30°C. Svakako, postoje izuzeci. *P. macquariensis* je psihrofilan mikroorganizam sa maksimalnom temperaturom rasta od 25°C dok *P. cineris* ima jako širok raspon temperature rasta (0–50°C) što je verovatno posledica dramatičnih promena u prirodnom staništu.

Vrsta *Paenibacillus* roda ne formiraju spore pri svim uslovima uzgajanja. Suplementacija hranljivog medijuma mešavinom soli na primer,  $MnCl_2$  (50 $\mu$ M),  $CaCl_2$  (700 $\mu$ M) i  $MgCl_2$  (1mM) uglavnom rezultira pojačanim efektom sporulacije (De Vos et al., 2009).

*Paenibacillus* spp. poznate su po sposobnosti da hidrolizuju širok dijapazon ugljenih hidrata kao što su: CMC, hitin, hondroitin, kurdlan ( $\beta$ -1,3-glukan), pustulan ( $\beta$ -1,6-glukan),  $\beta$ -1,4-glukan, pululan (jedinice maltoze povezane  $\alpha$ -1,6-glikozidnim vezama), skrob i ksilan. *P. glycanilyticus* je selektivno izolovan na bazi sposobnosti da

hidrolizuje vanćelijske heteropolisaharide sa  $\beta$ -glukozidnom vezom, koje proizvodi *Nostoc commune* (Kajiyama et al., 2002). *P.naphthalenovorans* i *P.validus* su atipične po svojoj mogućnosti da razgrade ugljene hidrate (Daane et al., 2002), mada je premalo vrsta testirano u ovom smislu tako da je ova osobina možda i češća nego što se misli. Ove bakterije su uglavnom fakultativno anaerobne, ali kako se rod širi, uočava se sve više striktno aerobnih vrsta. Tokom rasta *P.macerans* sa glukozom kao izvorom ugljenika, Embden-Meyerhof-ov put može se koristiti za dobijanje piruvata, koji se prevodi prvo u etanol, sirćetnu kiselinu i male količine formijata. *P.polymyxa* je poznat po tome da proizvodi 2,3-butandiol tokom katabolizma šećera, posebno pri niskim pH vrednostima (Marwoto et al., 2002).

*P.macerans* takođe proizvodi vodonik tokom fermentacije šećera. Rod *Paenibacillus* trenutno obuhvata 10 azotovezujućih vrsta iako se mora napomenuti da ova osobina nije testirana sistematski. *nifH* (di-azot-reduktaza) gen je primećan kod više vrsta ovih bakterija i srodniji je *nifH* genu ostalih aerobnih prokariota nego genima prisutnim kod anaerobnih azotovezujućih rodova kao što je *Clostridium*. Vezivanje azota se izgleda ne pojavljuje kod drugih aerobnih vrsta koje formiraju endospore (De Vos et al., 2009).

#### 2.5.4. Ekologija

Normalno stanište paenibacila je zemljište, naročito zemljište bogato humusom i biljnim materijalom čije raspadanje paenibacili pomažu izlučivanjem ekstracelularnih enzima. Nizovi više vrsta, a posebno azotofiksirajućih vrsta kao *P.polymyxa* povezuju se sa rizosferama biljaka i važnih vrsta useva. Ove bakterije poboljšavaju rast raznih biljaka proizvodnjom fitohormona ili obezbeđujući nutrijente, uključujući azot. Takođe proizvode antifungalna jedinjenja i enzime koji pomažu da se potisnu gljivična oboljenja. *P.polymyxa* je svuda prisutna kao rizosferna bakterija, naročito vezana sa žitaricama, kao što je na primer pšenica. Sa druge strane *P.durus* (ranije poznata kao *P.azotofixans*) može se naći samo u brazilskom i havajskom tlu. *P.borealis* je izolovan iz humusa u skandinavskim šumama omorike, što ukazuje na geografsku lokalizaciju različitih vrsta (De Vos et al., 2009).

### 2.5.5. *Paenibacillus* spp. kao producent celulaza i amilaza

*Paenibacillus* sp. B39, koji je izolovan iz komposta živinskog đubreta na Tajvanu, poseduje dobru endoglukanaznu i egzoglukanaznu aktivnost. Ovaj soj ima visoku optimalnu temperaturu od 65 °C, dobru temperaturnu stabilnost i optimalno pH u blago kiseljoj sredini, što ga čini pogodnim za insustrijsku proizvodnju enzima (Maki et al., 2009; Wang et al., 2008). Osim ovog soja, nova celulozno degradirajuća bakterija *P.campinasensis* BL11 je izolovana iz crnog likvora prilikom Kraftovog procesa proizvodnje pulpe. Crni likvor predstavlja izuzetno baznu sredinu i s toga vrlo nepovoljnu za rast bakterija. Izolacija mikroorganizma producenta celulaza iz ovakve jedne sredine omogućava da proizvedeni enzim bude otporan na grube procese koji se koriste prilikom različitih predtretmana lignocelulozne biomase. *P.campinasensis* BL11 je termofilna, sporogena bakterija sa optimalnom temperaturom rasta između 25–60 °C i sa širokim pH opsegom. Ovaj izolat može da koristi različite izvore ugljenika za svoj rast i da proizvodi višestepene enzimske komplekse uključujući ksilanaze, dve celulaze, pektinaze i ciklodekstrin glukano transferaze (Ko et al., 2007). Dobre fiziološke osobine i veliki broj proizvedenih enzima omogućavaju mu potencijalnu primenu u biorafinerijama (Maki et al., 2009; Nishida et al., 2007).

Nema mnogo dostupnih literaturnih podataka o proizvodnji amilaza pomoću *Paenibacillus* spp. Dostupna su istraživanja Hameed-a i saradnika (Hameed et al., 2012) o  $\alpha$ -amilaznoj proizvodnji pomoću *P.amylolyticus* korišćenjem različitih otpadnih sirovina. Takođe, *Paenibacillus* sp. PP710 proizvodi  $\alpha$ -amilaze tokom svog rasta na komercijalnim supstratima (Tsusaki et al., 2012). Kada je reč o  $\beta$ -amilazama, treba izdvojiti nedavno izolovan soj *P.chitinolyticus* CKS1 koji uspešno proizvodi ovaj tip enzima. Soj CKS1 poseduje mogućnost proizvodnje  $\beta$ -amilaza, kako na komercijalnim podlogama tako i na otpadnim sirovinama. Krajnji proizvod hidrolize skroba  $\beta$ -amilazama je maltoza, što ovom soju omogućava potencijalnu primenu u prehrambenoj i industriji skroba (Mihajlovski et al., 2015b; Mihajlovski et al., 2016).

### 3. MIKROBIOLOŠKI POSTUPCI PROIZVODNJE CELULAZA I AMILAZA

#### 3.1. Mikrobiološki procesi za proizvodnju celulaza

Potruga za potencijalnim izvorima celulolitičkih enzima je stalna i u interesu što uspješnije biokonverzije lignocelulozne biomase (Kumar et al., 2008). Neki mikroorganizmi produkuju sve tipove celulaza. Samo oni mikroorganizmi koji produkuju određene nivoe egzoglukanaza, endoglukanaza i  $\beta$ -glukozidaza mogu efikasno da degradiraju prirodnu lignoceluloznu biomasu (Kumar et al., 2008).

Većina istraživačkih radova o mikrobnoj proizvodnji celulaza se zasniva na submerznoj fermentaciji (SmF) pri čemu je najviše proučavana plesan *Trichoderma reesei* koja je gajena u tečnoj podlozi (SmF). U prirodi, rast i iskorišćenje celuloze i proizvodnja enzima celulaza kod aerobnih mikroorganizama se verovatno dešava češće na čvrstim nego u tečnim supstratima. Ipak, prednost je, zbog boljeg praćenja i rukovanja procesom fermentacije, i dalje kod submerznog gajenja mikroorganizama (Sukumaran et al., 2005). Kod većine komercijalnih procesa fermentacije, za dobijanje celulaza, koriste se različiti izvori ugljenika i to od čiste celuloze do slame, pirinčanih i pšeničnih mekinja, otpadnog papira i različitih lignoceluloznih ostataka (Adsul et al., 2004; Belghith et al., 2001; Heck et al., 2002; Reczey et al., 1996; Romero et al., 1999; Szijártó et al., 2004; Wen et al., 2005). Glavni limitirajući faktor tokom izvođenja fermentacije jeste dugo vreme trajanja procesa i niska produktivnost (Sukumaran et al., 2005).

Fermentacija na čvrstoj podlozi (SSF) se odvija u potpunom odsustvu ili skoro u odsustvu vode. SSF za proizvodnju celulaza je nedavno dobila na značaju kod većine istraživača, kao jeftiniji tehnološki proces (Pandey et al., 2000b). SSF za proizvodnju celulaza se sve više koristi jer je u poređenju sa SmF postupak jeftiniji, dok koncentracija nastalog proizvoda može biti i veća od one dobijene u SmF (Pandey et al., 1999; Vintila et al., 2009). Pandey i saradnici (Pandey et al. 1999) smatraju da je SSF za proizvodnju celulaza buduća tehnologija zbog niskih početnih troškova ulaganja i mogućnosti iskorišćenja prirodno dostupne celuloze kao supstrata. Celulaze proizvedene SSF pokazuju izvanrednu stabilnost u odnosu na temperaturu, pH, uticaj metalnih jonaitd. SSF u poređenju sa SmF nudi određene prednosti, a to su: visoka

produktivnost, veća koncentracija proizvoda, manje otpadne vode i niska katabolička represija (Singhania et al., 2009; Sukumaran et al., 2005).

### ***3.1.1. Najvažniji faktori koji utiču na proizvodnju celulaza***

U cilju povećanja prinosa celulaza, neophodno je izvršiti optimizaciju različitih parametara procesa kao i same podloge za rast mikroorganizma. Najbitniji faktori koji utiču na proizvodnju celulaza su priroda celulolitičkog supstrata, pH podloge, izvor azota, temperatura fermentacije itd.

Celulaze su inducibilni enzimi, pa je stoga izbor celuloznog supstrata veoma važan za rast mikroorganizma i za proizvodnju enzima. Kod većine mikroorganizama celulaze se indukuju u prisustvu komercijalnih supstrata na bazi celuloze (CMC, Avicel)(Asha et al., 2012; Kim et al., 2009; Niranjane et al., 2007; Raddadi et al., 2013), ali i u prisustvu prostijih šećera kao što su: laktoza, celobioza, glukoza (Ahmed et al., 2009; Ko et al., 2007; Morikawa et al., 1995; Niranjane et al., 2007)itd. Pored komercijalnih supstrata, u poslednje vreme zabeleženo je povećano korišćenje različitih poljoprivrednih otpadnih sirovina, kao što su pšenične mekinje (Brijwani et al., 2010), šećerna trska (Ladeira et al., 2015), izluženi repin rezanac (Moosavi-Nasab & Majdi-Nasab, 2008), ječmena stabljika (Assareh et al., 2012)za proizvodnju mikrobnih celulaza. Kao i kod većine enzima, tako je i kod celulaza zabeležena pojava inhibicije supstratom. Tako se recimo celobioza ponaša i kao induktor i kao inhibitor celulazne proizvodnje kod *Cellulomonas* sp. (Stewart & Leatherwood, 1976).

pH vrednost podloge je takođe važan faktor koji utiče na proizvodnju celulaza (Liang et al., 2009). Plesni uglavnom zahtevaju niže pH vrednosti za svoj rast i proizvodnju celulaza (Domingues et al., 2000)dok bakterijama više odgovara neutralna ili slabo bazna sredina (Ko et al., 2007; Ogawa et al., 2007; Ray et al., 2007).

Izvor azota, pored izbora celulolitičkog supstrata, utiče na proizvodnju celulaza. Bakterije roda *Bacillus* (Krishna, 1999; Lee et al., 2008), *Geobacillus* (Rastogi et al., 2010) i *Paenibacillus* (Asha et al., 2012; Raddadi et al., 2013) preferiraju u podlozi organski izvor azota, dok neke vrste plesni kao *Aspergillus*, proizvode celulaze u prisustvu uree kao izvora azota (Acharya et al., 2008).



Mikroorganizmi producenti celulaza poseduju sposobnost rasta u širokom temperaturnom opsegu u kojem proizvode celulaze. Temperatura koja je optimalna za rast mikroorganizma ujedno predstavlja i temperaturu za maksimalnu proizvodnju celulaza. Optimalna temperatura za većinu plesni, pri kojima se proizvode celulaze iznosi 28-30 °C (Acharya et al., 2008; Moosavi-Nasab & Majdi-Nasab, 2008), dok je kod bakterijskih celulaza temperatura između 30-55 °C (Annamalai et al., 2011; Kim et al., 2009; Raddadi et al., 2013; Ray et al., 2007; Shinoda et al., 2012). Svakako, optimalna temperatura zavisi od karakteristika datog mikroorganizma.

### ***3.1.2. Celulaze za biokonverziju- komercijalni preparati***

Mikrobne celulaze nalaze svoju primenu u industrijama gde su poželjne celulaze različitog stepena čistoće (Singhania et al., 2010). Na početku celulaze su se koristile najviše za biokonverziju lignocelulozne biomase ali sada raste njihova primena i u drugim industrijama, kao što su: industrija stočne hrane, prehrambena industrija, industrija tekstila i deterdženata i sve više papirna industrija (Bhat, 2000; Singhania et al., 2010). Sa nedostatkom fosilnog goriva i povećanim potrebama za alternativnim izvorima energije i goriva, obnovljen je interes za biokonverziju lignocelulozne biomase koristeći celulaze i druge enzime (Singhania et al., 2010).

Učinak celulazne smeše u procesima biokonverzije zavisi od: njihove stabilnosti u datim procesnim uslovima, inhibicije proizvodom, sinergizma među različitim enzimima, efikasnost vezivanja na celulozu, fizičkih osobina i sastava celulozne podloge (Heinzelman et al., 2009; Singhania et al., 2010).

Postoji nekoliko kompanija koje proizvode celulaze za primenu u industriji deterdženata, papirnoj i drugim industrijama. Na globalnom nivou, postoje dva glavna proizvođača celulaza i to su "Genencor" i "Novozyme". Nedavno, Genencor je izbacio na tržište Accelerase<sup>®</sup>1500, celulazni kompleks namenjen isključivo za hidrolizu lignocelulozne biomase u industrijskoj proizvodnji. Accelerase<sup>®</sup>1500 je proizvod nastao iz genetički modifikovane plesni *T. reesei*. Ovaj proizvod sadrži više  $\beta$ -glukozidaze nego bilo koji druga komercijalna celulaza, što znači da je osigurana potpuna hidroliza celuloze do glukoze (Singhania et al., 2010).

Celulaze su dostupne na tržištu pod raznim nazivima (tabela 3.1.). Izbor enzimskog preparata za određenu celuloznu biomasu najviše zavisi od osobina te biomase, a manje od aktivnosti datog enzima (Kabel et al., 2006; Singhanian et al., 2010).

Tabela 3.1. Komercijalne celulaze, njihovi proizvođači na tržištui mikroorganizmi producenti (Singhanian et al., 2010)

Primeri celulaza	Proizvođač	Mikroorganizam
Cellubrix (Celluclast)	Novozymes, Denmark	<i>T. longibrachiatum</i> i <i>A. niger</i>
Novozymes 188	Novozymes	<i>A. niger</i>
Cellulase 2000L	Rhodia-Danisco (Vinay, France)	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>
Rohament CL	Rohm-AB (Rajamaki, Finland)	Enzymes <i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>
Viscostar 150L	Dyadic (Jupiter, USA)	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>
Multifect CL	Genencor Intl. (S. San Francisco, CA)	<i>T. reesei</i>
Bio-feed beta L	Novozymes	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>
Energex L	Novozymes	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>
Ultraflo L	Novozymes	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>
Viscozyme L	Novozymes	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>
Cellulyve	50L Lyven (Colombelles, France)	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>
GC 440	Genencor-Danisco (Rochester, USA)	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>
GC 880	Genencor	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>
Spezyme CP	Genencor	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>
GC 220	Genencor	<i>T. longibrachiatum</i> / <i>T. reesei</i>
Accelerase®1500	Genencor	<i>T. reesei</i>
Cellulase AP30K	Amano Enzyme	<i>A. niger</i>
Cellulase TRL	Solvay Enzymes (Elkhart, IN)	<i>T. reesei</i> / <i>T. longibrachiatum</i>
Econase CE	Alko-EDC (New York, NY)	<i>T. reesei</i> / <i>T. longibrachiatum</i>
Cellulase TAP106	Amano Enzyme (Troy, VA)	<i>T. viride</i>

Biocellulase TRI	Quest Intl. (Sarasota,FL)	<i>T. reesei/T. longibrachiatum</i>
Biocellulase A	Quest Intl.	<i>A. niger</i>
Ultra-low microbial (ULM)	Iogen (Ottawa, Canada)	<i>T. reesei/T. longibrachiatum</i>

Celulaze za biokonverziju mogu se sastojati od smeše ili enzimskog koktela koji uključuje: endoglukanaze, egzoglukanaze, ksilanaze,  $\beta$ -glukozidaze, pektinaze itd. Hidrolitička efikasnost multienzimskog kompleksa za lignoceluloznu saharifikaciju zavisi od osobina pojedinačnog enzima i njihovog odnosa u multienzimskoj smeši (Gusakov et al., 2007). Idealni celulazni kompleks mora biti visoko aktivan na primenjenoj lignoceluloznoj biomasi, mora kompletno da hidrolizuje biomasu, da je aktivan u blago kiseloj sredini i da bude što jeftiniji (Singhania et al., 2010).

Dobijanje etanola iz lignocelulozne sirovine zavisi od sposobnosti korišćenih celulaza. Ključna stvar u usavršavanju celulaza, koje će hidrolizovati tačno određenu lignoceluloznu sirovinu, jeste napraviti tačno definisan celulazni kokteli/ili uraditi ekspresiju željenih gena kod mikroorganizama producenta celulaza (Schülein, 2000). Enzimski kokteli su uspešno razvijeni mešajući *T. reesei* celulaze sa drugim enzimima uključujući ksilanaze, pektinaze i  $\beta$ -glukozidaze i ovakvi kokteli uspešno hidrolizuju različite tipove lignocelulozne biomase (Berlin et al., 2007; Singhania et al., 2010; Xin et al., 1993). Jedan od nedavnih primera razvoja i primene celulaznih koktela jeste celulazni multienzimski kompleks iz *Chrysosporium lucknowense* (Singhania et al., 2010).

### 3.1.2.1. Željene karakteristike celulaznih preparata za biokonverziju

Dosta specifičnih osobina, kao što su visoka katalitička efikasnost na nerastvornim celuloznim supstratima, povećana stabilnost na visokim temperaturama i određenim pH vrednostima kao i visoka tolerancija prema krajnjim inhibirajućim produktima su poželjne osobine celulaza za konverziju lignocelulozne biomase (Maki et al., 2009). Celulaze koje su aktivne u kiseloj sredini su poželjnije za procese biokonverzije naročito u procesima predtretmana lignocelulozne sirovine rastvorima

kiselina i kada enzim treba da radi u koktelu sa *T. reesei* celulazama, čija je optimalna pH aktivnost bliska 5. Većina celulaza koje se koriste za konverziju biomase rade bolje pri pH vrednostima 4-6. Komercijalni preparat celulaze, pod nazivom Accelerase®1500 ima optimalno pH 4,6-5 ali se inaktivise ispod pH 4 ili preko pH 7. Kod većine celulaza optimalna temperatura za hidrolizu je 50 °C dok preparat Accelerase®1500 radi pri temperaturama između 50-65 °C. Većina plesni, kao što su *T.reesei* i *A.niger* proizvodi celulaze aktivne u kiseloj sredini koje su poželjne za proces hidrolize lignocelulozne biomase (Singhania et al., 2010).

### ***3.1.3. Industrijska primena mikrobnih celulaza***

Mikrobne celulaze nalaze svoju primenu u različitim industrijama: poljoprivrednoj, prehrambenoj, industriji deterdženata, prepade pulpe i papira, tekstilnoj industriji, u biorafinerijama.

Celulaze se veoma uspešno koriste u tekstilnoj industriji, prilikom mokre i završne obrade tekstila (Kuhad et al., 2011). Takođe, celulaze se koriste kod izbeljivanja džinsa i biopoliranja pamuka i drugih celuloznih materijala. Tokom ovog procesa celulaze deluju na pamučnoj tkanini i razdvajaju male krajeve vlakana na površini materijala i tako oslobađaju boju koja se posle lako spira mehaničkom abrazijom tokom pranja materijala. Prednosti korišćenja celulaza umesto prethodno korišćenih plavih kamenčića, koji su se koristili za izbeljivanje džinsa, se ogleda u smanjenju oštećenja vlakana, većoj produktivnosti i smanjenim zagađenjem životne sredine. Celulaze koje su aktivne u kiseloj sredini povećavaju mekoću i apsorpciju vode vlakana, smanjuju napon između vlakana i obezbeđuju čistiju površinu sa manje pukotina (Sreenath et al., 1996). Celulazni preparati bogati endoglukanazama su se pokazali kao najboljima u procesima biopoliranja tkanine poboljšavajući njen izgled, dodir i boju bez nanošenja ikakvih hemikalija na samo vlakno (Galante et al., 1998).

Interes za primenu celulaza u industriji pulpe i papira se povećava tokom prethodne decenije (Kuhad et al., 2011). Smeša celulaza (endoglukanaze I i II) se koristi za biomodifikaciju vlakana sa ciljem povećavanja sposobnosti dreniranja kod papirnih maramica pre ili posle razaranja celuloze (Dienes et al., 2004). Celulaze same ili u kombinaciji sa ksilanazama su neophodne za procese uklanjanja mastila sa

različitih tipova otpadnog papira. Za sada koriste se celulaze i hemicelulaze za oslobađanje mastila sa površine vlakana parcijalnom hidrolizom ugljenohidratnih molekula (Kuhad et al., 2010b). Glavna prednost enzimskog uklanjanja mastila je smanjena upotreba baza, povećana mehanička svojstvamaterijala, veća čistoća materijala i smanjenje finih čestica u samoj pulpi (Kuhad et al., 2010a; Kuhad et al., 2010b). Takođe, proces enzimskog uklanjanja mastila koristi enzime sa optimalnim pH u kiseloj sredini i tako sprečava stvaranje žutih fleka na vlaknima, pojednostavljuje sam proces i smanjuje zagađenje životne sredine (Kuhad et al., 2010b).

Celulaze imaju široku primenu u prehrambenoj industiji. Proizvodnja sokova od voća i povrća zahteva primenu dobro utvrđenih postupaka za ekstrakciju, bistrenje i stabilizaciju sokova (Kuhad et al., 2011; Sukumaran et al., 2005). Celulaze imaju primenu kao deo kompleksa enzima za maceraciju (celulaze, ksilanaze i pektinaze) i koriste se prilikom ekstrakcije i bistrenja raznih sokova (De Carvalho et al., 2008; Minussi et al., 2002). Korišćenjem enzima za maceraciju povećavaju se i prinos i performanse celokupnog procesa bez dodatnog finansijskog ulaganja. Enzimi za maceraciju se koriste za poboljšanje stabilnosti, teksture i viskoznosti nektara i voćnih pirea voća (manga, breskve, papaje, šljive, kajsije i kruške). Ovi enzimi imaju ključnu ulogu u tehnologiji prerade hrane. Takođe, enzimske smeše koje sadrže pektinaze, celulaze i hemicelulaze se koriste za poboljšanje ekstrakcije maslinovog ulja (Kuhad et al., 2010b).

Primena celulaza i hemicelulaza u industriji stočne hrane poprima sve veći značaj zbog poboljšanja nutritivne vrednosti hrane za stoku. Predtretmanom poljoprivredne silaže i zrnaste hrane za životinje celulazama i hemicelulazama povećava se nutritivna vrednost proizvoda (Kuhad et al., 2011). Celulaze, koje se koriste kao aditiv stočnoj hrani, same ili sa proteazama, mogu znatno da poboljšaju kvalitet svinjskog mesa.

Proizvodnja stočne hrane obuhvata toplotni tretman koji inaktiviše potencijalne viruse i patogene kontaminante. Primena termofilnih celulaza prilikom pripreme stočne hrane ima mogućnost da smanji rizik od kontaminacije i da poveća nutritivnu vrednost samog proizvoda (Bhat, 2000).

Različiti enzimski preparati koji sadrže smeše celulaza, hemicelulaza i pektinaza imaju potencijalnu primenu u poljoprivredi za poboljšavanje rasta useva i

kontrolu bolesti biljaka (Bhat, 2000). Celulaze se koriste i za poboljšanje kvaliteta zemljišta. Fontain i saradnici (Fontaine et al., 2004) su pokazali da egzogena celulazna suplementacija ubrzava raspadanje celuloze u zemljištu. S toga, egzogene celulaze mogu imati potencijalnu primenu u ubrzavanju razgradnje slame i povećanju plodnosti zemljišta (Kuhad et al., 2011).

Korišćenje celulaza u kombinaciji sa proteazama i lipazama u deterdžentima predstavlja inovaciju u ovoj industriji (Singh et al., 2007). Celulaze poboljšavaju boju vlakana, mekoću i uklanjaju prljavštinu sa pamučne i polu-pamučne odeće. Industrijska primena alkalnih celulaza kao potencijalnih dodataka deterdžentima se aktivno sprovodi u cilju selektivnog kontakta celulaza i unutrašnjih vlakana. Nakon dejstva celulaza vlakna su glatkija, mekša i jasnijih boja (Karmakar & Ray, 2011).

Najvažnija primena celulaza jeste u korišćenju lignocelulozne biomase za proizvodnju bioetanola. Biokonverzija lignoceluloznih materijala u visoko vredne proizvode je višestepen proces koji uključuje predtretman (mehanički, hemijski ili biološki), hidrolizu polimera do lako metabolišućih šećera koji će podržati rast mikroorganizama i/ili proizvodnju etanola i na kraju separaciju i njegovo prečišćavanje. Troškovi enzimske hidrolize, u poređenju sa kiselom ili baznom hidrolizom lignoceluloznog materijala mogu da se smanje jer se enzimaska hidroliza izvodi pri blago kiselim uslovima (pH 4-6 i na 45-50 °C) (Kuhad et al., 2011)

Da bi se razvile efikasne tehnologije za proizvodnju biogoriva, značajna istraživanja su usmerena ka identifikaciji novih celulaznih sistema i procesnih uslova, kao i studija vezanih za genetičko i biohemijsko poboljšanje postojećih mikroorganizama producenata celulaza. Korišćenje čistih komercijalnih enzima u konverziji lignocelulozne biomase za dobijanje etanola je trenutno ekonomski neisplativo zbog visoke cene komercijalnih celulaza. Strategije su usmerene ka efikasnom rešavanju ovog problema (Sukumaran et al., 2005).

### **3.2. Mikrobiološki procesi za proizvodnju amilaza**

Glavne prednosti u korišćenju mikroorganizama kao producenata amilaza su ekonomična proizvodnja i veoma laka manipulacija mikroorganizmima u cilju dobijanja enzima željenih karakteristika (Pandey et al., 2000a).

Veliki broj mikrobnih enzima je dostupan komercijalno i skoro je potpuno iskorenjena hemijska hidroliza u industriji skroba (Thompson, 2000). Skrining za mikroorganizme producente  $\alpha$ -amilaza je prvi ključni korak ka njihovoj proizvodnji. Hidroliza skroba se lako detektuje na agarnim podlogama kao bistre zone koje okružuju kolonije. Prečnik zona hidrolize, u određenim granicama, određuje potencijal same amilaze (Dhawale et al., 1982).

Da bi se zadovoljile industrijske potrebe, za proizvodnju  $\alpha$ -amilaza koriste se što jeftinije podloge. Oba procesa fermentacije, submerzna SmF i fermentacija na čvrstoj podlozi SSF se mogu koristiti za proizvodnju amilaza, ali tradicionalno prednost se daje submerznom gajenju mikroorganizama zbog lakšeg rukovanja samim procesom, lakše kontrole temperature i pH. Većina komercijalnih podloga se koristi u submerznom postupku fermentacije za dobijanje ovih enzima. Komercijalne podloge, uključujući hranljivi bujon i rastvorljivi skrob su veoma skupe i gleda se da se one zamene nekim jeftinijim sirovinama (Sivaramakrishnan et al., 2006).

Fermentacija na čvrstoj podlozi (SSF) predstavlja prirodni mikrobiološki proces kao što je kompostiranje i siliranje, koji može da se koristi u kontrolisanom postupku dobijanja željenog proizvoda. SSF se definiše kao rast mikroorganizama na čvrstim supstratima sa neznatnom količinom slobodne vode. SSF predstavlja dobru alternativu s obzirom da proizvedeni metaboliti imaju veću koncentraciju pa je proces prečišćavanja jeftiniji. SSF se više koristi od SmF zbog jednostavnijeg procesa, niže kapitalne investicije, niskog nivoa kataboličke represije, manjeg stvaranja otpadnih voda i veće koncentracije proizvoda (Pandey, 1992; Pandey et al., 2000a). Kao supstrati za SSF mogu se koristiti različite skrobne sirovine (pirinač, kukuruz, soja, kazava) pri čemu je najbolji prinos zabeležen na pšeničnim mekinjama (Babu & Satyanarayana, 1995).

SSF se uglavnom koristi za proizvodnju amilaza pomoću plesni, dok je kod bakterija SSF ograničena na rod *Bacillus*, *B.subtilis*, *B.polymyxa*, *B.mesentericus*, *B.vulgarus*, *B.coagulans*, *B.megaterium* i *B.licheniformis*. Proizvodnja bakterijskih amilaza tokom SSF skraćuje vreme procesa na 24-48 h pa su samim tim i troškovi manji. Korišćenje poljoprivrednog otpada, sa jedne strane, predstavlja dobar izvor alternativnih supstrata za uzgajanje mikroorganizama i proizvodnju amilaza dok se sa

druge strane smanjuje zagađenje životne sredine i troškovi odlaganja takvog otpada (Pandey et al., 1999).

### **3.2.1. Najvažniji faktori koji utiču na proizvodnju amilaza**

Na proizvodnju i stabilnost  $\alpha$ -amilaza u podloziutiču različiti fizičko-hemijski faktori (El-Fallal et al., 2012). Tokom perioda inkubacije mikroorganizma, većina istraživača je došla do zaključka da proizvodnja ekstracelularnih  $\alpha$ -amilaza zavisi od rasta mikroorganizama (Abou et al., 2010; Murthy et al., 2009).

Generalno, uticaj temperature na proizvodnju amilazaje blisko povezan sa rastom mikroorganizma. Optimalna temperatura zavisi od vrste mikroorganizma, da li je mezofilan, termofilan ili psihrofilan. Među plesnima, optimalna temperatura za proizvodnju enzima je između 25 i 37 °C. Bakterijske amilaze se proizvode pri znatno višim temperaturama. *Bacillus amyloliquefaciens*, *B.subtilis*, *B.licheniformis* i *B.stearothermophilus* su među najviše korišćenim *Bacillus* sp. i proizvodnja  $\alpha$ -amilaza se vrši pri temperaturi između 37-60 °C (Diderichsen & Christiansen, 1988; Sivaramakrishnan et al., 2006)

Takođe, utvrđeno je da pH služi kao indikator početka i kraja sinteze enzima zato što promene u pH vrednosti značajno utiču na stabilnost amilaza u medijumu (El-Fallal et al., 2012). Zbog prisustva karboksilnih grupa u aktivnom centru amilaza, koje učestvuju u katalitičkom procesu (Lawson et al., 1994; Strokopytov et al., 1996), većina amilaza ima svoj pH optimum u kiseloj sredini (Božić et al., 2011; Pandey et al., 2000a). Ranija istraživanja su pokazala da plesni zahtevaju blago kiselu sredinu za rast i proizvodnju amilaza dok bakterije zahtevaju neutralno pH za optimalan rast. pH vrednost podloge utiče na sintezu i sekreciju amilaza kao ina njihovu stabilnost (Sivaramakrishnan et al., 2006).

Inducibilna priroda  $\alpha$ -amilaza je zabeležena kod različitih mikroorganizama (Abou et al., 2010; Ryan et al., 2006). Kod različitih sojeva *Aspergillus oryzae* glavni induktor amilaza je maltoza (Gupta et al., 2003). Određen broj poljoprivrednih otpadnih sirovina, otpaci krompira, skroba, sojine sačme, pšenice, kukuruza, sačma uljane repice i otpadne vode pri procesiranju skroba su takođe korišćene za proizvodnju  $\alpha$ -amilaza, dok su pšenične mekinje kao sporedni proizvod u poljoprivrednoj proizvodnji



korišćene za ekonomičnu proizvodnju  $\alpha$ -amilaza pomoću SSF (Gupta et al., 2003). Proizvodnja  $\alpha$ -amilaza može da bude podvrgnuta kataboličkoj represiji krajnjim produktom, maltozom i glukozom, kao što je primećeno kod većine inducibilnih enzima (Bhella & Altosaar, 1988; Mørkeberg et al., 1995). Kod  $\alpha$ -amilaza koje sintetišu neki *Bacillus* sp. sojevi nije zabeležena katabolička represija monosaharidima (Kalishwaralal et al., 2010). Galaktoza, glikogen, inulin, maltoza, sintetički analog maltoze  $\alpha$ -metil-D-glukozid deluju inducibilno na proizvodnju  $\alpha$ -amilaza kod različitih sojeva roda *Bacillus* (Sivaramakrishnan et al., 2006).

Izvor azota kao osnovne komponente medijuma utiče na proizvodnju  $\alpha$ -amilaza. Uloga azota je višestruka, kao neophodnog elementa za sintezu proteina koji ulazi u sastav apoenzima i kontrolora pH medijuma (El-Fallal et al., 2012). Većina istraživača je zabeležila da organski izvor azota podržava maksimalnu proizvodnju  $\alpha$ -amilaza (Abou et al., 2010; Aqeel & Umar, 2008; Saxena et al., 2007).

### **3.2.2. Amilaze-komercijalna proizvodnja**

Komercijalna proizvodnja enzima je proces koji se odvija u nekoliko koraka prvenstveno zbog toga što faktori koji utiču na optimalan rast mikroorganizma mogu da se razlikuju od faktora koji utiču na proizvodnju enzima. Ovi faktori uključuju suplementaciju nutrijentima, kontrolu pH medijuma, osmotsku ravnotežu, stepen aeracije, kontrolu temperature i kontaminacije tokom fermentacije. Iako detalji o specifičnim fermentacionim procesima koje koriste različiti proizvođači variraju, dve glavne metode za proizvodnju amilaza su submerzna fermentacija i fermentacija na čvrstoj podlozi (Pandey et al., 2000a).

Za komercijalnu proizvodnju  $\alpha$ -amilaza koriste se sojevi *Aspegillus* sp. i *Bacillus* sp. uglavnom *B. amyloliquefaciens* i *B. licheniformis*. Značajnu prednost imaju termostabilne  $\alpha$ -amilaze zato što se njihovom primenom smanjuje mogućnost kontaminacije, skraćuje se reakciono vreme i tako štedi energija.

Nasuprot  $\alpha$ -amilazama, svega nekoliko istraživačkih radova je dostupno o  $\beta$ -amilazama mikrobnog porekla. Bakterijski sojevi koji pripadaju rodovima *Bacillus* (*B. polymyxa*, *B. cereus*, *B. megatarium*), *Pseudomonas* (aerobni mikroorganizam) i *Clostridium* (anaerobni mikroorganizam) sp., sojevi aktinomiceta *Streptomyces* sp. i

sojevi plesni *Rhizopus* sp. proizvode  $\beta$ -amilaze (Rao et al., 2007).  $\beta$ -Amilaze mikrobnog porekla imaju veću temperaturnu stabilnost nego iste biljnog porekla. Takođe,  $\beta$ -amilaze mogu imati viši temperaturni optimum nego  $\alpha$ -amilaze i ne zahtevaju  $\text{Ca}^{2+}$  za stabilizaciju i povećanje aktivnosti (Pandey et al., 2000a).

Ray i saradnici (1997) su poredili proizvodnju  $\beta$ -amilaza iz različitog skrobnog otpada pomoću hiper-amilolitičkog soja *B.megaterium* B6 mutant UN12 u submerznoj fermentaciji i fermentaciji na čvrstoj podlozi. Skrobni otpad koji je korišćen kao supstrat sadržao je otpatke krompira, pirinča, kukuruza, kasave, pšenice, pšeničnih mekinja ivode od kestena pri čemu je najveća proizvodnja  $\beta$ -amilaza dobijena na pšeničnim mekinjama. Takođe korišćene su i imobilisane ćelije *B. megatarium* B6 za poboljšanje enzimske proizvodnje (Pandey et al., 2000a).

### 3.2.3. Industrijska primena amilaza

Najšira primena  $\alpha$ -amilaza je u skrobnoj industriji, gde se amilaze koriste za hidrolizu skroba u procesu utečnjavanja kada se skrob hidrolizuje i dobijaju skrobni sirupi (Laskin et al., 2003; Souza, 2010). Enzimska konverzija skroba obuhvata: želatinaciju koja uključuje razaranje skrobnih zrnaca i formiranje viskozne suspenzije; likvefakciju koja uključuje parcijalnu hidrolizu praćenu smanjenjem viskoznosti; i saharifikaciju, koja uključuje proizvodnju glukoze tokom dalje hidrolize (Gupta et al., 2003; Prakash & Jaiswal, 2010).

Najšira primena je  $\alpha$ -amilaza iz *Bacillus* vrsta i to iz *Bacillus amyloliquefaciens*, *B.stearothermophilus* i *B.licheniformis* (Van Der Maarel et al., 2002). Amilaze iz *Bacillus* sp. su od velikog interesa za primenu u biotehnološkim procesima zbog svoje izvanredne termostabilnosti i izuzetno primenljivog ekspresionog sistema kod ovih enzima (Prakash & Jaiswal, 2010).

Mikrobne amilaze imaju široku primenu u raznim granama prehrambene industrije. Najviše korišćene su amilaze mikrobnog odnosno bakterijskog porekla, kao što je na primer komercijalni preparat Kleistase L koji se koristi u likvefakciji skroba, zatim fungalna glukoamilaza Glyczyme koji se koristi kao saharifikujućim enzim i bakterijska pululanaza Amano koja se koristi kao enzim za hidrolizu razgranatih frakcija. Među saharifikujućim enzimima, glukoamilaza se koristi za proizvodnju

glukoze i njenih izomera, dok se  $\beta$ -amilaze koriste za proizvodnju maltoznih sirupa. Iako se  $\alpha$ -amilaza iz *Aspergillus oryzae* (koja pravi veće količine maltoze) koristi za iste svrhe, njena primena je ograničena, zato što pored maltoze ovaj enzim proizvodi i značajne količine glukoze. Maltoza se koristi kao zaslađivač bombona, raznih slatkiša, sladoleda i druge hrane jer maltoza, u poređenju sa glukozom, ima pun ukus i ne kristališe. Takođe, maltoza ima blago slatkast ukus, blago je obojena što je važno prilikom proizvodnje konditorskih proizvoda.

$\beta$ -Amilaze imaju ulogu u sprečavanju retrogradacije skroba. Ovaj enzim hidrolizuje  $\alpha$ -1,4-glikozidnu vezu u molekulu skroba i proizvodi maltozu i tako redukuje intramolekularne veze linearnog molekula amiloze, za koju se zna da je glavni uzrok retrogradacije skroba. Nastala maltoza ima efekat vlaženja koji utiče na mekoću skrobnih proizvoda. U Japanu,  $\beta$ -amilaze se uglavnom koriste za sprečavanje retrogradacije skroba u pirinčanim kolačima. Takođe u pekarskoj industriji,  $\beta$ -amilaza prirodno prisutna u pšeničnom brašnu, efikasno sprečava pojavu retrogradacije skroba.

U cilju dobijanja  $\beta$ -amilaza za industrijsku primenu, kompanija Amano Enzyme iz Japana je proizvela stabilnu  $\beta$ -amilazu iz roda *Bacillus*. Prečišćavanjem i kloniranjem gena utvrđeno je da se enzim sastoji od 515 amino kiselina sa molekulskom masom od 57,6 kDa. Njegova primarna struktura pokazala je 43-80% slaganja sa prethodnim zabeleženim  $\beta$ -amilazama iz roda *Bacillus*. Utvrđeno je da je optimalna temperatura većaza 10 °C u poređenju sa ječmenim ili pšeničnim enzimima, za koje se smatra da su glavni izvori industrijskih  $\beta$ -amilaza, kao i da je enzim ekvivalentan po termostabilnosti sa enzimima sojinog porekla.

Mikrobne  $\beta$ -amilaze imaju primenu u proizvodnji maltoznih sirupa i u sprečavanju pojave retrogradacije skroba. Kao što je prethodno rečeno, pokazano je da su mikrobne  $\beta$ -amilaze superiornije u odnosu na ječmene i pšenične, koji se trenutno koriste u proizvodnji maltoznih sirupa. Korišćenjem mikrobnih  $\beta$ -amilaza proizvodi se više maltoze koristeći manje enzima, a rizik od mikrobne kontaminacije visokim temperaturama reakcije je smanjen na minimum. Maltozni sirup sadrži nisku koncentraciju glukoze što je poželjna karakteristika ovog sirupa.

Pirinčani kolač koji sadrži  $\beta$ -amilazu ostaje mekan nakon skladištenja u frižideru pri temperaturi od 15 °C 3 dana. U ovom slučaju, čak i mala količina  $\alpha$ -amilaze (kontaminacija  $\alpha$ -amilazom) može napraviti problem - pirinčani kolač postaje

lepljiv. Srećom, bakterijski soj koji se koristi za proizvodnju  $\beta$ -amilaze ne sadrži  $\alpha$ -amilazu što je velika prednost ovog soja.

Biljne  $\beta$ -amilaze, uključujući amilaze iz soje, ne mogu da vrše hidrolizu sirovog skroba i stoga ne mogu da rade na temperaturama nižim od temperature želiranja skroba (60-70 °C). Svakako, mikrobni enzimi su aktivniji na temperaturama nižim od temperature želiranja i zbog toga imaju širi opseg primene, naročito u pekarskoj industriji.

Jedna od prednosti primene mikrobnih enzima, u poređenju sa biljnim, jeste zaobilaženje zahteva za obavezno deklarisanje alergena na hrani. Ovo je posebno značajno za deklarisanje soje i njenih proizvoda kao i hrane bez glutena, pa i zbog toga primena mikrobnih enzima koji ne sadrže alergene nailazi na sve veću primenu.

Amano Enzyme Group je prva kompanija na svetu koja je uspešno komercijalizovala proizvodnju mikrobnih  $\beta$ -amilaza. Ovo su neke njihove bitne karakteristike:

Proizvodnja mikrobnih amilaza zadovoljava industrijske potrebe što nije čest slučaj sa amilazama biljnog porekla; termostabilnost  $\beta$ -amilaza je veća od termostabilnosti biljnih amilaza i ekvivalentna je termostabilnosti sojinih amilaza; mikrobni enzimi ne sadrže alergene i mogu se koristiti u bezglutenskoj hrani ([www.amano-enzyme.co.jp/pdf/wave\\_e/vol13/vol13e\\_p1.pdf](http://www.amano-enzyme.co.jp/pdf/wave_e/vol13/vol13e_p1.pdf)).

Industrija deterdženta je glavni korisnik različitih enzima. Enzimi koji se koriste u formulacijama deterdženata povećavaju stabilnost deterdženta i njegovu sposobnost za uklanjanje fleka čineći ga ekološkim opravdanim sredstvom. Amilaze su druga grupa enzima koja se koristi u deterdžentima i 90% tečnih deterdženata sadrži ove enzime (Gupta et al., 2003; Mitidieri et al., 2006). Ovi enzimi koji se koriste u deterdžentima za mašinsko pranje odeće, pomažu razgradnju skrobaste hrane, na primer ostatke krompira, raznih kremova i soseva, do dekstrina i manjih oligosaharida (Mitidieri et al., 2006; Olsen & Falholt, 1998). Zahtevi za amilaze koje se koriste u deterdžentima su da one budu aktivne i na nižim temperaturama i pri alkalnom pH zadržavajući svoju stabilnost u deteržentu. Takođe, važan kriterijum je i oksidativna stabilnost amilaza prilikom upotrebe u procesu pranja (Chi et al., 2010; Kirk et al., 2002). Uklanjanje skroba sa površine je važno zbog efekta obezbeđivanja beline vlakana, s obzirom da se na skrob mogu vezati čestice prašine. Amilaze koje se

dobijaju iz *Bacillus* sp. i *Aspergillus* sp. se uglavnom koriste u industriji deterdženata (Mitidieri et al., 2006).

Etanol je najviše korišćeno tečno biogorivo. Za proizvodnju etanola, najviše se koristi škrob kao susprtat zbog svoje niske cene i zbog lake dostupnosti širom sveta. Tokom ovog procesa, neophodno je prvo rastvoriti škrob, a zatim ga podvrgnuti dvostepenoj enzimskoj hidrolizi u cilju dobijanja fermentabilnih šećera. Biokonverzija skroba u etanol uključuje likvefaciju i saharifikaciju skroba kada se škrob konvertuje u šećere primenom amilolitičkih enzima odnosno  $\alpha$ -amilazama. Zatim sledi fermentacija kada se šećeri konvertuju u etanol koristeći kvasac *Saccharomyces cerevisiae* (Souza, 2010).  $\alpha$ -amilaze dobijene iz termorezistentnih bakterija kao što je *B.licheniformis* ili iz genetički modifikovane *Escherichie coli* ili *B.subtilis* koriste se u prvom stepenu hidrolize skrobne suspenzije (Sanchez & Cardona, 2008).

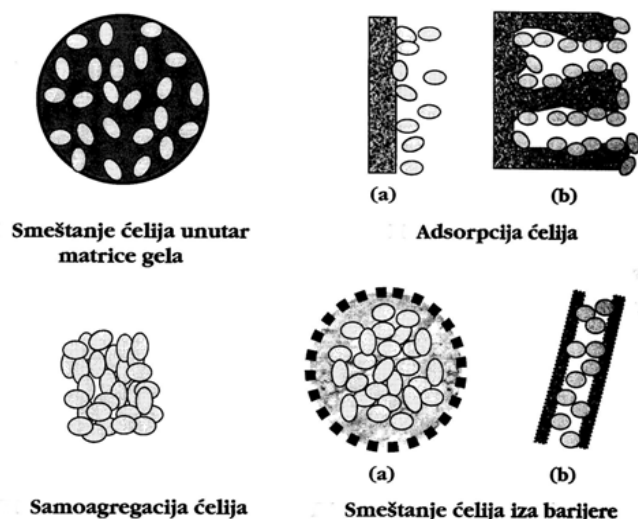
Amilaze se koriste u tekstilnoj industriji u procesima odskrobljavanja tkanine. Tokom tkanja tekstila, škrobna pasta (želatinizirani škrob) se obično koristi za obezbeđivanje čvrstoće tekstila. Škrob je veoma pogodna sirovina za ovakvu primenu zato što je jeftin, lako dostupan i jednostavno se uklanja sa vlakna. Škrob mora biti uklonjen pre sledećeg procesa kao što je bojenje.  $\alpha$ -Amilaze uklanjaju selektivno škrob, pošto hidrolizom nastaju dekstrini koji su lako rastvorni u vodi i uklanjaju se naknadnim pranjem vlakna, pri čemu ne napadaju vlakno (Gupta et al., 2003; Souza, 2010).

U papirnoj industriji  $\alpha$ -amilaze se koriste za modifikaciju skroba koji se nanosi na papir (Souza, 2010). Premazani sloj na papiru treba da učini površinu papira dovoljno glatkom i jakom da poboljša kvalitet pisanja na istom. Za ovu primenu, viskoznost prirodnog skroba je suviše visoka, pa se koriste  $\alpha$ -amilaze koje delimično degradiraju škrobni polimer. Škrob se koristi u završnoj obradi papira poboljšavajući kvalitet i bolje brisanje papira (Gupta et al., 2003; Pandey et al., 2000a). Neki primeri amilaza iz mikroorganizama koji se koriste u papirnoj industriji su Amizyme® (PMP Fermentation Products, Peoria, USA), Termamyl®, Fungamyl, BAN® (Novozymes, Denmark) and  $\alpha$ -amylase G9995® (Enzyme Biosystems, USA) (Saxena et al., 2003).

### **3.3. Povećanje efikasnosti procesa fermentacije -imobilizacija ćelija**

Da bi se povećala efikasnost procesa fermentacije, poslednjih decenija se koriste imobilisane ćelije mikroorganizama. Imobilizacija ćelija predstavlja postupak kojim ćelije mikroorganizama, fizičkim ili hemijskim putem, bivaju pričvršćene za površinu ili smeštene unutar strukture određenog nosača. Imobilizacijom ćelija ne dolazi do gubitka njihove vijabilnosti i katalitičke aktivnosti, a moguće je ostvariti visoku koncentraciju katalitički aktivne biomase kao i blizak kontakt između ćelija i okolnog medijuma, što omogućava postizanje visoke produktivnosti celokupnog procesa. Osnovna prednost imobilisanih ćelijskih sistema u odnosu na konvencionalne suspendovane ćelijske sisteme, jeste u tome što se kontinualni procesi mogu izvoditi bez rizika da će doći do ispiranja ćelija, a takođe imobilizacijom ćelija se postiže efikasna zaštita ćelija od mehaničkih i drugih uticaja (Balać et al., 2010). Takođe, kada se govori o produkciji mikrobnih enzima, imobilisane ćelije mikroorganizama povećavaju proizvodnju samog enzima (Tonkova et al., 1994). Mikroorganizmi vezani za nosač se mogu koristiti u kontinualnim i semi-kontinualnim procesima proizvodnje uz znatnu uštedu troškova proizvodnje. Odabir pogodnog nosača zavisi od nekoliko faktora, a to su fizičko-hemijske karakteristike nosača, poroznost, toksičnost, nerastvorljivost, fleksibilnost, dobra mehanička i hemijska stabilnost i niska cena. Nosači se klasifikuju kao neorganski materijali (zeolit, glina, antracit, porozno staklo, keramika) i kao organski polimeri (Martins et al., 2013).

Postoje četiri osnovne metode imobilizacije a to su: smeštanje ćelija unutar matrice polimernog nosača; adsorpcija ćelija; samoagregacija ćelija i smeštanje ćelija u ili iza barijere nosača.



Slika 3.1. Metode imobilizacije ćelija (Balać et al., 2010)

Kao što se vidi na slici 3.1., postoje različite metode imobilizacije ćelija, od kojih je metoda adsorpcije korišćena u ovoj disertaciji. Metoda adsorpcije se zasniva na stvaranju slabih privlačnih sila između ćelija i inertnih nosača. Veze koje se stvaraju najčešće su kombinacija van der Valsovih, vodoničnih, jonskih i drugih nespecifičnih veza (Balać et al., 2010). Elektrostatičke i hidrofobne interakcije koje utiču na ćelijsku adheziju su ključni faktor u kontrolisanju procesa imobilizacije na nosač (Martins et al., 2013).

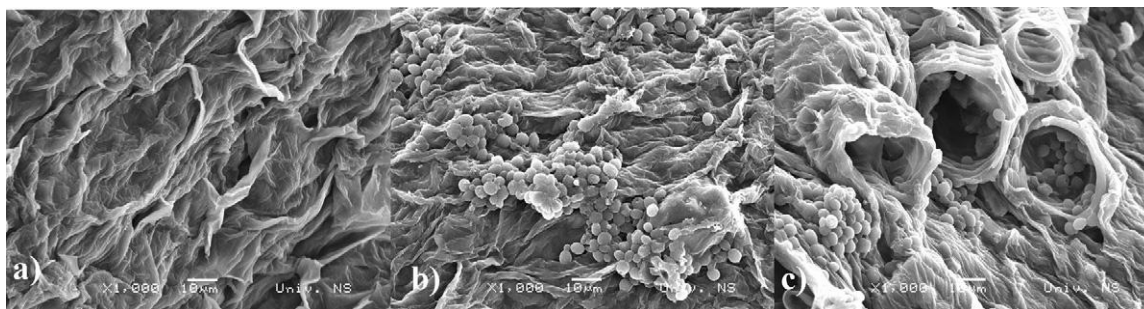
Ovo je ujedno i najjednostavniji i najekonomičniji postupak vezivanja ćelija za čvrsti nosač. Nosači koji se koriste za ovaj tip imobilizacije mogu se podeliti u dve grupe:

1. materijali u čijoj se strukturi nalaze pore malih dimenzija koje ne dozvoljavaju penetraciju mikroorganizama unutar nosača, te stoga vezuju ćelije samo za svoju površinu (slika 3.1.a);

2. nosači sa dovoljno velikim porama koje dozvoljavaju adsorpciju ćelija ne samo po površini, već i unutar strukture nosača (slika 3.1.b) (Balać et al., 2010).

Porozni nosači, kao što su opiljci i komadići, porozne matrice su idealni nosači za ćelijsku adsorpciju zbog visoke specifične površine, dobrih šupljina i pora, biodegradabilnost i niske cene. Njihova prirodna konfiguracija omogućava vezivanje više ćelija u odnosu na ostale nosače (Martins et al., 2013).

U ovoj disertaciji korišćen je kao porozni biomaterijal izluženirepin rezanac koji je poslužio kao nosač za imobilizaciju ćelija *Paenibacillus* sp. CKS1 u cilju bolje proizvodnje enzima amilaza. U literaturi nema dostupnih podataka o imobilizaciji ćelija *Paenibacillus* spp. Repin rezanac, kao nosač za imobilizaciju ćelija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* za proizvodnju bioetanola, korišćen je u radu Vučurović i saradnika (Vučurović & Razmovski, 2012b). Prirodnom adhezijom ćelije kvasca se imobilisu na površini i unutar izluženog repinog rezanca. Do ovakve imobilizacije dolazi usled pojave elektrostatičkih interakcija između nosača i negativno naelektrisane površine ćelija *S.cerevisiae*. Uporedni prikaz izgleda strukture i poroznosti repinog rezanca, kao i imobilizacije ćelija, na osnovu mikrografa skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM), predstavljen je na slici 3.2.



Slika 3.2. Skenirajući elektronski mikrograf (1000 x) a) repinog rezanca i imobilisanih ćelija *S. cerevisiae* b) na površini i c) unutar šupljina repinog rezanca (Vučurović & Razmovski, 2012b)



## CILJ RADA

Osnovni cilj ovog rada je ispitivanje mogućnosti i optimizacija proizvodnje enzima celulaza i amilaza pomoću novog bakterijskog soja *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1 korišćenjem otpadne sirovine uz nastanak vrednih biotehnoloških proizvoda.

Specifični ciljevi disertacije se mogu podeliti u tri grupe koje obuhvataju:

- optimizaciju procesa proizvodnje enzima variranjem uticaja pojedinačnih parametara uz primenu metode planiranog eksperimenta, odnosno statističke metode odzivne površine, uz pomoć *Design Expert* softvera.

- karakterizaciju dobijenih enzima uz određivanje optimalnih uslova njihovog delovanja što uključuje određivanja: opsega temperature, vrednosti pH sredine, uticaj pojedinih jona kao i određivanje molekulske mase.

- ispitivanja mogućnosti potencijalne primene dobijenih enzima.

## EKSPERIMENTALNI DEO

### 4. MATERIJALI I OPREMA

U eksperimentima su korišćeni sledeći materijali i oprema:

#### Materijali:

- mikroorganizmiza proizvodnju enzima: *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1 (prirodni izolat) i *Paenibacillus chitinolyticus* DSM11030, referentni soj;
- otpadne sirovine kao supstrat za gajenje mikroorganizama i sintezu enzima: otpad lekovitog bilja, piljevina, ječmene mekinje, otpadna voda iz industrije prerade kartonske ambalaže, izlužen repin rezanac i melasa.
- materijali za ispitivanje hidrolitičkog potencijala dobijenih enzima: ječmene mekinje i pamučna tkanina.

Otpad lekovitog bilja predstavlja ostatak nakon etanolne ekstrakcije lekovitog bilja: nevena (*Calendulae flos*), kamilice (*Chamomillae flos*), matičnjaka (*Melissae folium*), koprive (*Urticae folium*), timjana (*Thymi folium*), hajdučke trave (*Millefolii herba*), divljeg kestena (*Hippocastani semen*), lincure (*Gentianae radix*), jagorčevine (*Primulae radix*), valerijane (*Valerianae radix*) i gloğa (*Crataegi summitates*). Korišćeni otpad u ovoj doktorskoj disertaciji predstavlja deo od 150 kg ukupnog otpada ovog tipa, koji se godišnje generiše u Institutu za proučavanje lekovitog bilja “Dr. Josif Pančić” u Beogradu.

Korišćena piljevina je dobijena kao otpad nakon čišćenja šumskog zemljišta namenjenog za eksploataciju uglja (Rudarski basen Kolubara, Lazarevac, Srbija).

Korišćen je izlužen repin rezanac pod komercijalnim imenom Fibrex 620 (koji sadrži na 100 g: proteina 8,0; šećera 5,5; masti 1,0; vlakana 67g od kojih je hemiceluloza 42%, celuloza 28%, pektin 27% i lignin 3%; minerala 4,0.) proizvođača Nordic Sugar, Danska.

Melasa (sadržaj, ukupnih šećera 54,8%; ukupni azot 1,48%; masti 0,21%; pepeo 11,33%; suva materija 77,4 2%) je dobijena iz fabrike etanola Alpis, Kovin, Srbija.

Ječmene mekinje su namenjene upotrebi u ljudskoj ishrani i plasirane u maloprodajnim objektima (Proizvođač Klas, Sarajevo, Bosna i Hercegovina; sastav 4,5% celuloza, 35,5% skrob, proteini 17%, masti 4%)

Pamučna tkanina je iskuvana, odskrobljena i beljena (165 g/m<sup>2</sup>). Nečistoće sa tkanine su uklonjene pranjem u 0,5% rastvoru nejonskog sredstva za pranje Felosan RG-N (Bezema, Švajcarska), pri odnosu kupatila 1:50 (1g tkanine u 50 mL rastvora). Posle 15 minuta pranja na 50 °C, tkanina je ispirana jedanput u toploj vodi (50 °C) u trajanju od 3 minuta i tri puta u hladnoj vodi, takođe u trajanju od 3 minuta. Tkanina je zatim sušena na sobnoj temperaturi.

#### **Mikrobiološke podloge:**

- Agar (Torlak, Beograd, Beograd, Srbija)
- Kazein hidrolizat (Torlak, Beograd, Srbija)
- Kvašćev ekstrakt (Torlak, Beograd, Srbija)
- Mesni ekstrakt (Torlak, Beograd, Srbija)
- Pepton (Torlak, Beograd, Srbija)
- Hranljivi bujon (Torlak, Beograd, Srbija)
- ISP1 podloga koja je kombinacija kvašćevog ekstrakta i kazein hidrolizata u određenom odnosu ( 3,0 g/L kvašćevog ekstrakta i 5,0 g/L kazein hidrolizata)

#### **Hemikalije i reagensi:**

- amonijum- nitrat - NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- celobioza-C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>(Sigma, Štajnhajm, Nemačka)
- cink- sulfat- ZnSO<sub>4</sub> (Zdravlje, Leskovac, Srbija)
- di-kalijum-hidrogen-fosfat - K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (E. Merck, Darmstadt, Nemačka)
- di-natrijum-etilendiamintetraacetat EDTA-C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>(Acros Organics, Belgija)
- etanol 100%- C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH(Zorka Farma, Šabac, Srbija)
- fenol- C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH (Lahema, Neratovice, Češka)
- gvožđe-sulfatheptahidrat - FeSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O (Zdravlje, Leskovac, Srbija)
- glicin-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>(Biochemica, Sigma-Aldrich Chemi GmbH, Kina)

- glukoza-C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>(Centrohem, Beograd, Srbija)
- hloroform - CHCl<sub>3</sub>(Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- jod - I<sub>2</sub>(Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kalijum-dihidrogen-fosfat - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(E. Merck, Darmstadt, Nemačka)
- kalijum-jodid - KI (Alkaloid, Skoplje, Makedonija)
- kalijum-hlorid-KCl (Zdravlje, Leskovac, Srbija)
- karboksimetil celuloza CMC (Sigma, Štajnhajm, Nemačka)
- kalcijum-hlorid - CaCl<sub>2</sub>(Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- kalijum-hidroksid-KOH (Centrohem, Beograd, Srbija)
- kalijum-natrijum-tartarat KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>×4H<sub>2</sub>O(Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- kroskarmeloza-Na (J.Rettenmaier&Sohne, Nemačka)
- magnezijum-sulfat- MgCl<sub>2</sub> (HemosMos, Beograd, Srbija)
- magnezijum- sulfat heptahidrat -MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O (Zorka, Šabac, Srbija)
- maltoza-C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> (Fluka AG, Nemačka)
- magnezijum-hlorid –MgCl<sub>2</sub> (Sigma, Stajnhajm, Nemačka)
- mangan- hlorid -MnCl<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- mikrokristalna celuloza Avicel (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- natrijum- acetat-CH<sub>3</sub>COONa (Zdravlje, Leskovac, Srbija)
- natrijum- hlorid - NaCl (Centrohem, Beograd, Srbija)
- natrijum- hidroksid - NaOH (Centrohem, Beograd, Srbija)
- skrob (Merck,Darmstadt, Nemačka )
- tri-natrijum citrat- 3Na-citrat (Merck, Alkaloid Skoplje, Makedonija)
- tri,pet-dinitrosalicilna kiselina C<sub>7</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (Acros Organics, New Jersey, SAD)
- Tris (hidroksimetil) –aminometan (Acros Organics, New Yersey, USA)
- hlorovodonična kiselina - HCl (Zorka Pharma a.d., Šabac, Srbija)
- gencijana violet- boja (Alkaloid Skoplje, Makedonija)
- kristal violet- boja (Centrohem, Beograd, Srbija)
- safranin- boja (Centrohem, Beograd, Srbija)
- Whatman No.1 filter papir (Sigma-Aldrich, Štajnhajm, Nemačka)

## Oprema:

- Mikroskop (Axio Imager A1, Carl Zeiss MicroImaging GmbH., Nemačka)
- Centrifuga (SigmaR model 2-16, Shropshire, Velika Britanije)
- Vorteks (REAX 7000, Heidolph, Schwabach, Nemačka)
- Autoklav (Sutjeska, Srbija)
- Električni rešo (Bauer GH-525, JTD Ltd., Severna Koreja)
- Termostat za rast mikroorganizama (Mettmert, Nemačka)
- Orbitalna tresilica (KS 4000i control, IKAR, Werke GmbH & Co. KG, Nemačka)
- Analitička vaga (AJ100, Mettler Toledo, Švajcarska)
- Skenirajući elektronski mikroskop (MIRA3 XMU, TESCAN, Češka Republika)
- Sušnica (Sutjeska, Srbija)
- Tehnička vaga (Mettler AJ100, Švajcarska)
- pH metar (inoLab pH 720, Nemačka)
- UV-VIS spektrofotometar (Ultrospec 3300 pro, Biochrom Ltd., Cambridge, Velika Britanija)
- Vodeno kupatilo sa mešanjem (model WB/OB 7-45, Memmert, Nemačka)
- Mikrotalasna peć (MC7849HS, LG, Južna Koreja)
- Ultrazvučno vodeno kupatilo (RO-VEP, 40 kHz, Niš, Srbija)
- Elektroforeza (Mini-Protean Tetra Cell, Biorad, Italija)

## 5. METODE

### 5.1. Izolacijam mikroorganizma

Radni mikroorganizam je izolovan iz šumskog zemljišta, šume četinarara, iz podnožja austrijskih Alpa. Soj je izolovan iz uzorka zemljišta, koristeći sledeću proceduru: 1g uzorka zemljišta je prebačen u 9 mL sterilnog fiziološkog rastvora i vorteksiran. Uzorak je ostavljen da se istaloži a potom su uzeti alikvotiod po 1 mL koji su zagrevani pri temperaturi od 80 °C, 10-15 minuta. Uzorci su rastvoreni u 9 mL sterilnog fiziološkog rastvora i alikvoti od po 100 µL su zasejanina ploče sa hranljivim agarom i inkubirana 30 °C u toku 24h. Pojedinačne kolonije koje su porasle na pločama su prečišćene uzastopnim prebacivanjem nekoliko puta na sveže ploče sa hranljivim agarom i čuvane u frižideru do dalje upotebe.

### 5.2. Karakterizacija mikroorganizama

#### *5.2.1. Identifikacija mikroorganizama metodom sekvencioniranja 16S ribozomalne RNK*

16S ribozomalna RNK je manja subjedinica ribozoma koju sačinjava ~1542 nukleotida. Sekvenca gena koja kodira njenu sintezu se danas široko primenjuje u filogenetskim studijama budući da se sastoje od visoko konzerviranih regija koje omogućavaju primenu univerzalnih prajmera i regija visoko varijabilnih sekvenci koje nose specifičnosti vrste prokariotskih ćelija (Grbavčić, 2014).

#### Reagensi:

1M TRIS-HCl pufer pH 8,8 – 60,57 g Tris (hidroksimetil)-aminometana je rastvoreno u približno 500 mL destilovane vode, pH rastvora je podešeno na 8,8 dodatkom 1M NaOH a zatim je rastvor prebačen u normalni sud od 500 mL i dopunjen destilovanom vodom do crte.

0.5M EDTA – 18,6g di-natrijum-etilendiamintetraacetata je rastvoreno u približno 100 mL destilovane vode, pH rastvora je podešeno na 8,8 dodatkom 1M NaOH a zatim je rastvor prebačen u normalni sud od 100 mL i dopunjen destilovanom

vodom do crte. (EDTA se neće rastvoriti dok se pH ne podesi na iznad 8,0. Potrebno je dobro mešati ili zagrevati smešu do potpunog rastvaranja).

3M NaCl- 17,4 g natrijum hlorida je rastvoreno u približno 100 mL destilovane vode, a zatim je rastvor prebačen u normalni sud od 100 mL i dopunjen destilovanom vodom do crte. Rastvor je filtriran a zatim sterilisan u autoklavu i čuvan na sobnoj temperaturi do dalje upotrebe.

3M Na-acetat – 24,6 g natrijum acetata je rastvoreno u približno 100 mL destilovane vode, pH rastvora je podešeno na 8 a zatim je rastvor prebačen u normalni sud od 100 mL i dopunjen destilovanom vodom do crte. Rastvor je filtriran a zatim sterilisan u autoklavu i čuvan na sobnoj temperaturi do dalje upotrebe.

TEN pufer – Pomešano je 4 mL 1M Tris-HCl pufera pH 8,8 sa 800  $\mu$ L 0,5M EDTA pH 8,8 i 40 mL 3M NaCl u čaši od 500 mL. Zatim je dodata destilovana voda do konačne zapremine od 400 mL. Rastvor je filtriran a zatim sterilisan u autoklavu i čuvan na sobnoj temperaturi do dalje upotrebe.

Kiseli fenol-hloroform – Fenol je prvo otopljen na sobnoj temperaturi a potom u vodenom kupatilu na 50 °C. U zapreminskom odnosu 1:1:1/5 je sipan fenol, hloroform i destilovana voda u menzuru (42 °C). Na vrh špatule je dodat hinolin dok tečnost ne postane jako žuta.

Neutralni fenol-hloroform – Kiseli fenol-hloroform, koji je ostavljen preko noći u frižideru na +4 °C, je mešan u zapreminskom odnosu 1:1/2 sa 1M Tris HCl puferom pH 8,8. Uzorak je snažno promućkan i ostavljen u frižideru preko noći na +4 °C. Zatim je izvađena gornja faza i u zapreminskom odnosu 1:1/2 je sipan 1M HCl. Uzorak je snažno promućkan i ostavljen u frižideru preko noći na +4 °C. Uzorak je čuvan u tamnoj boci u frižideru na +4 °C.

1M MgCl<sub>2</sub> – 0,95 g magnezijum-hlorida je rastvoreno u približno 5 mL destilovane vode a zatim je rastvor prebačen u normalni sud od 5 mL i dopunjen destilovanom vodom do crte.

Za izolaciju genetičkog materijala korišćena je kultura koja je narasla u tečnoj ISP1 podlozi (kvašćev ekstrakt 3,0 g/Li hidrolizat kazeina 5,0 g/L) u koju je zasejan 10% inokulum sveže čiste kulture. Uzorak je inkubiran na 30 °C u toku 24 h kako bi bakterija porasle do srednjelog faze, kako bi se izbegao nastanak spora, što bi otežalo,

ili čak onemogućilo, izdvajanje hromozomalne DNK. Zatim je 1,5 mL kulture oprano u 900  $\mu$ L TEN pufera. Smeši su dodate staklene kuglice i 200  $\mu$ L SDS i vorteksirano je još 30 sekundi. Zatim je dodato 100  $\mu$ L neutralnog fenol hloroforma. Uzorak je vorteksiran 30 sekundi i centrifugiran 5 min na 13000 rpm. Supernatant je sakupljan bez uzimanja međufaze. Ovaj korak sa dodavanjem fenola je ponavljan 2 puta tj. dok bela međufaza, koja sadrži proteine nije iščezla. Zatim je uzorak inkubiran 5 min na sobnoj temperaturi, a potom centrifugiran 10 min na 13000 rpm. Supernatant je odliven, talog centrifugiran još 2 minuta pri čemu je sva tečnost odstranjena automatskom mikropipetom. Pelet je resuspendovan vorteksiranjem u 300  $\mu$  L rastvora dobijenog mešanjem 100  $\mu$ L 3M Na-acetata, 10  $\mu$ L 1M  $MgCl_2$  i 890  $\mu$ L destilovane vode. Zatim je dodato 700  $\mu$ L 100% etanola prethodno ohlađenog na  $-20^\circ C$ , mešano i ostavljeno u frižideru tokom noći. Nakon centrifugiranja, supernatant je odstranjen i dodat je 75% etanol prethodno ohlađen na  $-20^\circ C$ , smeša je promešana i centrifugirana 5 min na 13000 rpm. Nakon toga supernatant je brzo odliven. Zatim je centrifugirano još 2 minuta i mikropipetom je odstranjena sva tečnost. Pelet je sušen na sobnoj temperaturi a zatim resuspendovan u 10  $\mu$ L destilovane dejonizovane vode. Uzorak je dalje podvrgnut elektroforezi na agarози, kojom je vršeno razdvajanje fragmenata izolovane hromozomalne DNK.

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

1. Termičku denaturaciju DNK koja se izvodi inkubacijom PCR reakcione smeše na  $95^\circ C$  (kada dolazi do raskidanje vodoničnih veza između dva komplementarna lanca DNK kako bi moglo doći do hibridizacije prajmera);

2. Hibridizaciju prajmera sa matricom, odnosno uspostavljanje vodoničnih veza između prajmera i komplementarne sekvence na matrici. Izvodi se na temperaturi od  $42^\circ C$  do  $65^\circ C$  u zavisnosti od dužine i nuklotidne sekvence prajmera;

3. Produžavanje (elongacija) prajmera, ugradnja nukleotida po principu komplementarnosti baza počev sa DNK matricom od 3' krajeva prajmera. Ova reakcija



je katalizovana termostabilnom DNK polimerazom (*Taq* polimeraza) i odvija se na temperaturi od 72 °C koja je optimalna za rad ovog enzima.

PCR reakcija je izvršena korišćenjem GoTaq<sup>®</sup> qPCR komercijalnog paketa, u okviru kojeg se nalazi GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix koji sadrži sve potrebne komponente za odigravanje amplifikacije, izuzev šablonske DNK i prajmera (GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix sadrži smešu nukleotida, *Taq* polimerazu, neophodne jone Mg<sup>2+</sup> i pufer koji obezbeđuju optimalnu aktivnost enzima). Reakcija amplifikacije je izvršena uz korišćenje prajmera UNI16SF 5'-GAG AGT TTG ATC CTG GC-3' i UNI16SR 5'-AGG AGG TGA TCC AGC CG-3'(Grbavčić, 2014).

Reakcija amplifikacije gena je izvršena u PCR automatu (QB-24 LKB, Austria) sa univerzalnim bakterijskim prajmerima UNI16SF i UNI16SR koristeći celokupnu DNK kao matricu. Smeša za PCR (50 µL) se sastojala od 25 µL GoTaq Green PCR MasterMix (Promega, USA), 1 µLmatrične DNK, 1 µl svakog prajmera i 22 µl ultra-čiste Nuclease free water (Promega, USA). PCR umnožavanje je izvedeno sa početnom temperaturom denaturacije od 95 °C 5 min koje je praćeno sa 35 ciklusa denaturacije na 95 °C 30 s; zatim je usledila hibridizacija prajmera na 55 °C u trajanju 1 min i zatim elongacija na 72 °C u trajanju 1 min dok je proces završen sa još 10 min finalne ekstenzije na 72 °C.

Rezultati PCR-a su detektovani elektroforezom na agaroznom gelu (1%) i zatim prečišćeni korišćenjem gotovog paketa QiaquickPCR Purification Kit (Qiagen, USA) po uputstvu proizvođača. Amplifikovana DNK je sekvencionirana u MacroGen Europe Inc. (Amsterdam, Holandija) automatizovanim DNA analyzer 3730xl (Applied Biosystems, Foster City, USA) uz korišćenje BigDye™ cycle sequencing kit (Applied Biosystems, FosterCity, CA). Dobijena sekvenca je podvrgnuta BLAST analizi u okviru NCBI baze podataka.

### ***5.2.2. Ispitivanje sposobnosti rasta mikroorganizma na različitim temperaturama***

Ispitivanje sposobnosti bakterijskog rasta na različitim temperaturama vršeno je u hranljivom bujonu, zasejanom sa 1% čiste kulture i inkubiranom na 25 °C, 30 °C, 37 °C i 45 °C. Nakon 24 h merene su optičke gustine na 570 nm.

### ***5.2.3. Ispitivanje sposobnosti rasta mikroorganizma pri različitim pH***

Ispitivanje sposobnosti bakterijskog rasta pri različitim pH vrednostima podloge vršeno je u hranljivom bujonu sa podešenim pH vrednostima pomoću 1 M HCl ili 1M NaOH. Podloge su zasejane sa 1% čiste kulture i inkubirane na 30 °C. Merenje optičke gustine na 570 nm je vršeno nakon 24 h.

### ***5.2.4. Određivanje osnovnih biohemijskih karakteristika radnog mikroorganizma***

U cilju boljeg karakterisanja radnog mikroorganizma, urađeni su sledeći biohemijski testovi: bojenje po Gramu, ispitivanje sposobnosti anaerobnog rasta, test na katalazu, korišćenje citrata, test na indol, butandiolna fermentacija, oksidativno-fermentativni test (OF) i Voges-Proskauer (VP) i metil crveno (MR) test (Vasanthakumari, 2009).

## **5.3. Određivanje enzimske aktivnosti**

### ***5.3.1. Dokazivanje celulolitičke aktivnosti- skринing***

Pojedinačne kolonije soja *P. chitinolyticus* CKS1 sa hranljivih agarnih ploča su prebačene na tečnu podlogu sa karboksimetil celulozom (CMC), pH 7, sledećeg sastava: CMC 1,0 g/L, kvaščev ekstrakt 3,0 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3,0 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,0g/L, MgSO<sub>4</sub> 0,5 g/L. Semikvantifikacija celulolitičkog potencijala se radi na CMC agarnim pločama koje su istog sastava kao CMC tečna podloga uz dodatak 8,0 g/L agara. Pet mikrolitara bakterijske suspenzije, koja je prethodno rasla u tečnoj CMC je naneto na CMC agarnu ploču. Nakon inkubacije od 24 h ploče su bojene jodnim rastvorom (2,0 g KI i 1,0 g I<sub>2</sub> u 300 mL destilovane vode) 3-5 minuta. Bistre zone koje su se pojavile oko rasta bakterijske kolonije su dokaz za celulitičku aktivnost (Kasana et al., 2008).

### ***5.3.2. Dokazivanje amilolitičke aktivnosti- skringing***

Pojedinačne kolonije soja CKS1 sa hranljivih agarnih ploča su presejane na tečnu podlogu sa skrobom (pH 7) sledećeg sastava: skrob 5,0g/L, kvašćev ekstrakt 3,0g/L i hidrolizat kazeina 5,0g/L. Semikvantifikacija amilolitičkog potencijala je rađena na skrobnim agarnim pločama koje su istog sastava kao skrobna tečna podloga uz dodatak 8,0 g/L agara. Pet mikrolitara bakterijske suspenzije, koja je prethodno rasla u tečnoj skrobnoj podlozi je naneto na skrobnu agarnu ploču. Nakon inkubacije od 24 h ploče su bojene jodnim rastvorom (2,0 g KI i 1,0 g I<sub>2</sub> u 300 mL destilovane vode) 3-5 minuta. Bistre zone koje su se pojavile oko rasta bakterijske kolonije ukazuju na amilolitičku aktivnost.

### ***5.3.3. Izolovanje sirovog enzima iz fermentacione podloge***

U ispitivanjima proizvodnje enzima, kao inokulum je korišćena prekonocna kultura (radni mikroorganizam) *P. chitinolyticus* CKS 1 gajena u ISP1 podlozi (3,0 g/L kvašćevog ekstrakta i 5,0 g/L hidrolizat kazeina) na orbitalnoj tresilici (150rpm, 30 °C). Sve podloge koje su korišćene u eksperimentima su sterilisane u autoklavu pri temperaturi od 120 °C 30 minuta a zatim su inokulisane prekonocnom radnom kulturom u procentu koji je definisan za dati eksperiment i inkubirane na orbitalnoj tresilici pri brzini obrtaja od 150 rpm 48h (ili kako je naznačeno u pojedinačnom eksperimentu) pri temperaturi od 30 °C. Nakon inkubacije vršeno je odvajanje ćelija mikroorganizma iz podloge centrifugiranjem uzorka na 6000 o/min 15 min. Dobijeni supernatant koji sadrži sirovi enzim je čuvan u frižideru i kao takav korišćen za određivanje enzimske aktivnosti.

### ***5.3.4. Određivanje aktivnosti celulaza***

Aktivnost celulaza je određivana metodom po Mileru (Miller, 1959), koja se zasniva na redukciji 3,5-dinitrosalicilne kiseline u prisustvu glukoze, oslobođene enzimskom hidrolizom celuloze. Celulaze hidrolizuju celulozu do slobodnih glukoznih

jedinica, koje reaguju sa 3,5-dinitrosalicilnom kiselinom (DNS) i obrazuju obojeni kompleks, koji se detektuje spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 540 nm.

Reagensi:

1% CMC –1,0g CMC je rastvoren u 100 mL 0,1M citratnog pufera pH 4,8. Rastvor je ostavljen na sobnoj temperaturi 24 h da se CMC potpuno rastvori.

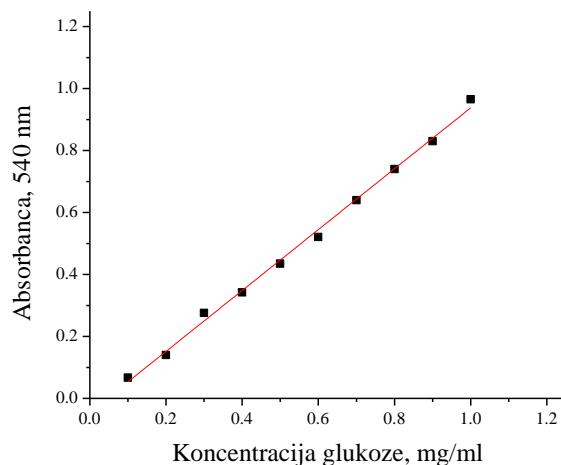
1% Avicel –1,0 g Avicel-a je rastvoren u 100 mL 0,1M citratnog pufera pH 4,8. Rastvor može odmah da se koristi.

0,1 M citratni pufer pH 4,8 –14,70 g tri-natrijum-citrata je rastvoreno u približno 500 mL destilovane vode, pH rastvora je podešen na 4,8 dodatkom 1M HCl, a zatim je rastvor prebačen u normalni sud od 500 mL i dopunjen destilovanom vodom do crte.

DNS rastvor –5,0 g dinitro salicilne kiseline (DNS) je pomešana sa 8,0 g NaOH u 200 mL destilovane vode. Posebno je izmereno 150,0 g K, Na-tartarata i rastvoreno u 150 mL destilovane vode. U normalnom sudu od 500 mL oba rastvora su pomešana i dopunjena destilovanom vodom do crte. Uzorak je profiltriran kroz filter papir.

Određivanje standardne krive:

Napravljen je osnovni rastvor glukoze koncentracije 2,0 mg/mL i odatle su napravljena razblaženja u opsegu od 0,1-1,0 mg/mL. U svaku epruvetu dodato je po 1 mL DNS rastvora, zatim je smeša zagrevana na 90 °C na vodenom kupatilu u trajanju od 5 minuta. Nakon hlađenja, u svaku epruvetu je dodato po 5 mL destilovane vode. Apsorbance sumerene na spektrofotometru na talasnoj dužini  $\lambda=540$  nm i na osnovu dobijenih podataka konstruisana je standardna kriva za glukozu. Standardna kriva za određivanje koncentracije redukujućih šećera, izraženih kao glukozu, prikazana je na slici 5.1. Za crtanje grafika korišćen je softver OriginPro® v8.0.



Slika 5.1. Standardna kriva za određivanje sadržaja glukoze

Dobijena jednačina standardne krive je:

$$Y = 0,982 X - 0,044 \quad R^2 = 0,996 \quad (5.1.)$$

Y – absorbanca uzorka (540 nm),

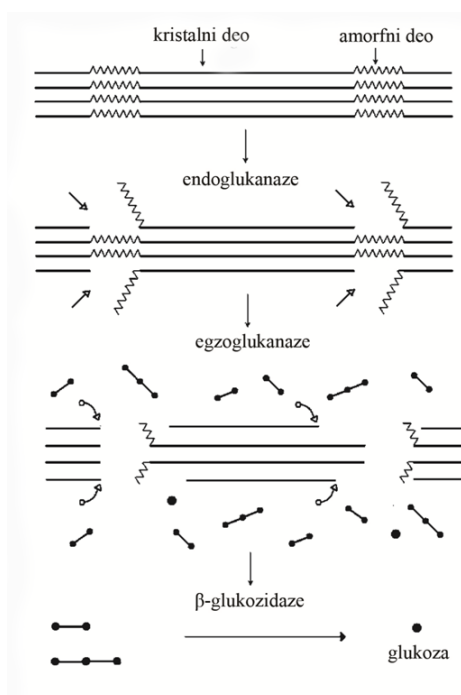
X – koncentracija glukoze (mg/mL).

Kao što je napred navedeno, celulaze su kompleksni enzimi koji se sastoje od najmanje tri grupe celulaza: endoglukanaza, egzoglukanaza i  $\beta$ -glukozidaza (slika 5.2.).

Endoglukanaze hidrolizuju nasumice  $\beta$ -1,4 glikozidne veze u celuloznom lancu i stvaraju nove krajeve na koje deluju egzoglukanaze. Endoglukanaze hidrolizuju amorfnu celulozu. U literaturi se za određivanje ove aktivnosti kao supstrat koristi amorfna karboksimetil celuloza - CMC, pa se shodno tome, ova aktivnost naziva još i CMC-azna.

Egzoglukanaze deluju sa redukujućih i neredukujućih krajeva celuloznog lanca, oslobađaju celobiozu ali i glukozuu nekim slučajevima. Egzoglukanaze hidrolizuju kristalnu celulozu. U literaturi se za određivanje ove aktivnosti kao supstrat koristi mikrokristalna celuloza - Avicel, pa se shodno tome, ova aktivnost naziva još i Avicelazna.

$\beta$ -glukozidaze (celobiaze) hidrolizuju celobiozu do glukoze.



Slika 5.2. Grafički prikaz hidrolize celuloze pomoću enzima celulaza

#### Određivanje aktivnosti celulaza:

CMC-azna aktivnost određivana je po sledećoj proceduri: 500  $\mu\text{L}$  enzimskog rastvora (sirovi bakterijski supernatant) je pomešano sa 500  $\mu\text{L}$  1% CMC (w/v) u 0,1M acetatnom puferu (pH 4,8) i inkubirano na orbitalnoj tresilici bri brzini obrtaja od 150 rpm, na 50 °C 30 min. Zatim je dodat 1 mL DNS reagensa, reakciona smeša jekuvana 5 minuta, hladena do sobne temperature a zatim mešana sa 5 mL destilovane vode. Absorbanca je čitana na spektrofotometru pri talasnoj dužini od 540 nm nasuprot slepe probe (inaktivisani nzim). Slepa proba je pripremana tako što je u 1mL DNS reagensa dodato 500  $\mu\text{L}$  enzimskog rastvora (sirovog bakterijskog supernatanta) i 500  $\mu\text{L}$  1% CMC (w/v) u 0,1M acetatnom puferu (pH 4,8) a potom je reakciona smeša odmah kuvana 5 minuta, hladena do sobne temperature i mešana sa 5 mL destilovane vode. Koncentracija redukujućih šećera, izraženih kao glukoza, je određivana iz standardne krive a zatim je računata celulazna aktivnost po jednačini (5.2.). Jedna jedinica CMC-azne aktivnosti (UI) se definiše kao količina enzima koja oslobađa 1  $\mu\text{mol}$  glukoze u minuti.

$$UI = \frac{C_{glukoze} \cdot V_{ukupno}}{Mr_{glukoze} \cdot t \cdot V_{enzima}} \quad (5.2.)$$

$C_{glukoze}$  – koncentracija glukoze, mg/mL

$Mr_{glukoze}$  – molekulska masa glukoze

t- vreme inkubacije, min

$V_{ukupno}$  – ukupna zapremina reakcione smeše, mL

$V_{enzima}$  – zapremina enzima u reakcionoj smeši, mL

Avicelazna aktivnost je određivana pri temperaturi od 80 °C po istom postupku kao i CMC-azna aktivnost pri čemu je umesto 1% (w/v) CMC korišćen 1% (w/v) Avicel.

U tabeli 5.1. dat je prikaz osnovnih uslova prilikom određivanja CMC-azne i Avicelazne aktivnosti

Tabela 5.1. Osnovni uslovi prilikom određivanja CMC-azne i Avicelazne aktivnosti

Tip celulazne aktivnosti	Supstrat	T, °C	pH
CMC-azna	1% CMC	50	4,8
Avicelazna	1% Avicel	80	4,8

### 5.3.5. Određivanje aktivnosti amilaza

Aktivnost amilaza je određivana DNS metodom po Mileru (Miller, 1959).

Reagensi:

0,016M Na-acetatni pufer pH 4,8–0,328 g natrijum-acetata (trihidrata) je rastvoreno u nešto manje od 250 mL destilovane vode. pH rastvora je podešeno na 4,8 sa 1M HCl, a potom je rastvor prebačen u normalni sud od 200 mL i dopunjen destilovanom vodom do crte i kao takav čuvan u frižideru do dalje upotrebe.

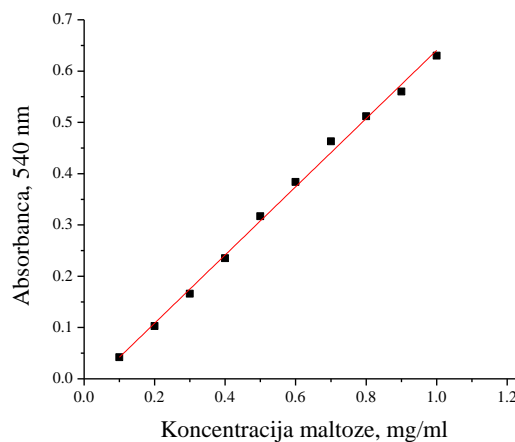
0,02M Na-fosfatni pufer pH 6,9–1,901 g natrijum-fosfata i 0,087 g NaCl je odmereno i rastvoreno u nešto manje od 250 mL destilovane vode. pH rastvora je

podešen na 6,9 sa 1M NaOH, a potom je rastvor prebačen u normalni sud od 200 mL i dopunjen destilovanom vodom do crte i kao takav čuvan u frižideru do dalje upotrebe.

1% skrob –1,0 g skroba je rastvoren u 100 mL odgovarajućeg pufera pH 4,8 ili pH 6,9. Rastvor je zagrevan dok se skrob ne rastvori (bistar rastvor), dopunjen do crte i čuvan u frižideru do dalje upotrebe.

#### Određivanje standardne krive:

Napravljen je osnovni rastvor maltoze poznate koncentracije 2,0 mg/mL i odatle su napravljena razblaženja u opsegu od 0,1-1,0 mg/mL. U svaku epruvetu dodato je po 1mL DNS-a, zatim je smeša zagrevana na 90°C na vodenom kupatilu u trajanju od 5 minuta. Nakon hlađenja, u svaku epruvetu je dodato po 5 mL destilovane vode. Apsorbance su merene na spektrofotometru na talasnoj dužini  $\lambda=540$  nm i na osnovu dobijenih podataka konstruisana je standardna kriva za maltozu. Standardna kriva za određivanje koncentracije redukujućih šećera, izraženih kao maltoza, prikazana je na slici 5.3. Za crtanje grafika korišćen je softver OriginPro® v8.0.



Slika 5.3. Standardna kriva za određivanje sadržaja maltoze

Dobijena jednačina standardne krive je:

$$Y = 0,665 X - 0,0024 \quad R^2 = 0,996 \quad (5.3.)$$

Y – absorbanca uzorka (540 nm),

X – koncentracija maltoze (mg/mL).



#### Određivanje aktivnosti amilaza:

Određivanje aktivnosti amilaza se vrši po modifikovanoj metodi Bernfeld metodi (Bernfeld, 1955). Određivana je aktivnost  $\alpha$ -amilaza na pH 6,9 i  $\beta$ -amilaza na pH 4,8.

#### Određivanje aktivnosti $\alpha$ -amilaza (pH 6,9):

Aktivnost amilaza je određivana po sledećoj proceduri: 500  $\mu$ l enzimskog rastvora (sirovi bakterijski supernatant) je pomešano sa 500  $\mu$ l 1% skroba (w/v) u 0,02 M Na-fosfatnom pufera pH 6,9 i inkubirano na orbitalnoj tresilici bri brzini obrtaja od 150 rpm, na 50 °C u trajanju od 15min. Zatim je dodato po 1 mL DNS reagensa, reakciona smeša je kuvana 5 minuta, potom hladena do sobne temperature a zatim je u smešu dodato 5 mL destilovane vode. Absorbanca su čitane na spektrofotometru pri talasnoj dužini  $\lambda=540$  nm nasuprot slepe probe (inaktivisani enzim). Slepa proba je pripremana tako što je u 1mL DNS reagensa dodato 500  $\mu$ L enzimskog rastvora (sirovog bakterijskog supernatanta) i 1% skroba (w/v) u 0,02M Na-fosfatnom puferu pH 6,9 a potom je reakciona smeša odmah kuvana 5 minuta, hladena do sobne temperature i mešana sa 5 mL destilovane vode.

Koncentracija redukujućih šećera, izraženih kao maltoza, određivana je iz standardne krive a zatim je računata amilazna aktivnost amilaza po jednačini (5.3.) gde se umesto glukoze koristi maltoza. Jedna jedinica  $\alpha$ -amilazne aktivnosti (UI) se definiše kao količina enzima koja oslobađa 1  $\mu$ mol maltoze u minuti.

Aktivnost  $\beta$ -amilaza određivana je po istoj proceduri kao aktivnost  $\alpha$ -amilaza pri čemu je umesto 0,02M Na-fosfatnog pufera pH 6,9 korišćen 0,016M Na-acetatni pufer pH 4.8.

U tabeli 5.2. dat je prikaz osnovnih uslova prilikom određivanja aktivnosti  $\alpha$ -amilaza i  $\beta$ -amilaza.

Tabela 5.2. Osnovni uslovi prilikom određivanja aktivnosti  $\alpha$ -amilaza i  $\beta$ -amilaza

Tip amilazne aktivnosti	Supstrat	T, °C	pH
$\alpha$ -amilazna	1% skrob	50	0,02M Na-fosfatni pufer pH 6,9
$\beta$ -amilazna	1% skrob	50	0,016M Na-acetatni pufer pH 4,8

## 5.4. Proizvodnja celulaza

Proizvodnja celulaza ispitana je u tečnim podlogama, na komercijalnim supstratima i u podlogama obogaćenim otpadnim sirovinama. Takođe, ispitana je i mogućnost proizvodnje celulaza na čvrstom otpadnom supstratu.

### 5.4.1. Proizvodnja celulaza u tečnim podlogama submerznim postupkom

Ovaj deo eksperimentalnih podataka, podeljen je u 4 eksperimenta. U 1. i 2. eksperimentu je ispitivana proizvodnja celulaza u komercijalnim hemijski definisanim podlogama dok su eksperimenti 3 i 4 rađeni u podlogama obogaćenim otpadnim sirovinama za proizvodnju celulaza.

#### 5.4.1.1. Proizvodnja celulazau komercijalnim podlogama

Preliminarna ispitivanja proizvodnje celulaza (eksperiment 1) odnosila su se na proizvodnju samo jedne vrste celulaza odnosno endoglukanaza čija je aktivnost praćena na suspratu CMC pa je u daljem tekstu ova aktivnost oznaćena kao CMC-azna aktivnost.

U ostalim eksperimentima praćena je proizvodnja dve vrste celulaza (endoglukanaza i egzoglukanaza), a njihova aktivnost je izraćavana kao CMC-azna i Avicelazna aktivnost, pojedinaćno.

#### Eksperiment 1

Proizvodnja endoglukanaza je ispitivana u neoptimizovanoj tećnoj podlozi (pH 7) koja se sastojala od CMC 5,0 g/L, kvašćevog ekstrakta 3,0 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4,0g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  4,0g/L,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0,2g/L,  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  0,001g/L i  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0,004 g/L.

Ispitivan je uticaj sledećih razlićitih faktora na proizvodnju endoglukanaza: uticaj pasaćiranja kulture, vreme inkubacije, uticaj pH medijuma, uticaj razlićitih izvora ugljenika i koncentracija optimalnog izvora ugljenika, uticaj razlićitih izvora azota i

koncentracija optimalnog izvota azota kao i uticaj različitih zapremina medijuma i brzine mešanja.

Uticaj pasažiranja kulture je ispitivan određujući CMC-aznu aktivnost nakon zasejavanja bakterijske kulture svakih 24 sata u svežu podlogu (pasažiranje) koji sadrži CMC kao induktor proizvodnje endoglukanaza. CMC-azna aktivnost je određivana u svakom pasažu 4 dana.

Uticaj vremena inkubacije je ispitivan uzimajući uzorak na svaka 24 sata, tokom pet dana inkubacije, a potom je određivana CMC-azna aktivnost.

Uticaj početne vrednosti pH podloge je ispitivan podešavajući pH podloge na 4, 5, 6, 7, 8, 9 i 10 pomoću 1M NaOH ili 1M HCl pre sterilizacije. CMC-aktivnost je određivana trećeg dana inkubacije.

Uticaj različitih izvora ugljenika je ispitivan pojedinačnim dodavanjem različitih izvora ugljenika (CMC, Avicel, celobioza i kroskarmeloza-Na) pojedinačno u podloguu koncentraciji od 2,5 g/L. Utvrđeno je da je optimalan izvor ugljenika celobioza, pa je u daljem eksperimentu praćen uticaj različitih koncentracija ovog šećera (1,5, 2,5, 5,0, 6,0 i 7,0 g/L) na proizvodnju endoglukanaza.

Uticaj različitih izvora azota je ispitivan pojedinačnim dodavanjem različitih izvora azota- kvašćevog ekstrakta, triptona, mesnog ekstrakta i  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  pojedinačno u podlogu u koncentraciji od 3,0 g/L. Za optimalan izvor azota (kvašćev ekstrakt) praćen je uticaj različitih koncentracija kvašćevog ekstrakta (2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 i 7,0 g/L) na CMC-aznu aktivnost.

Uticaj različitih zapremina podloge je ispitivan korišćenjem u različitim radnih zapreminapodloge tokom fermentacije 40, 100 i 150 mL u 500 mL erlenmajera na tresilici sa brzinom obrtaja 150 rpm. Ispitan je i uticaj različitih brzina mešanja tresilice 100, 120 i 150 rpm pri konstantnoj radnoj zapremini podloge od 40 mL u 500 mL erlenmajera na proizvodnju endoglukanaza.

### Eksperiment 2

CMC-azna i Avicelazna aktivnost je ispitivana u modifikovanoj ISP1 tečnoj podlozi koji se sastojala od 5,0 g/L kvašćevog ekstrakta i 3,0 g/L kazein hidrolizata u 0,1M fosfatnom puferu pH 7 sa pojedinačnim dodatkom izvora ugljenika (CMC, Avicel i celobioza) u koncentraciji od 5,0 g/L. Ispitan je uticaj različitih koncentracija celobioze na proizvodnju celulaza (1,0; 2,5; 5,0; 7,5 i 10,0 g/L).

#### *5.4.1.2. Proizvodnja celulaza u podlogama obogaćenim otpadnim sirovinama*

Ovaj deo eksperimenata, odnosio se na ispitivanje mogućnosti proizvodnje celulaza u podlogama obogaćenim otpadnim sirovinama. U eksperimentu 3 ispitan je uticaj obogaćivavnja podloge piljevinom i otpadnim lekovitim biljem na produkciju i aktivnost endoglukanaza i egzoglukanaza u podlozi obogaćenoj piljevinom i otpadnim lekovitim biljem, pojedinačno, dok se eksperiment 4 odnosio na ispitivanje proizvodnje endoglukanaza i egzoglukanaza u podlozi obogaćenoj ječmenim mekinjama.

##### Eksperiment 3

Ispitivanje proizvodnje endoglukanaza i egzoglukanaza na otpadnim sirovinama, vršeno je u modifikovanoj ISP1 tečnoj podlozi sa pojedinačnim dodatkom dve otpadne sirovine – otpadnog lekovitog bilja i piljevine. Preliminarnim ispitivanjima (bez prikaza rezultata) određene su optimalne koncentracije otpadnih supstrata, piljevine i otpadnog lekovitog bilja koje su korišćene u nastavku eksperimenta. 0,3% (w/v) piljevine i 0,1% (w/v) otpadnog lekovitog bilja je pojedinačno dodato u agaru podlogu (0,5% agar-agar). 10 mL agarne podloge je razliveno u sterilne Petri šolje ( $\phi$  4.5 cm). Nakon očvršćavanja, agarna podloga je mešana sa 100mL sterilne ISP1 podloge. Ispitivan je uticaj dva faktora na proizvodnju egzoglukanaza: uticaj pH vrednosti podloge i uticaj različitih zapremina podloge i brzine mešanja.

Ispitivanja uticaja pH podloge, vršeno je gajenjem radnog mikroorganizma u modifikovanoj ISP1 podlozi sa otpadnim lekovitim biljem a pH vrednost podloge je podešena odgovarajućim puferima: 0,1M citratni pufer (pH 3,0-6,0), 0,1M natrijum-fosfatni pufer (pH 6,0-7,5), 0,1M Tris-HCl (pH 7.5-9.0), i 0,1M glicin-NaOH (pH 9,0-10,0) pufer (priprema pufera (Vujčić, 2002)). Nakon inkubacije od 48 h pri temperaturi od 30 °C određuje se Avicelazna aktivnost u sirovom supernatantu prethodno oslobođenim od ćelija.

Ispitivanje uticaja različitih zapremina podloge i brzine mešanja vršeno je gajenjem radnog mikroorganizma u modifikovanoj ISP1 podlozi sa lekovitim otpadnim biljem pri pH vrednosti 7 na 30 °C u erlenmajeru od 300 mL sa radnom zapreminom podloge od 50 i 100 mL, kao i u erlenmajerima od po 1000 mL “leteći tanjir”, koji se koriste za aerobno gajenje mikroorganizama, sa radnom zapreminom podloge 100, 150 i 200mL.

#### Eksperiment 4

Ispitivanje proizvodnje endoglukanaza i egzoglukanaza u podlozi obogaćenoj sa otpadnom sirovinom, vršeno je u modifikovanoj ISP1 podlozi (kvašćev ekstrakt 3,0 g/L i hidrolizat kazeina 5,0 g/L) sa dodatkom 5% ječmenih mekinja. Ispitan je uticaj dva faktora na proizvodnju endoglukanaza i egzoglukanaza: uticaj vremena inkubacije i koncentracija inokuluma.

Uticaj vremena inkubacije je ispitivan praćenjem CMC-azne i Avicelazne aktivnosti nakon 24, 48, 72 i 96 h inkubacije.

Uticaj različite koncentracije inokuluma ispitivan je praćenjem CMC-azne i Avicelazne aktivnosti u podlozi sa različitim koncentracijama inokuluma 5, 7, 10 i 12%.

#### ***5.4.2. Proizvodnja enzima na čvrstom otpadnom supstratu***

Da bi se ispitalo, da li radni mikroorganizam može da proizvede celulaze tokom rasta na čvrstom otpadnom supstratu, korišćena je fermentacija mikroorganizma na čvrstoj podlozi ili SSF (eng. *solid state fermentation*) fermentacija. U okviru ovog eksperimenta prikazana je samo proizvodnja celulaza dok proizvodnja amilaza nije prikazana jer nije pokazala detektujuću aktivnost.

##### ***5.4.2.1. Proizvodnja celulaza na izluženom repinom rezancu***

Za ispitivanje proizvodnje endoglukanaza i egzoglukanaza korišćen je izlužen repin rezanac (veličina zrna: 800 μm-2mm) kao čvrst supstrat i melasa kao sredstvo za vlaženje čvrstog supstrata. Fermentacija na čvrstom otpadnom supstratu rađena je po modifikovanoj metodi Moftah i saradnika (Moftah et al., 2012). Eksperiment je izvođen u erlenmajerima od po 300 mL sa 5,0 g izluženog rezanca pri čemu je sadržaj vlage u podlozi podešavan koristeći različite odnose (1:1, 1:2 i 1:3, w/v) izluženog rezanca (čvrsta faza) i rastvora melase (tečna faza). Zasejavan je 10%-tni inokulum. Fermentacija je vršena u termostatu na 30 °C 4 dana. Ekstrakcija enzima je vršena dodavanjem 25 mL 0,1 M citratnog pufera (odnos čvrste faze i pufera 1:5, w/v) pH 4,8 u svaki erlenmajer. Uzorci su mešani na orbitalnoj tresilici (190 rpm, 30 min 25 °C) a

zatim je ceo sadržaj centrifugiran na 600 o/min 10 minuta (+4 °C). Dobijeni bakterijski supernatant (sirovi enzim) je korišćen za određivanje CMC-azne i Avicelazne aktivnosti.

Maksimalnu celulaznu aktivnost pokazala je kultura rasla na podlozi sa 5g izluženog repinog rezanca i 4,5 mL melase. Na ovoj podlozi ispitivan je uticaj različitih koncentracija inokuluma (5, 10 i 15 % (v/w)) i uticaj vremena inkubacije (2, 3, 4, 5 i 6 dana) na proizvodnju endoglukanaza i egzoglukanaza.

Celulazna aktivnost je računata po sledećoj jednačini:

$$\text{Celulazna aktivnost (U/g)} = \text{celulazna aktivnost (U/mL)} * V_{\text{pufera}} / m_{\text{supstrata}} \quad (5.4.)$$

Celulazna aktivnost (U/mL)- CMC-azna i Avicelazna aktivnost, pojedinačno;

$V_{\text{pufera}}$  – zapremina pufera za ekstrakciju enzima, mL,

$m_{\text{supstrata}}$  – masa čvrstog supstrata, g.

## 5.5. Proizvodnja amilaza

Proizvodnja amilaza je ispitana u tečnim komercijalnim podlogama, i na otpadnim sirovinama.

### 5.5.1. Proizvodnja amilaza u komercijalnoj podlozi

U okviru ovog eksperimenta ispitana je proizvodnja oba tipa amilaza:  $\alpha$ -amilaza i  $\beta$ -amilaza.

#### Eksperiment 1

Za ispitivanje proizvodnje amilaza korišćena je modifikovana ISP1 podloga (5,0 g/L kvašćevog ekstrakta i 3,0 g/L kazein hidrolizata) sa dodatkom 10,0 g/L skroba kao supstrata.

### ***5.5.2. Proizvodnja amilaza na otpadnim sirovinama***

Kako proizvodnja  $\beta$ -amilaza nije svojstvena većini mikroorganizama, pristupilo se ispitivanju procesa proizvodnje ovog tipa amilaza. Ispitivanje proizvodnje  $\beta$ -amilaza je vršeno u podlozi koja je sadržala otpadnu vodu iz industrije prerade kartonske ambalaže (eksperiment 2) i u podlozi sa melasom i repinim rezancem (eksperiment 3).

#### **Eksperiment 2**

Za ispitivanje proizvodnje  $\beta$ -amilaza korišćena je otpadna voda, iz industrije prerade kartonske ambalaže, u koju su dodate komponente ISP1 podloge (5,0 g/L kvašćevog ekstrakta i 3,0 g/L kazein hidrolizata). Ispitan je uticaj pasažiranja radnog mikroorganizma na proizvodnju  $\beta$ -amilaza. Aktivnost  $\beta$ -amilaza je određivana nakon zasejavanja 4% bakterijske kulture svaka 24h u svežu podlogu (pasaž).

#### **Eksperiment 3**

Za ispitivanje proizvodnje  $\beta$ -amilaza korišćena je melasa uz dodatak izluženog repinog rezanca. Izluženi repin rezanac (eng. *sugar beet pulp*, SBP) je usitnjen u avanu a zatim prosejan kroz sita do veličine zrna 200-500  $\mu$ m. Dva različita predtretmana izluženog repinog rezanca su korišćena pre njegovog dodavanja u melasu. Prvi predtretman je primena razblaženog rastvora NaOH, a drugi je kombinacija mikrotalasnog i ultrazvučnog zračenja. Alkalni tretman pomoću razblaženog rastvora NaOH je vršen po modifikovanoj metodi Sharma i saradnika (Sharma et al., 2013) tako što je 30,0 g repinog rezanca potopljeno u rastvor 2% NaOH na sobnoj temperaturi. Nakon 2 sata, repin rezanac je ispiran destilovanom vodom dok ne postane neutralan i sterilisan na 121 °C 20 min. Potom je sušen u sušnici na 50 °C preko noći i kao takav je korišćen kao supstrat za fermentaciju. Mikrotalasni i ultrazvučni predtretman je vršen na sledeći način: 5,0 g repinog rezanca je tretirano mikrotalasima snage 500W 1 minut a zatim na ultrazvučnom vodenom kupatilu još 10 minuta. Melasa (30 mL) sa dodatkom repinog rezanca (netretirani rezanac, rezanac tretiran NaOH i rezanac tretiran kombinacijom mikrotalasa i ultrazvuka) u koncentraciji 2% (w/v) je korišćena kao podloga za proizvodnju  $\beta$ -amilaza. Korišćen je 4% inokulum.

## 5.6. Optimizacija procesa proizvodnje celulaza i amilaza-metoda odzivnih površina

Optimizacija procesa proizvodnje enzima vršena je primenom metode planiranog eksperimenta odnosno statističke metode odzivne površine, uz pomoć *Design Expert* softvera.

Planiranjem eksperimenata omogućava se simultano variranje više različitih faktora (parametara) pri čemu se određuje njihov međusobni uticaj, dobijaju se informacije o ispitivanom procesu uz relativno mali broj ponavljanja eksperimenata (Šljivić-Ivanović et al., 2013).

Metoda odzivne površine (eng. *Response Surface Methodology*, RSM) predstavlja grupu matematičkih i statističkih tehnika koje opisuju vezu između testiranih faktora (promenljivih) i jednog ili više odziva odnosno izlaza sistema. Glavni cilj primene RSM je optimizacija procesa i određivanje optimalnih parametara procesa. Korišćenjem ove metode dobija se matematički model kojim se opisuje dati proces. Svaka dobijena jednačina, kojom se opisuje model, predstavlja izlaznu funkciju sistema (zavisnu promenljivu koju ispitujuemo) odnosno odziv. Ove funkcije tj. jednačine se prikazuju grafički kao odzivne površine. Tako se u slučaju lineranih zavisnosti odzivne površine ravne i takav odziv se prikazuje grafikom u dve dimenzije dok se polinomalne funkcije uglavnom prikazuju trodimenziono (Del Castillo, 2007; Lazic, 2006).

Odziv sistema se u okviru nekog procesa može opisati sledećom jednačinom:

$$Y = f(X_1, X_2, \dots, X_k) + \varepsilon \quad (5.5.)$$

gde su  $X_1, X_2, \dots, X_k$  nezavisne procesne promenljive (parametri),  $Y$  je odziv (izlaz) sistema a  $\varepsilon$  je eksperimentalna greška.

Najjednostavniji model koji se koristi u RSM je zasnovan na linearnoj regresiji i može se prikazati sledećom jednačinom polinoma prvog reda:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \varepsilon \quad (5.6.)$$



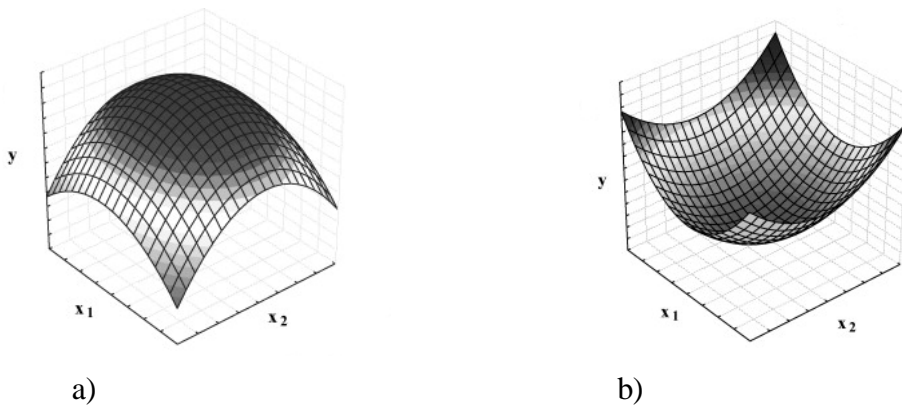
gde su  $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k$  regresioni linerani koeficijenti. Kod ovog modela na odziv sistema utiču samo nezavisne procesne promenljive bez njihove međusobne interakcije (Bezerra et al., 2008).

Kada nije moguće eksperimentalne rezultate prikazati lineranom funkcijom koristi se kvadratni model za opisivanje datog sistema polinomalnom jednačinom drugog reda:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (5.7.)$$

gde je  $Y$  odziv sistema,  $X_i, X_j, \dots, X_k$  su nezavisne promenljive (parametri),  $X_{2i}, X_{2j}, \dots, X_{2k}$  su kvadratni efekti,  $X_i X_j, X_i X_k, X_j X_k$  su interakcioni efekti,  $\beta_0, \beta_i, \beta_{ii}, \beta_{ij}$  su regresioni koeficijenti, pri čemu se  $\beta_i$  ( $i=1, 2, \dots, k$ ) odnosi na linearni efekat,  $\beta_{ii}$  ( $i=1, 2, \dots, k$ ) na kvadratni efekat,  $\beta_{ij}$  ( $i=1, 2, \dots, k; j=1, 2, \dots, k$ ) interakcioni efekat i  $\varepsilon$  je slučajna eksperimentalna greška (Bezerra et al., 2008; Montgomery, 2008).

Odziv sistema dat jednačinom (5.5.) se obično predstavlja grafički prikazom odzivne površine (Slika 5.4.).



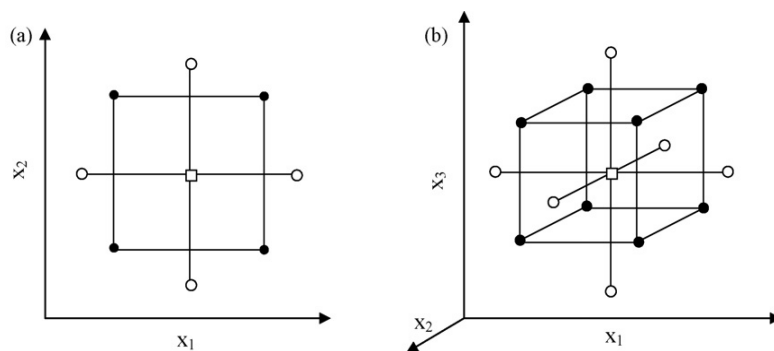
Slika 5.4. Trodimenzioni izgled odzivne površine sa dve procesne promenljive  $X_1$  i  $X_2$  i odzivom sistema  $Y$ : (a) maksimum i (b) minimum (Bezerra et al., 2008)

Osnovni koraci u primeni RSM kao tehnike optimizacije su sledeći: (1) odabir nezavisnih procesnih promenljivih koje značajno utiču na proces; (2) odabir eksperimentalnog dizajna i sprovođenja eksperimenta; (3) aproksimacija eksperimentalnih podataka matematičkim modelom primenom matematičko-statističkih metoda; (4) evaluacija datog modela, (5) verifikacija modela i (6) određivanje optimalnih vrednosti ispitivanih procesnih promenljivih (Bezerra et al., 2008).

Postoji niz različitih metoda (tipova) eksperimentalnog planiranja tj. dizajniranja eksperimenata kao što su: centralni kompozitni dizajn (CCD), kubni dizajn, Box – Behnken-ov dizajn (BBD) itd. Odabir odgovarajućeg modela zavisi od tipa istraživanja. Kada je u pitanju optimizacija nekog procesa, u tom slučaju se najčešće upotrebljavaju CCD i BBD odnosno kvadratni modeli (Del Castillo, 2007).

Najviše korišćeni je Centralni kompozitni dizajn (CCD). Ovaj dizajn su predstavili Box i Wilson (Box & Wilson, 1951). Može se prvo početi sa  $2^k$  faktorijalnim dizajnom a potom dodati centralne i aksijalne tačke i dobiti CCD. Dodatak aksijalnih tačaka kvadratnim članovima omogućava im da budu uključeni u model (Bradley, 2007).

Centralni kompozitni dizajn (CCD) se sastoji iz punog faktorijalnog dizajna sa  $2^k$  eksperimenata na +1 i -1 nivou (k broj procesnih promenljivih), aksijalnog (zvezdastog) dizajna sa  $2 \cdot k$  eksperimenata gde su tačke udaljene na distanci  $\alpha$  od centra i centralne tačke. Slika 5.5. predstavlja grafički prikaz CCD sa dve i tri procesne promenljive. Kod ovog dizajna nezavisne promenljive se ispituju na 5 nivoa:  $-\alpha$ , -1, 0, +1 i  $+\alpha$ , gde vrednosti -1 i +1 predstavljaju donju i gornju granicu, a  $-\alpha$  i  $+\alpha$  predstavljaju ekstremne vrednosti osne udaljenosti (raspodela tačaka oko centralne tačke) (slika 5.6.). Uglavnom se bira da  $\alpha$  vrednost bude takva da dizajn bude rotabilan tj. da sve ispitivane tačke budu jednako udaljene od centralne tačke (Anderson & Whitcomb, 2005; Montgomery, 2008).  $\alpha$  vrednost zavisi od broja faktora i kod sistema sa dve promenljive iznosi 1.41 dok kod sistema sa tri promenljive iznosi 1.68 (Bezerra et al., 2008). Centralne tačke sadrže informacije o zakrivljenosti odzivne površine, ukoliko je zakrivljenost značajna, dodatne aksijalne tačke omogućavaju efikasno predviđanje kvadratnih članova (Bradley, 2007).

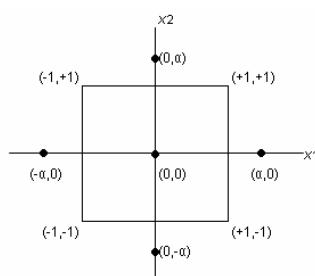


Slika 5.5. Grafičko predstavljanje CCD sa a) 2 procesne promenljive  $X_1$  i  $X_2$  ( $\alpha=1.41$ ) i b) sa tri procesne promenljive  $X_1$ ,  $X_2$  i  $X_3$  ( $\alpha=1.68$ ). (●) tačke faktorijalnog dizajna; (○) aksijalne tačke i (□) centralna tačka (Bezerra et al., 2008).

Na slici 5.6. koordinatna tačka (0,0) predstavlja centralnu tačku u kojoj svaka procesna promenljiva ima srednju vrednost i ponavlja se u eksperimentu pet puta. Ovim ponavljanjem postiže se dobra procena čiste greške. Koordinatne tačke  $(-\alpha, 0; \alpha, 0; 0, \alpha; 0, -\alpha)$  predstavljaju aksijalne tačke tačno udaljene od središta ( $\alpha$ ), dok tačke  $(-1, 1; 1, 1; -1, 1; 1, -1)$  predstavljaju maksimalne i minimalne vrednosti. Ukupni broj eksperimentalnih ponavljanja iznosi

$$N = 2^k + 2k + n_0 \quad (5.9.)$$

gde je  $N$  ukupan broj eksperimenata,  $k$  je broj promenljivih, a  $n_0$  je broj ponavljanja u centralnoj tački (Ukrainczyk, 2010).



Slika 5.6. Grafičko predstavljanje CCD sa 2 procesne promenljive i koordinatnim tačkama (Bradley, 2007).

### 5.6.1. Uslovi procesa optimizacije proizvodnje enzima

Za optimizaciju procesa proizvodnje celulaza na ječmenim mekinjama,  $\beta$ -amilaza na otpadnoj vodi iz industrije prerade kartonske ambalaže i na melasi i izluženom repinom rezancu korišćen je CCD u okviru RSM.

#### 5.6.1.1. Optimizacija procesa proizvodnje celulaza u podlozi sa ječmenim mekinjama

Na osnovu preliminarnih ispitivanja uticaja komponenti na aktivnost celulaza izabrane su dve komponente odnosno procesne promenljive sa najvećim uticajem. Ispitan je uticaj koncentracije ječmenih mekinja (A) i koncentracije kvašćevog ekstrakta (B) na proizvodnju celulaza merenih preko CMC-azne i Avicelazne aktivnosti. Svaka promenljiva je kodirana na 5 različitih nivoa ( $-\alpha$ , -1, 0, 1,  $+\alpha$ ) (Tabela 5.3.).

Tabela 5.3. Vrednosti ispitivanih nivoa dve procesne promenljive, koncentracije ječmenih mekinja i kvašćevog ekstrakta, u eksperimentalnom dizajnu

Procesna promenljiva	Granične vrednosti				
	-1	0	+1	( $-\alpha$ )	( $+\alpha$ )
A: Ječmene mekinje, %	1	2,5	4	0,7	4,3
B: Kvašćev ekstrakt, g/L	2	4	6	1,6	6,4

Rezultati CCD su analizirani multiplom regresionom analizom tako da odgovaraju polinomnom regresionom modelu drugog reda koji sadrži linearni, kvadratni i dvo-faktorski koeficijent interakcije. Model jednačina odzivne funkcije dve procesne promenljive (A i B) je dat sledećom jednačinom (5.10.):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 B + \beta_{12} AB + \beta_{11} A^2 + \beta_{22} B^2 \quad (5.10.)$$

gde je Y (CMC-azna ili Avicelazna aktivnost, U/mL) zavisna promenljiva ili predvideni odziv sistema; A (koncentracija ječmenih mekinja, %), B (koncentracija

kvašćevog ekstrakta, g/L);  $\beta_0$  je odsečak;  $\beta_1$  i  $\beta_2$  su linearni koeficijenti;  $\beta_{11}$  i  $\beta_{22}$  su kvadratni koeficijenti;  $\beta_{12}$  je koeficijent interakcije.

5.6.1.2. Optimizacija procesa proizvodnje  $\beta$ -amilaza na otpadnoj vodi iz industrije prerade kartonske ambalaže

Na osnovu preliminarnih ispitivanja, izabranesu procesne promenljive sa najvećim uticajem na proizvodnju  $\beta$ -amilaza. U konkretnom slučaju, ispitan je uticaj: vremena inkubacije (A), koncentracije inokuluma (B), koncentracije kazein hidrolizata (C) i koncentracije kvašćevog ekstrakta (D) na proizvodnju  $\beta$ -amilaza. Svaka promenljiva je kodirana na 5 različitih nivoa ( $-\alpha$ , -1, 0, 1,  $+\alpha$ ) (Tabela 5.4.).

Tabela 5.4. Vrednosti ispitivanih nivoa četiri procesne promenljive, vremena inkubacije, koncentracije inokuluma, koncentracije kazein hidrolizata i koncentracije kvašćevog ekstrakta, u eksperimentalnom dizajnu

Procesna promenljiva	Granične vrednosti				
	-1	0	+1	Aksijalne ( $-\alpha$ )	Aksijalne ( $+\alpha$ )
A: Vreme inkubacije, h	32	46	60	18	74
B: Inokulum, %	3	4	5	2	6
C: Kazein hidrolizat, g/L	2	3,5	5	0,5	6,5
D: Kvašćev ekstrakt, g/L	2	3,5	5	0,5	6,5

Rezultati CCD su analizirani višestrukom regresionom analizom tako da odgovaraju polinomnom regresionom modelu drugog reda koji sadrži linearni, kvadratni i dvo faktorski koeficijent interakcije. Model jednačine odzivne funkcije sa četiri nezavisne promenljive (A,B, C i D) je dat sledećom jednačinom (5.11.):

$$Y = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_3C + \beta_{12}AB + \beta_{13}AC + \beta_{23}BC + \beta_{11}A^2 + \beta_{22}B^2 + \beta_{33}C^2 \quad (5.11.)$$

gde je Y ( $\beta$ -amilazna aktivnost, U/mL) zavisna promenljiva ili predviđeni odziv sistema koji predstavlja zavisnu promenljivu; A (vreme inkubacije, h), B (koncentracija inokuluma, %), C (koncentracija kazein hidrolizata, g/L), D (koncentracija kvašćevog

ekstrakta, g/L);  $\beta_0$  je odsečak;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  i  $\beta_3$  su linearni koeficijenti;  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$  i  $\beta_{33}$  su kvadratni koeficijenti;  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$  i  $\beta_{23}$  su koeficijenti interakcije.

### 5.6.1.3. Optimizacija postupka proizvodnje $\beta$ -amilaza na melasi i izluženom repinom rezancu

Na osnovu preliminarnih ispitivanja izabrane su tri nezavisne procesne promenljive: koncentracije inokuluma (A), vremena inkubacije (B) i koncentracije repinog rezanca SBP (C) sa najvećim uticajem na proizvodnju  $\beta$ -amilaza. Vrednosti nivoa procesnih promenljivih odabrani su na osnovu preliminarnih ispitivanja. Svaka promenljiva je kodirana na 5 različitih nivoa ( $-\alpha$ , -1, 0, 1,  $+\alpha$ ) (Tabela 5.5.).

Tabela 5.5. Vrednosti ispitivanih nivoa tri procesne promenljive, koncentracije inokuluma, vremena inkubacije i koncentracije repinog rezanca, u eksperimentalnom dizajnu

Procesna promenljiva	Granične vrednosti				
	-1	0	+1	Aksijalne ( $-\alpha$ )	Aksijalne ( $+\alpha$ )
A: Inokulum, %	4	7	10	2,8	11,2
B: Vreme inkubacije, h	24	72	120	4,8	139,2
C: SBP, %	1,5	2,25	3	1,2	3,3

Rezultati CCD su analizirani multiplom regresionom analizom tako da odgovaraju polinomnom regresionom modelu drugog reda koji sadrži linearni, kvadratni i dvo faktorski koeficijent interakcije. Model jednačine odzivne funkcije tri nezavisne promenljive (A, B i C) je dat sledećom jednačinom (5.12.):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 B + \beta_3 C + \beta_{12} AB + \beta_{13} AC + \beta_{23} BC + \beta_{11} A^2 + \beta_{22} B^2 + \beta_{33} C^2 \quad (5.12.)$$

gde je Y (aktivnost  $\beta$ -amilaza, U/mL) zavisna promenljiva ili predviđeni odziv sistema; A (koncentracija inokuluma, %), B (vreme inkubacije, %), C (koncentracija SBP, %);

$\beta_0$  je odsečak;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  i  $\beta_3$  su linearni koeficijenti;  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$  i  $\beta_{33}$  su kvadratni koeficijenti;  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$  i  $\beta_{23}$  su koeficijenti interakcije.

## 5.7. Karakterizacija celulaza

Karakterizacija endoglukanaza vršena je korišćenjem bakterijskog supernatanta, odnosno, sirovog enzima dobijenog nakon uklanjanja ćelija centrifugiranjem. Za karakterizaciju endoglukanaza korišćen je sirovi enzim koji je proizveden tokom bakterijskog rasta u komercijalnoj podlozi (poglavlje 5.4.1.1. eksperiment 1). Određena je optimalna T i optimalno pH endoglukanaza.

Karakterizacija egzoglukanaza je takođe vršena korišćenjem sirovog enzima dobijenog nakon bakterijskog rasta u modifikovanoj ISP1 tečnoj podlozi sa otpadnim lekovitim biljem (poglavlje 5.4.1.2. eksperiment 3). Kako je Avicelazna aktivnost u odnosu na CMC-aznu aktivnost kod *P.chitinolyticus* CKS1 predominantna, što nije zabeleženo u literaturi, pored određivanja optimalne T i optimalnog pH egzoglukanaza, karakterizacija ovog tipa celulaza je proširena na ispitivanje različitih uticaja metalnih jona na aktivnost i temperaturnu stabilnost egzoglukanaza.

### 5.7.1. Određivanje optimalne temperature i optimalnog pH celulaza

U cilju određivanja optimalne temperature endoglukanaza, sirovi enzim je inkubiran 30 min sa 1% (w/v) rastvorom CMC u 0,1M citratnom puferu pH 4,8, na različitim temperaturama u opsegu od 30 do 70 °C, sa korakom od po 10 °C.

U cilju ispitivanja optimalnog pH, sirovi enzim je inkubiran 30 min na temperaturi od 50 °C sa 1% rastvorom (w/v) CMC koji je pripreman u sledećim puferima: 0,1M citratnom puferu (pH 3,0; 4,0; 4,8 i 5,0), 0,1M natrijum-fosfatnom puferu (pH 6,0 i 7,0), 0,1M Tris-HCl puferu (pH 8,0 i 9,0), i 0,1M glicin-NaOH puferu (pH 10,0). CMC-azna aktivnost je određena na prethodno opisan način (poglavlje 5.3.4. tabela 5.1.)

Optimalna temperatura egzoglukanaza je određivana na isti način kao kod endoglukanaza s tim što je umesto 1% CMC korišćen 1% Avicel i temperaturni opseg

je proširen na 30-90 °C. Optimalno pH egzoglukanaza je određivano na isti način kao kod endoglukanaza s tim što je umesto 1% CMC korišćen 1% Avicel na temperaturi od 80 °C.

U tabeli 5.6. dat je prikaz uslova određivanja optimalne T i optimalnog pH kod endoglukanaza i egzoglukanaza.

Tabela 5.6. Prikaz uslova održivanja optimalne T i optimalnog pH endoglukanaza i egzoglukanaza

Tip celulaza	Supstrat, (1%)	Temperaturni , opseg, °C	pH opseg
Endoglukanaze	CMC	30-70	3-10
Egzoglukanaze	Avicel	30-90	3-10

#### ***5.7.2. Uticaj različitih metalnih jona i EDTA na aktivnost egzoglukanaza***

Uticaj metalnih jona određivan je tako što susirovom enzimu dodavan metalni joni koristeći soli: CaCl<sub>2</sub>, KCl, NaCl i EDTA, pojedinačno, u finalnoj koncentraciji od 10 mM, a potom je određivana zaostala (rezidualna) Avicelazna aktivnost. Enzimaska aktivnost je izražena kao procenat početne aktivnosti enzima (aktivnost enzima bez dodatka metalnih jona i EDTA).

#### ***5.7.4. Temperaturna stabilnost i uticaj različitih jona i EDTA na temperaturnu stabilnost egzoglukanaza***

Temperaturna stabilnost je određivana merenjem Avicelazne aktivnosti nakon inkubacije sirovog enzima na 75, 80 i 85 °C u trajanju od 15, 30 i 60 minuta. Uticaj temperature je praćen sa i bez prisustva metalnih jona u koncentraciji 10 mM rastvorom sledećih soli: CaCl<sub>2</sub>, KCl, NaCl i EDTA a potom je određivana Avicelazna aktivnost (poglavlje 5.3.4. tabela 5.1.) koja je izražena kao procenat početne aktivnosti enzima.



### **5.7.5. Analiza proizvoda hidrolize celuloze tečnom hromatografijom (HPLC)**

Proizvodi hidrolize celuloze su analizirani tečnom hromatografijom visokih performansi (HPLC) po sledećoj proceduri: 5,0 mL sirovog enzima jepomešano sa dva različita rastvora, na orbitalnoj tresilici (150 rpm, 30 min): 1) 20,0 mL 1% (w/v) rastvora Avicela u 0,1 M citratnom puferu (pH 4,8) pri temperaturi od 80 °C, i 2) 10,0 mL 1% (w/v) rastvora CMC u 0,1 M citratnom puferu (pH 4,8) pri temperaturi od 50 °C. Hidroliza je zaustavljena kuvanjem uzoraka 5 minuta. Zatim su uzorci filtrirani kroz 0,22 µm membranski filter. HPLC analiza je vršena na HPLC Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific (Waltham, USA) opremi. Korišćena je ugljeno-hidratna kolona (Hyper REZ XP Carbohydrate Ca<sup>2+</sup>:300 mm × 7,7 mm, 8µm) na 80°C. Voda (HPLC čistoće, JT Baker USA) je korišćena kao mobilna faza sa protokom 0,6 mL/min tokom analize. Detekcija je vršenapomoću RI (eng. *refractive index*) detektora (RefractoMax 520, ERC, Germany). Obrada podataka je vršena pomoću Chromeleon Software. Razdvojeni produkti hidrolize su identifikovani poređenjem sa glukoznim standardom.

### **5.7.6. Prečišćavanje celulaza**

Celulaze su prečišćene tako što je sirovi enzim, dobijen nakon bakterijskog rasta u podlozi sa otpadnom sirovinom (poglavlje 5.4.1.2. eksperiment 2) istaložen sa (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> do koncentracije od 60%. Uzorak je ostavljen u frižideru na +4 °C 6h. Nakon centrifugiranja na 12 000 o/min u toku 30 min talog je odvojeni rastvoren u 10 mM glicin-NaOH puferu (pH 10) i dijaliziran preko noći nasuprtot istog pufera. Dobijeni rastvor je sipan na vrh DEAE sephadex A50 jonoizmenjivačke kolone koja je prethodno uravnotežena sa 10 mM glicin-NaOH puferom sa pH 10. Kolona je sprana sa 0,5 M NaCl. Skupljene su frakcije (2 mL) i one sa Avicelaznom aktivnošću su čuvaneu epruvetama na +4 °C za dalje ispitivanje.

#### **5.7.6.1. Elektroforeza i zimogramska analiza celulazne aktivnosti**

SDS-PAGE (natrijum dodecil sulfat poliakrilamid gel elektroforeza) je korišćena za određivanje molekulske mase enzima. Korišćen je 10% razdvajajući gel i

4% koncentrujući gel (Laemmli, 1970). Nakon završene elektroforeze, gelovi subojeni Comassie Brilliant Blue bojom.

Zimogramska analiza je rađena po modifikovanoj metodi Raddadi i saradnika (Raddadi et al., 2013). 10% poliakrilamidni razdvajajući gel koji je sadržao 0,1% SDS i 0,3% Avicela kao supstrat korišćenje u Mini-*Protean* tetra elektrofreznoj ćeliji (Biorad). Uzorci za SDS-PAGE elektroforezu su pripremani mešanjem 20  $\mu$ l sirovog enzima i iste zapremine pufera za rastvaranje uzorka koji sadrži 25% (v/v) 4 x Tris-HCl, pH 6,8, 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) glicerol, 5% (v/v)  $\beta$ -merkaptoetanol i 0.001% (w/v) bromfenol plavo. Svi uzorci su zagrevani 5 minuta na temperaturi 100 °C pre puštanja na poliakrilamidni gel. Nakon elektroforeze (2h, 100V), gelovi se potapaju u 200 mL sterilne dejonizovane vode 60 min na sobnoj temperaturi pri nežnom mešanju. Nakon toga gelovi se inkubiraju u 200 mL pufera za renaturaciju proteina (0,1M citratni pufer pH 4,8 koji sadrži 0,1% (v/v) Triton X-100) na sobnoj temperaturi 16 h pri nežnom mešanju. Tokom renaturacije proteina, puferi se menjaju tri puta. Nakon toga, gelovi se inkubiraju na 80 °C 1h, i boje 20 min u 0.1% Congo red rastvoru a potom obezbojavaju u 1M NaCl 20 min. Bistre zone koje su primećene na crvenoj podlozi predstavljaju celulitičke trake a njihova molekulska masa je određena pomoću standardnih markera.

Priprema gelova, hemikalija, pufera i rastvora dati su u Prilogu 1.

## 5.8. Karakterizacija amilaza

Kod karakterizacije amilaza, korišćen je bakterijski supernatant odnosno sirovi enzim (prethodno oslobođen ćelija centrifugiranjem) dobijen prilikom bakterijskog rasta u komercijanoj podlozi (poglavlje 5.5.1. eksperiment 1). Određena je optimalna temperatura i optimalna pH vrednost  $\alpha$ -amilaza i  $\beta$ -amilaza dok je uticaj metalnih jona i površinski aktivnih materija ispitan na aktivnost  $\beta$ -amilaza.

### 5.8.1. Određivanje optimalne temperature i optimalnog pH amilaza

U cilju određivanja optimalne temperature  $\alpha$ -amilaza, sirovi enzim je inkubiran 15 min sa 1% (w/v) rastvorom skroba u 0,02M Na-fosfatni pufer pH 6,9 na različitim temperaturama u opsegu od 30 do 70 °C sa korakom od 10 °C. U cilju ispitivanja optimalnog pH  $\alpha$ -amilaza i  $\beta$ -amilaza, sirovi enzim je inkubiran 15 min na temperaturi od 50 °C sa 1% rastvorom (w/v) skroba koji je pripremljen u sledećim puferima: 0,02M citratnom puferu (pH 3,0; 4,01; 4,8 i 5,0), 0,02M natrijum-fosfatnom puferu (pH 6,0 i 7,0), 0,02M Tris-HCl puferu (pH 8,0 i 9,0) i 0,02M glicin-NaOH puferu (pH 10,0). Aktivnost amilaza određena je na prethodno opisan način (poglavlje 5.3.5. tabela 5.2.)

Optimalna temperatura delovanja  $\beta$ -amilaza je određivana na isti način kao kod  $\alpha$ -amilaza s tim što je umesto 0,02M Na-fosfatnog pufera pH 6,9 korišćen 0,016M Na-acetatni pufer pH 4,8.

U tabeli 5.7. dat je prikaz uslova određivanja optimalne T kod  $\alpha$ -amilaza i  $\beta$ -amilaza.

Tabela 5.7. Prikaz uslova određivanja optimalne T kod  $\alpha$ -amilaza i  $\beta$ -amilaza

Tip amilaza	Supstrat, (1%)	Temperaturni , opseg, °C	pH
$\alpha$ -amilaza	skrob	30-70	0,02M Na-fosfatni pufer pH 6,9
$\beta$ -amilaza	skrob	30-70	0,016M Na-acetatni pufer pH 4,8

### 5.8.2. Uticaj različitih metalnih jona i površinski aktivnih materija

Uticaj metalnih jona na aktivnost  $\beta$ -amilaza je određivan dodavanjem metalnih jona u sirov enzim: MnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, KCl, MgCl<sub>2</sub>, kao i površinski aktivnih materija Tween 80 i Triton, pojedinačno, u finalnoj koncentraciji od 10 mM, a potom je određivana zaostala (rezidualna) aktivnost amilaza po prethodno opisanoj proceduri (poglavlje 5.3.5. tabela 5.2.). Enzimska aktivnost je izražena kao procenat početne aktivnosti enzima (aktivnost enzima bez dodatka metalnih jona).

### ***5.8.3. Analiza proizvoda hidrolize skroba tečnom hromatografijom visokih performansi (HPLC)***

Za analizu sirovih supernatanata, dobijenih nakon fermentacije otpadne vode i melase sa izluženim repinim rezancem, korišćena je metoda tečne hromatografije visokih performansi (HPLC).

Proizvodi hidrolize skroba, kada se kao sirovi enzima koristi supernatant nakon fermentacije otpadne vode, analizirani supo sledećoj proceduri: 5,0 mL bakterijskog supernatanta (enzima) je inkubirano sa 5,0 mL 1% (w/v) rastvora skroba u 0,016 M acetatnom puferu (pH 4,8). U različitim vremenskim intervalima (15, 30, 60 i 120 min), reakcija je zaustavljena kuvanjem uzoraka 5 min. Nakon hlađenja, uzorci su filtrirani kroz 0,22 µm membranski filter. HPLC analiza je vršena na HPLC Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific (Waltham, USA) opremi. Korišćena je ugljenohidratna kolona (Hyper REZ XP Carbohydrate Ca<sup>2+</sup>, 300 mm × 7,7 mm, 8µm) na 80°C. Voda (HPLC čistoće, JT Baker USA) je korišćena kao mobilna faza sa protokom 0,6 mL/min tokom analize. Detekcija je vršena pomoću RI detektora (RefractoMax 520, ERC, Germany). Obrada podataka je vršena pomoću Chromeleon Software. Razdvojeni produkti hidrolize su identifikovani poređenjem sa standardima glukoze, maltoze, dekstrina i skroba.

Proizvodi hidrolize skroba, kada je kao sirovi enzim korišćen supernatant nakon fermentacije melase sa izluženim repinim rezancem, analizirani su po sledećoj proceduri: 7,0 mL bakterijskog supernatanta (enzima) je inkubirano sa 35,0 mL 1% (w/v) rastvora skroba u 0,016 M acetatnom puferu (pH 4,8). Hidroliza (nakon 15, 30, 60 i 120 min) je završena kuvanjem uzorka 5 min. Nakon hlađenja uzorci su filtrirani kroz 0,22 µm membranski filter.

Kod ove HPLC analize korišćena je reversna fazna kolona (Hypersil gold C18, 150 mm × 4,6 mm, 5 µm) na 40 °C. Voda (HPLC čistoće, JT Baker USA) je korišćena kao mobilna faza sa protokom 0,4 mL/min tokom analize.

## **5.9. Primena dobijenih celulaza i amilaza za saharifikaciju pamučnog materijala i ječmenih mekinja**

Bakterijski supernatant (sirovi enzim), proizveden nakon optimizacije procesa proizvodnje celulaza u podlozi sa ječmenim mekinjama (poglavlje 5.6.1.2.) korišćen je za enzimsku hidrolizu pamučnog materijala i ječmenih mekinja, pojedinačno. Hidroliza je vršena na temperaturi od 50 °C.

### ***5.9.1. Enzimska hidroliza pamučnog materijala***

Hidroliza pamučnog materijala je vršena u erlenmajerima od 300 mL sa dodatkom 1,0 g pamučnog materijala, 37,5 mL bakterijskog supernatanta i 37,5 mL 0,1M acetatnog pufera pH 4,8 pri brzini mešanja od 150 rpm/min. Da bi se izbegla mogućnost kontaminacije, pamučni materijal i pufer se prethodno sterilšu. Kontrolni uzorak je sadržao bakterijski supernatant i pufer.

Drugog, četvrtog i sedmog dana hidrolize uzorci su centrifugirani (6000 rpm/min 10min) da bi se otklonili nehidrolizovani ostaci i ukupna količina redukujućih šećera u supernatantu, rečunatih na glukozu, je određena DNS metodom (Miller, 1959).

### ***5.9.2. Enzimska hidroliza ječmenih mekinja***

Hidroliza ječmenih mekinja je vršena u erlenmajerima od 300 mL sa dodatkom 1% (w/v) ječmenih mekinja, 75,0 mL bakterijskog supernatanta i 75,0 mL 0,1M acetatnog pufera pH 4,8 pri brzini mešanja od 150 o/min. Ječmene mekinje i 0,1M acetatni pufera pH 4,8 su prethodno sterilisani. Kontrolni uzorak 1 je sadržao ječmene mekinje i 0,1M acetatni pufer pH 4,8, dok je kontrolni uzorak 2 sadržao bakterijski supernatant (sirovi enzim) i 0,1M acetatni pufer pH 4,8.

Dalji postupak, nakon hidrolize je opisan u poglavlju 5.9.1. s tim što je ukupna količina redukujućih šećera računata na maltozu.

## 6. REZULTATI I DISKUSIJA

### 6.1. Identifikacija, karakteristike radnog mikroorganizma i skrining na celulaze i amilaze

U ovoj disertaciji, izolovano je iz zemljišta preko 30 različitih mikroorganizama potencijalnih producenata hidrolitičkih enzima. Osnovni cilj prilikom ispitivanja mikroorganizama je bio identifikovati mikroorganizam koji poseduje mogućnost proizvodnje celulaza i amilaza. Izolovane su, ispitane i identifikovane sporogene bakterije roda *Bacillus*, *Paenibacillus* i *Streptomyces*. Primarni skrining je vršen na agarnim pločama koje sadrže celulozu (CMC) i skrob (krompirov), pojedinačno, kao selektivnu podlogu. Tokom rasta na ovim podlogama mikroorganizmi proizvode ekstracelularne celulaze i amilaze što se ogleda u pojavi bistrih zona oko izraslih kolonija. Na osnovu širine zona hidrolize izvršena je selekcija radnog mikroorganizma.

Identifikacija radnog mikroorganizma vršena je savremenim genetičkim metodama kojima se utvrđuje nukleotidna sekvenca kojom je kodirana sinteza ribozomalne 16S rRNK. Hromozomalna bakterijska DNK je izolovana fenol-sumpornom metodom, potom je izvršena amplifikacija sekvence genoma koja kodira sintezu 16S rRNK PCR metodom. PCR proizvod je prečišćen i sekvencioniran.

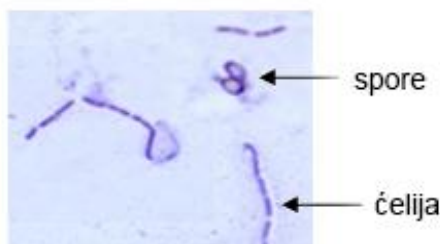
Nakon sekvencioniranja, ustanovljena je sledeća nukleotidna sekvenca kojom je kodirana sinteza 16S rRNK:

```
>CGGTGGGCGTGCCTATACATGCAGTCGAGCGGACTTGATGAGAAGCTTGCTTCTCGGATA
GTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTAAGATCGGGATAACTAC
CGGAAACGGTAGCTAAGACCGGATAACCGGTTTCTCCGCATGGAGAGATCGTGAACACG
GAGCAATCTGTGGCTTACGGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC
TCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGCAAGTCT
GACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGG
AAGAACGCCAAGGAGAGTAACTGCTCTTTGGGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGC
TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGG
GCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTTTAAAGTCTGGTGTTTAAATCCCGAGGCTCAACCTCG
GTTCCGACCGGAAACTGGGAGACTGGAGTGCAGGAGAGGAAAGTGGAATTCCACGTGTAG
CGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGCCTGTA
ACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTAAACGATGCATGCTAGGTGTTAGGGGTTTCGATACCCTTGGTGCCGAAGTTAACA
CAGTAAGCATGCCGCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG
GACCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAG
GTCTTGACATCCCTCTGACCGGCTTAGAGATAAGCCTTTCCTTCGGGACAGAGGTGACAG
GTGGTGATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC
GCAACCCTTGAACCTAGTTGCCAGCAGGTTGAGCTGGGCACTCTAAGTTGACTGCCGGTG
ACAAACCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTAC
```

ACACGTAACAATGGCCGGTACAACGGGAAGCGAAGGAGCGATCCGGAGCCAATCCTAG  
 AAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCTGCATGAAGTCGGAATTGCT  
 AGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCG  
 TCACACCACGAGAGTTTACAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCGCAAGGGGCCAGCCGC  
 CGAAGGGTGGGAAGAGG<

Analizom homolognih sekvenci u NCBI Blast potvrđeno je da je reč o *Paenibacillus chitinolyticus* vrsti budući da je komparativna analiza genomskih sekvenci 16S DNK pokazala 99% poklapanje sekvenci u odnosu na sojeve: *P.chitinolyticus* strain HSCC 596, *P.chitinolyticus* strain NBRC 15660, *P.chitinolyticus* strain MP-306, *P. chitinolyticus* strain IFO 15660 i drugim. 16S rRNK kodirajuća sekvenca *P.chitinolyticus* CKS1 je deponovana pod kataloškim brojem KP715850 u NCBI GenBank (Mihajlovski et al., 2015a).

Na osnovu morfoloških karakteristika utvrđeno je da je CKS1 Gram pozitivna, endosporoformirajuća bakterija sa *Paenibacillus* - karakterističnim elipsoidnim sporama većim od ćelije (Slika 6.1.).



Slika 6.1. Izgled *P.chitinolyticus* CKS1, nakon bojenja po Gramu, pod svetlosnim mikroskopom

Neke osnovne biohemijske karakteristike soja CKS1 date su u tabeli 6.1.

Tabela 6.1. Biohemijske karakteristike soja CKS1

Biohemijski test	Reakcija
Bojenje po Gramu	+
Anaerobni rast	+
Katalaza	+
Korišćenje citrata	-
Test na indol	-
Butandiolna fermentacija	-
OF test	+
VP test	-

---

MR test

---

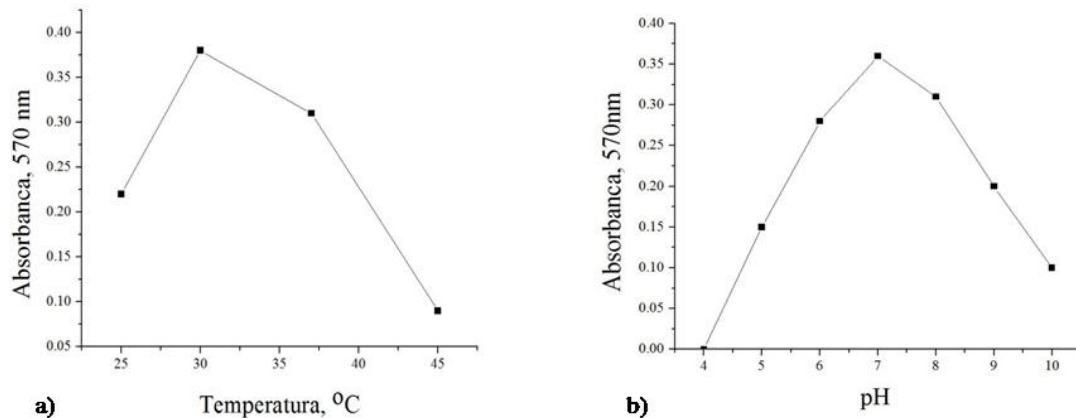
OF- oksidativno fermentativni test;

VP- Voges Proskauer test;

MR- metil red test.

---

U cilju ispitivanja optimalnih uslova rasta bakterije neophodno je bilo odrediti optimalnu temperaturu i pH vrednost gajenja ispitivanog soja CKS1. *P. chitinolyticus* CKS1 je pokazao maksimalan rast na 30 °C dok na temperaturi od 45 °C pokazuje veoma slab rast (Slika 6.2. a). Najbolji rast je uočen u neutralnoj sredini (pH 7), zatim u slabo kiseljoj (pH 5) i baznoj (pH 9) sredinu, dok u jako kiseljoj sredini (pH 4) soj CKS1 nije pokazao sposobnos trasta (Slika 6.2. b).



Slika 6.2. Uticaj a) temperature i b) pH na rast *P.chitinolyticus* CKS1

Tokom svog rasta na CMC agarnoj ploči soj CKS1, oko svoje kolonije, pravi zonu prečnika 18 mm, što ukazuje na zonu hidrolize CMC (Prilog 2, Slika P2-1). Literaturni podaci pokazuju da prečnik zone hidrolize celuloze kod *Paenibacillus* spp.vrsta varira između 15 i 22 mm (Budi et al., 2000; Maki et al., 2009) ali i da postoje vrste-npr. *P chitinolyticus* JK2 kod kojih celulolitička aktivnost ovakvim testom nije zabeležena (Jami Al Ahmadi et al., 2008).

Tokom svog rasta na skrobnoj agarnoj podlozi, soj CKS1 oko svoje kolonije pravi bistru zonu što ukazuje na zonu hidrolize skroba (Prilog 2, Slika P2-2). Prečnik zone, soja CKS1 iznosi 4 mm. U dostupnoj literaturi, nije zabeleženo da *P. chitinolyticus* vrsta poseduje mogućnost proizvodnje amilaza. Vrsta *P.chitinolyticus* je u Berdžijevom priručniku (De Vos et al., 2009) opisana kao neamilolitička što znači da ne hidrolizuje skrob. U skladu sa tim, izvršeno je poređenje hidrolize skrobne agarne



podloge referentnog soja *P.chitinolyticus* DSM 11030 i izolata CKS1. Referentni soj je pokazao usku zonu hidrolize skroba, oko svoje kolonije, koja iznosi 0,5 mm (Prilog 2, Slika P2-3). S obzirom da je širina zone hidrolize skroba soja CKS1 veća od širine zone referentnog soja, soj CKS1 je korišćen u daljem eksperimentu kao potentni amilolitički soj vrste *P.chitinolyticus*.

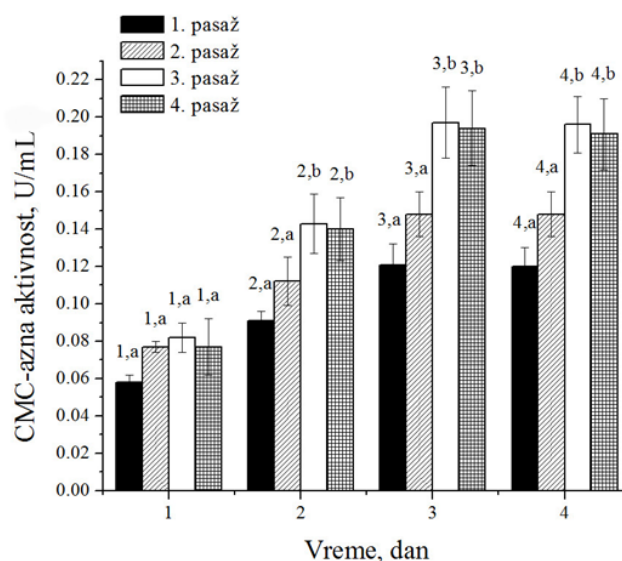
## **6.2. Proizvodnja celulaza**

### ***6.2.1. Proizvodnja celulaza u tečnim podlogama submerznim postupkom***

#### *6.2.1.1. Proizvodnja celulaza u komercijalnim podlogama (eksperiment 1)*

U ovom delu eksperimenta (eksperiment 1), *P.chitinolyticus* CKS1 je rastao na amorfnoj karboksimetil celulozi (CMC) i celulaze koje on proizvodi tokom rasta na ovom supstratu se klasifikuju kao endoglukanaze a njihova aktivnost je označena kao CMC-azna aktivnost.

Pasažiranje mikroorganizma u podlozi istog sastava koja se koristi za finalnu pripremu kulture (inokuluma) je vrlo efikasan način postizanja željenih karakteristika datog mikroorganizma (Boidin & Effront, 1917). Smatra se da adaptacija mikroorganizma na uslove sredine poboljšava enzimsku sintezu naročito velikih enzimskih kompleksa kao što su celulaze. Nasuprot ovom očekivanju, Beckord i saradnici (Beckord et al., 1945) su otkrili da jedno pasažiranje u podlozi, slično onom koje se koristi za finalnu pripremu kulture, ima veliki uticaj na formiranje željenih osobina kod mikroorganizma dok pasažiranje više puta nema znatnog uticaja na proizvodnju enzima. U cilju ispitavanja da li adaptacija mikroorganizma u podlozi ima uticaj na formiranje željenih osobina, u ovom slučaju proizvodnju enzima celulaza, praćen je uticaj pasažiranja mikroorganizma na CMC-aznu aktivnost i proizvodnju. Rezultati pokazuju da se CMC-azna aktivnost povećava sa pasažiranjem mikroorganizma i sa vremenom inkubacije (slika 6.3.).

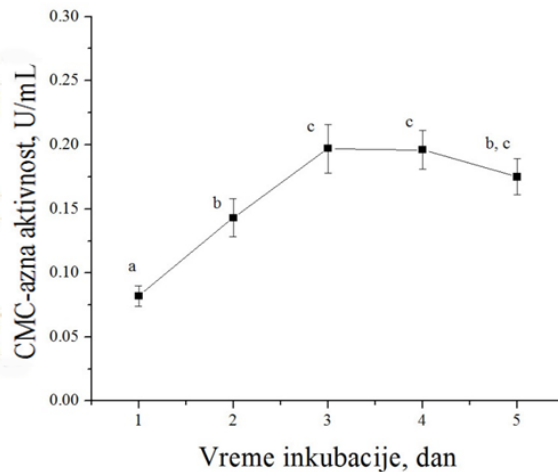


Slika 6.3. Uticaj pasažiranja i vremena inkubacije na CMC-aznu aktivnost

Najveća CMC-azna aktivnost je zabeležena u trećem pasažu trećeg dana inkubacije ( $0.197 \pm 0.019$  U/mL). CMC-azna aktivnost se povećava sa pasažiranjem mikroorganizma i najveća vrednost CMC-azne aktivnosti se dostiže u trećem pasažu pa je zbog toga ovaj pasaž odabran za dalje izvođenja eksperimenta. U daljem eksperimentu, drugi pasaž služi kao inokulum za dalja ispitivanja CMC-azne aktivnosti.

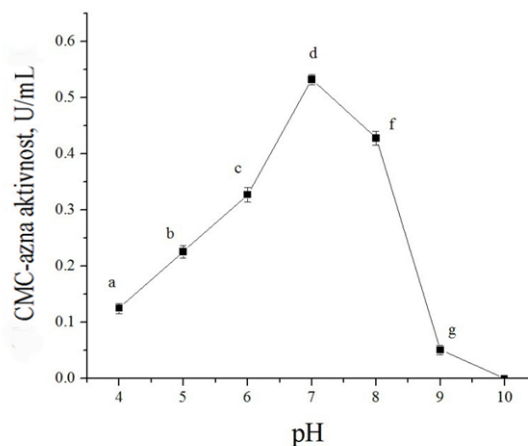
Prilikom određivanja uticaja vremena inkubacije na CMC-aznu aktivnost došlo se do zaključka da se najveća proizvodnja endoglukanaza ostvaruje nakon tri dana inkubacije (Slika 6.3. i 6.4.). Nakon ovog perioda proizvodnja endoglukanaza opada. Smanjenje proizvodnje endoglukanazase može objasniti promenom uslova u fermentacionoj podlozi (promena pH vrednosti, stvaranje produkta inhibitora enzima) ili trošenjem nutrijentata kao što je primećeno kod većine bakterijskih vrsti (Karim et al., 2015). Vreme inkubacije mikroorganizma koje je potrebno za optimalnu proizvodnju endoglukanaza je karakteristika samog soja. Neki *Paenibacillus* sp., producenti celulaza, postižu optimalnu proizvodnju endoglukanaza za manje od 24h (*Paenibacillus* sp. P118 (de Castro et al., 2011)) ili slično CKS1 oko 72h (*Paenibacillus tarimensis*L88 (Raddadi et al., 2013) i *Paenibacillus* sp. ME-271 oko 60 h (Liang et al., 2014)). Generalno, povećanje enzimske aktivnosti tokom perioda inkubacije zavisi od karakteristika samog mikroorganizma i od brzine rasta

mikroorganizma. *P.chitinolyticus* CKS1 proizvodi endoglukanaze tokom rane faze fermentacije, u kasnoj eksponencijalnoj fazi (rezultati nisu prikazani) rasta dok se maksimum proizvodnje endoglukanaza dostiže u kasnoj stacionarnoj fazi.



Slika 6.4. Promena CMC-azne aktivnosti tokom 5 dana inkubacije

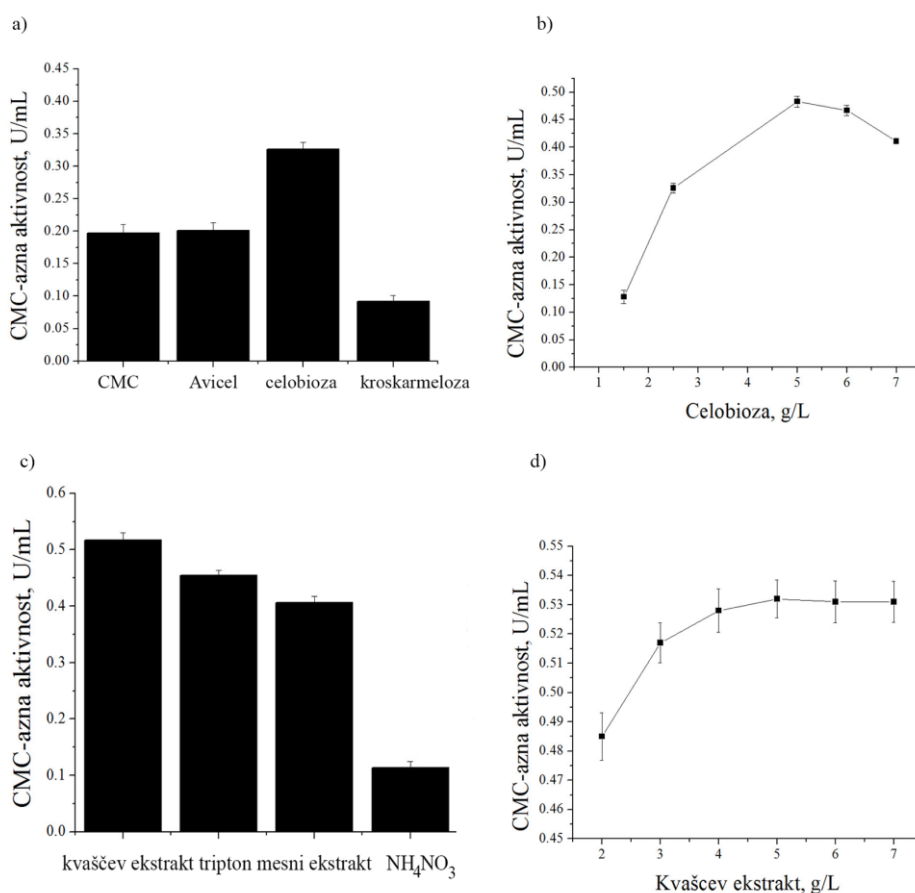
Dobro je poznato da početna pH vrednost u podlozi za bakterijski rast utiče na određene metaboličke procese, transfer jona i na permeabilnost ćelijske membrane (Liang et al., 2009) pa time i na brzinu rasta mikroorganizma i na njegove metaboličke procese. Dobijeni rezultati pokazuju da je pH vrednost podloge važan faktor koji utiče na CMC-aznu aktivnost. Za soj CKS1, optimalna pH vrednost podloge je 7 jer odgovara maksimalnoj proizvodnji endoglukanaza (slika 6.5.).



Slika 6.5. Uticaj početne vrednosti pH podloge na CMC-aznu aktivnost

Različite vrste *Paenibacillus* roda pokazuju optimalnu proizvodnju endoglukanaza pri različitim vrednostima pH podloge. Neke vrste proizvode veće nivoe endoglukanaza pri neutralnom pH uključujući *P.curdlanolyticus* B-6 (izolat iz anaerobnog digestora) i *P.campinasensis* BL-11 (izolat iz crnog likvora) (Ko et al., 2007; Waeonukul et al., 2009) dok drugi koriste alkalnu sredinu, kao što je *P.terrae* ME27-1 (pH 8) (izolat iz zemljišta iz subtropskih krajeva Kine)(Liang et al., 2014) ili isključivo kiselu sredinu (pH 5.5) kao *P.polymyxa* (Kumar et al., 2012) za maksimalnu proizvodnju enzima.

Generalno, proizvodnja celulaza je inducibilna i na nju utiče priroda ugljenog hidrata, kao jedinog izvora ugljenika, koji se koristi u procesu fermentacije. Za proizvodnju endoglukanaza, kod soja CKS1, korišćeni su različiti komercijalni supstrati (Slika 6.6. a). Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da soj CKS1 proizvodi najveću količinu endoglukanaza ( $0,326 \pm 0,011$  U/mL) dok raste na celobiozi iako on proizvodi i endoglukanaze tokom svog rasta na svim testiranim supstratima (Slika 6.6. a). Mandels (Mandels & Reese, 1960) i Paul (Paul & Varma, 1990) su zabeležili da je celobioza dobar induktor celulaza kod većine plesni i nekih *Bacillus* sp. (Annamalai et al., 2011; Sadhu et al., 2013; Singh et al., 2001) dok je za neke *Paenibacillus* vrste CMC najbolji induktor endoglukanaza (Asha et al., 2012; Liang et al., 2014; Waeonukul et al., 2008). Soj CKS1 je prvi soj iz roda *Paenibacillus* zabeležen u literaturi kod kojeg je celobioza bolji induktor proizvodnje endoglukanaza od same CMC.



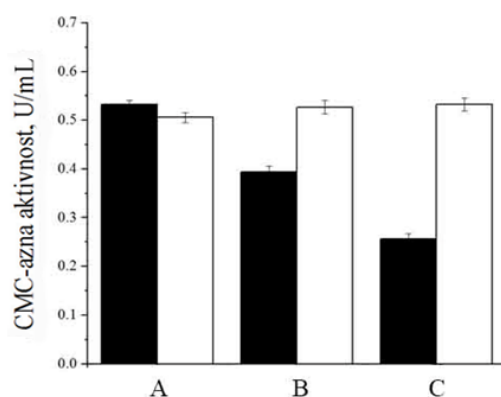
Slika 6.6. Uticaj izvora ugljenika i azota na CMC-aznu aktivnost. a) Različiti izvori ugljenika: CMC, Avicel, celobioza i kroskarmeloza-Na, pojedinačno. b) Koncentracija celobioze. c) Različiti izvori azota: kvašćev ekstrakt, tripton, mesni ekstrakti NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, respektivno. d) Koncentracija kvašćevog ekstrakta.

Celobioza pokazuje indukujući efekat u svim ispitivanim koncentracijama od 1,5-7,0 g/L (Slika 6.6. b). Pri koncentraciji celobioze od 5,0 g/L postiže se maksimalna proizvodnja endoglukanaza (0,483U/mL).

Analizirajući uticaj različitih izvora azota na proizvodnju endoglukanaza, utvrđeno je da kvašćev ekstrakt deluje najstimulativnije na proizvodnju celulaza pri čemu CMC-azna aktivnost dostiže 0,517 U/mL (Slika 6.6. c). Optimalna koncentracija kvašćevog ekstrakta u medijumu iznosi 5,0 g/L (Slika 6.6.d) a CMC-azna aktivnost 0,532U/mL. Kvašćev ekstrakt je glavni izvor aminokiselina, vitamina, azota i ugljenika neophodnih za bakterijski rast (Tanguler & Erten, 2009).

Na osnovu prikazanih rezultata evidentno je da *P.chitinolyticus* CKS1 preferira organski izvor azota za svoj rast i proizvodnju enzima. Kada raste u podlozi koja sadrži neorganski izvor azota,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , soj CKS1 proizvode znatno niže koncentracije endoglukanaza u poređenju sa podlogom koji sadrži organski izvor azota (Slika 6.6. (c)). Rezultati za soj CKS1 su u saglasnosti sa većinom celulolitičkih *Paenibacillus* sojeva (Asha et al., 2012; Ko et al., 2007; Raddadi et al., 2013) iako neki sojevi proizvode endoglukanaze u većoj koncentraciji dok rastu u prisustvu neorganskog izvora azota (Waeonukul et al., 2008; Waeonukul et al., 2009; Wang et al., 2008).

Kiseonik u podlozi je bitan faktor koji utiče na proizvodnju metabolita i enzima uključujući ekstracelularne enzime (Li et al., 2012). S obzirom na to da su svi eksperimenti rađeni u istoj zapremini erlenmajera, na proizvodnju endoglukanaza značajno utiče zapremina korišćene podloge odnosno odnos površina/zapremina. Kada se koriste veće zapremine podloge, aeraciona površina se relativno smanjuje, odnos površina/zapremina je manji, a samim tim i proizvodnja enzima. Najveća proizvodnja endoglukanaza se postiže se korišćenjem 40 mL radne zapremine podloge u 500 mL erlenmajera. Povećavajući zapreminu podloge značajno se smanjuje enzimsko aktivnost (Slika 6.7.). Soj CKS1 raste pod aerobnim uslovima i bilo koje smanjenje nivoa kiseonika dovodi do smanjenja proizvodnje endoglukanaza.



Slika 6.7. Uticaj različitih zapremina podloge (ispunjen kvadrat) i brzine mešanja (otvoren kvadrat) na CMC-aznu aktivnost. Inkubacija je vršena koristeći različite radne zapremine u erlenmajeru od 500 mL: A) 40 mL; (B) 100 mL i (C) 150 mL; sa brzinom mešanja od 150 rpm. Uticaj različitih brzina mešanja (A) 100 rpm; (B) 120 rpm i (C)

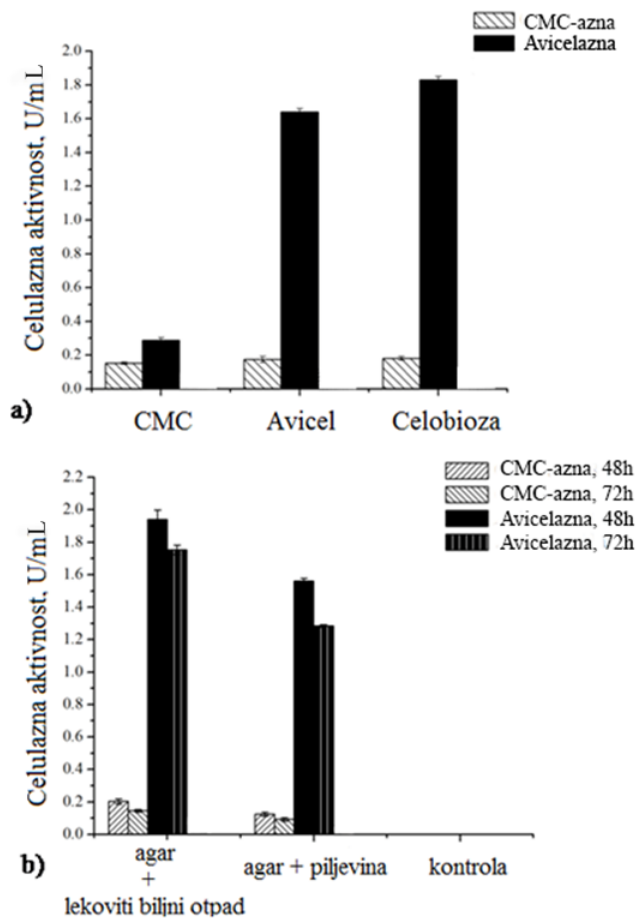
150 rpm na proizvodnju endoglukanaza je određivan pri stalnoj zapremini podloge (40 mL)

Osim toga, mešanje ima značajan uticaj na proizvodnju endoglukanaza. Kada soj CKS1 raste pod statičnim uslovima (bez mešanja) detekcija CMC-azne aktivnosti je otežana i često ne može da se odredi (rezultati nisu prikazani). CMC-azna aktivnost se ne menja značajno pri promeni brzina mešanja orbitalne tresilice od 100-150 rpm.

Poređenje dostupnih literaturnih podataka o proizvodnji celulaza uz pomoć *Paenibacillus* spp. je otežano zbog različitih uslova gajenja mikroorganizama, različitih supstrata, načina i jedinica interpretiranja celulazne aktivnosti. Takođe, endoglukanaze iz soja CKS1 predstavljaju sirov neprečišćen enzim i teško ih je porediti sa nekim prečišćenim celulazama. Svakako, prikazani rezultati pokazuju da velika aeraciona površina stimulatивно deluje na proizvodnju endoglukanaza kod soja CKS1 ukazujući na pozitivan uticaj kiseonika na proizvodnju celulaza.

#### *6.2.2. Proizvodnja celulaza u podlozi sa komercijalnim supstratima i otpadnim lekovitim biljem i piljevinom (eksperiment 2 i 3)*

Tokom svog rasta na komercijalnim supstratima CMC, Avicelu i celobiozi, kao izvorima ugljenika, *P. chitinolyticus* CKS1 proizvodi celulaze sa različitom efikasnošću (slika 6.8. a). Literaturni podaci ukazuju da je proizvodnja celulaza inducibilna i da zavisi od vrste korišćenog ugljenog hidrata tokom fermentacije (Kumar et al., 2008).



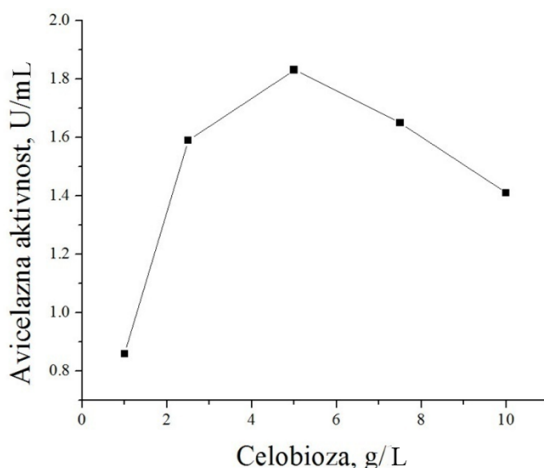
Slika 6.8. CMC-azna i Avicelazna aktivnost u modifikovanoj ISP1 podlozi koji sadrži: a) komercijalne supstrate CMC, Avicel i celobiozu i b) agar + lekoviti biljni otpad, agar + piljevinu i kontrolni uzorak

U skladu sa tim, soj CKS1 proizvodi različite količine celulaza tokom svog rasta na testiranim komercijalnim supstratima pri čemu se maksimalna Avicelazna aktivnost (1,83 U/mL) detektuje kod mikroorganizama koji rastu na celobiozi (Slika 6.8. a). Takođe, maksimum CMC-azne aktivnosti (0,181 U/mL) se postiže korišćenjem celobioze kao induktora enzimske aktivnosti. Niže vrednosti obe celulazne aktivnosti su zabeležene kada je mikroorganizam rastao na Avicelu dok su najniže vrednosti Avicelazne i CMC-azne aktivnosti zabeležene kada se kao supstrat zarast mikroorganizma koristi CMC.

Prethodno je zabeleženo da je celobioza dobar potencijalni induktor celulaza kod plesni i *Bacillus* spp. (Mandels & Reese, 1960; Trivedi et al., 2011), dok celobioza



kao supstrat nije testirana kod *Paenibacillus* spp. (Asha et al., 2012; de Castro et al., 2011; Emtiazi et al., 2007). Dobro je poznato da indukcija celulaza zavisi od koncentracije celobioze u podlozi (Liang et al., 2009). Za soj CKS1, koncentracija celobioze od 5,0 g/L je optimalna za proizvodnju egzoglukanaza i dalje povećavanje koncentracije celobioze ima negativan uticaj na proizvodnju egzoglukanaza (Slika 6.9.). Stewart and Leatherwood (1976) su ustanovili da se celobioza ponaša i kao induktor i kao inhibitor celulazne aktivnosti kod *Cellulomonas* spp. Sa povećanjem koncentracije, celobioza se ponaša kao kompetitivni inhibitor, dok pri veoma niskim koncentracijama (0,05 %) celobioza poboljšava proizvodnju celulaza (Stewart & Leatherwood, 1976), što se slaže sa rezultatima ispitivanja celulazne aktivnosti, korišćenjem celobioze, kod soja CKS1.



Slika 6.9. Uticaj različitih koncentracija celobioze na Avicelaznu aktivnost

Najveća celulolitička aktivnost sirovog enzima proizvedenog tokom rasta na celobiozi se može objasniti činjenicom da je celobioza prost šećer koji stimuliše brži bakterijski rast nego preostala dva korišćena supstrata (CMC i Avicel). Naime, koncentracija ćelija nakon 48 h rasta na celobiozi, CMC i Avicelu, pojedinačno iznosi  $5,6 \times 10^7$ ,  $7,1 \times 10^5$  i  $4,4 \times 10^5$  ćelija/mL što ukazuje da je stimulacija bakterijskog rasta bitan faktor koji doprinosi količinski većoj enzimskoj sintezi.

Soj CKS1 proizvodi sirovi enzim celulazu koja pokazuje veću aktivnost na Avicelu nego na CMC (Slika 6.8.). Tipično, *Paenibacillus* spp. proizvode predominantno endoglukanaze (de Castro et al., 2011; Emtiazi et al., 2007; Kumar et

al., 2012; Pakdeedachakiat et al., 2008), endoglukanaze i egzoglukanaze sličnih aktivnosti (Ko et al., 2007; Raddadi et al., 2013). Stoga, soj CKS1 je prvi zabeležen soj *Paenibacillus* spp. koji predominantno proizvodi egzoglukanaze. Uz to Avicelazna aktivnost soja CKS1 je veća od drugih literaturno zabeleženih vrednosti Avicelazne aktivnosti kod *Paenibacillus* spp. (Avicelazna aktivnost kod *P.campinasensis* BL11 iznosi 0,14 U/mL (Ko et al., 2007) i kod *P. tarimensis* L88 0,243 U/mL (Raddadi et al., 2013)). U odnosu na endoglukanaze, kod soja CKS1 zabeležena je viša aktivnost nego kod nekih drugih *Paenibacillus* spp. (Ko et al., 2007; Pason et al., 2006) ali isto tako i niža aktivnost nego kod nekih *Paenibacillus* sp. (Asha et al., 2012; Emtiazi et al., 2007; Waeonukul et al., 2008).

U ovom eksperimentu, pokazano je da nov izolat *P.chitinolyticus* CKS1 koristi i amorfnu formu (CMC) i mikrokristalnu formu celuloze (Avicel) kao jedini izvor ugljenika za svoj rast. Prema navodima Lynd-a i saradnika (Lynd et al., 2002) ovakve bakterije se svrstavaju u grupu pravih celulolitičkih bakterija.

Tokom svog rasta na CMC i Avicelu, soj CKS1 pokazuje veći katalitički afinitet prema Avicelu (veća celulolitička aktivnost) istoga se celulaze koje proizvodi ovaj mikroorganizam kategorišu kao predominantne egzoglukanaze, sa dodatnom ili smanjenom endoglukanaznom aktivnošću.

*P. chitinolyticus* CKS1 proizvodi celulaze koje pokazuju aktivnost na CMC i Avicelu nakon rasta u podlozi koja sadrži otpadno lekovito bilje kao jedini izvor ugljenika. Nakon 48h inkubacije, dostiže se maksimum celulazne aktivnosti za oba testirana supstrata (Slika 6.8. b). Maksimum CMC-azne i Avicelazne aktivnosti se dostiže kada soj CKS1 raste u podlozi sa otpadnim lekovitim biljem. Maksimum Avicelazne aktivnosti nakon 48h fermentacije iznosi 1,94 U/mL i CMC-azne 0,203 U/mL. Slični rezultati se dobijaju kada soj CKS1 raste u podlozi sa piljevinom i maksimalne celulazne aktivnosti su nešto niže u odnosu na podlogu u kojoj je korišćeno otpadno lekovito bilje i iznose za Avicelaznu aktivnost 1,75 U/mL iza CMC-aznu aktivnost 0,145 U/mL. Među testiranim suspsratima, komercijalnim i otpadnim, podloga sa otpadnim lekovitim biljem se pokazala najboljom za indukciju egzoglukanaza (1,94 U/mL) i endoglukanaza (0,203 U/mL). Svakako, piljevina kao otpadni supstrat se pokazala kao nešto bolji supstrat u poređenju sa komercijalnom celobiozom (1,75 U/mL nasuprot 1,83 U/mL).

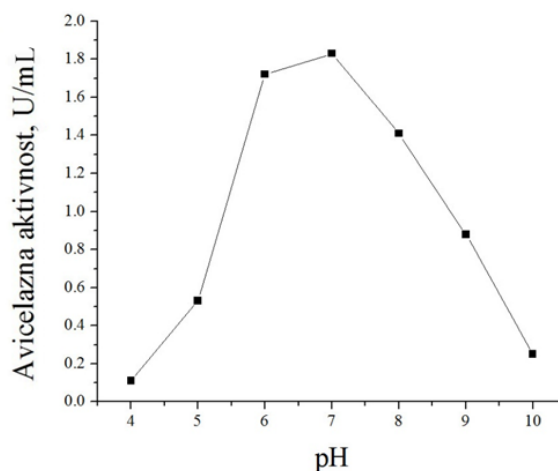
Nema mnogo dostupnih literaturnih podataka o proizvodnji celulaza na lignoceluloznoj biomasi pomoću *Paenibacillus* spp. pri čemu je dostupne rezultate teško međusobno porediti zbog različitih uslova gajenja mikroorganizama, različitih supstrata, procedura i jedinica izražavanja enzimske aktivnosti (Kumar et al., 2012; Pakdeedachakiat et al., 2008)

Prilikom rasta u mineralnoj podlozi koja sadrži kukuruznu ljusku *P.curdlanolyticus* B6 proizvodi celulaze sa maksimalnom CMC-aznom aktivnošću od 0,12 U/mL, a kada raste na šećernoj trsci i pirinčanoj ljusci u mineralnoj podlozi CMC-azna aktivnost iznosi 0,07 U/mL i 0,02 U/mL pojedinačno za svaki supstrat (Pakdeedachakiat et al., 2008). Aktivnost ovog enzima je primetno niža od aktivnosti koju postiže *P.chitinolyticus* CKS1. Dodatak 50,0 g/L pšeničnih mekinja u podlogu vodi ka maksimalnoj proizvodnji endoglukanaza kod *P.terrae* ME27-1(Liang et al., 2014) dok *P.polymyxa* MTCC 10056 proizvodi maksimum CMC-azne aktivnosti 6,30 U /mg (specifična aktivnost) prilikom rasta na 7%-noj ljusci manga u mineralnoj podlozi (Kumar et al., 2012). Maksimum Avicelazne aktivnosti kod *Bacillus* sp. SMI-2 iznosi 1,50 U/mL i zabeleženo je tokom rasta ove bakterije u tečnoj podlozi koja sadrži Avicel (0.5%, w/v), kao izvor ugljenika i vodu od močenja kukuruza (eng. *corn steep liquor*) (0.5%, w/v) (Oliveira et al., 2014). Termofilni *Geobacillus stearothermophilus*, izolovan iz zemljišta, proizvodi egzoglukanaze koristeći prethodno tretiranu šećernu trsku sa maksimalnom Avicelaznom aktivnošću od 1,94 U/mL (Makky, 2009). Treba napomenuti da je aktivnost fungalnih celulaza viša od aktivnosti bakterijskih celulaza. Shodno tome, *Trichoderma* spp. proizvodi više vrsta potentnih celulaza prilikom rasta na lekovitom bilju kao supstratu (Chandra et al., 2009). Enzimska aktivnost je najviša na filter papiru kao supstratu i iznosi 14,64 U/g kod *T.citrinoviride*, dok se endoglukanazna aktivnost razlikuje i iznosi 28,66 – 102,40 U/g kod različitih vrsta *Trichoderma* koje rastu na različitom lekovitom bilju.

Soj *P.chitinolyticus* koristi organski izvor azota, kvašćev ekstrakt i hidrolizat kazeina za svoj rast. Kada se organski izvor azota zameni neorganskim izvorom azota, Avicelazna aktivnost je znatno niža (rezultati nisu prikazani). Rezultati za soj CKS1 su slični rezultatima većine celulolitičkih *Paenibacillus* spp.sojeva (Asha et al., 2012; Ko et al., 2007; Raddadi et al., 2013) iako postoje neki sojevi koji proizvode veće količine

endoglukanaza tokom svog rasta na neorganskom izvoru azota (Waeonukul et al., 2009; Wang et al., 2008).

Utvrđeno je da početna pH vrednost podloge ima veliki uticaj na većinu enzimskih reakcija tako što utiče na transport hemijskih produkata i enzima kroz ćelijsku membranu (Rastogi et al., 2010). Stoga je testiran uticaj pH vrednosti podloge koja sadrži otpad lekovitog bilja na proizvodnju egzoglukanaza *P.chitinolyticus* CKS1 (slika 6.10.). Maksimum Avicelazne aktivnosti se dostiže pri pH vrednosti podloge 7, što je u saglasnosti sa rezultatima Makky-a (Makky, 2009).



Slika 6.10. Uticaj početne pH vrednosti podloge na Avicelaznu aktivnost

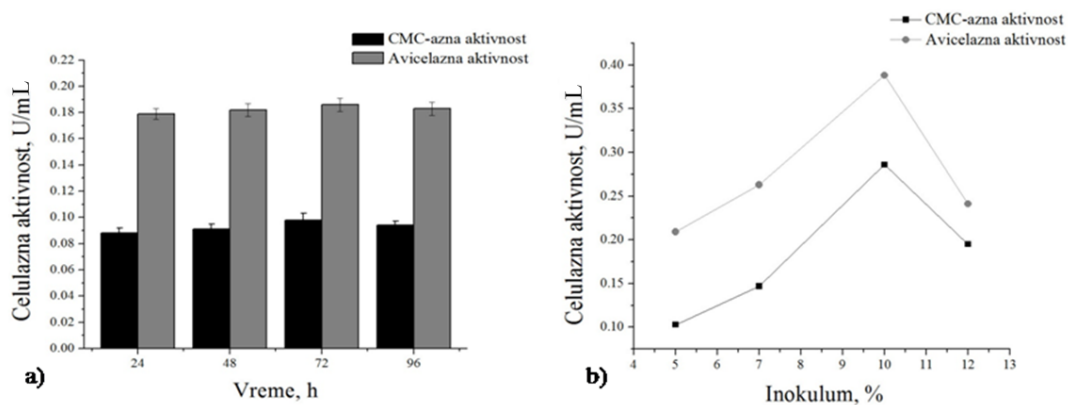
Mešanje i aeracija imaju uticaj na proizvodnju metabolita i enzima zato što rastvoreni kiseonik utiče na ćelijski metabolizam stimulišući bakterijski rast, a samim tim i proizvodnju enzima (Li et al., 2012). Rezultati ispitivanja uticaja različitih zapremina podloge i aeracije, tokom fermentacije *P.chitinolyticus* CKS1 na proizvodnju enzima, pokazuju da brzina obrtaja orbitalne tresilice od 150 rpm stimulatивно deluje na proizvodnju enzima kada se fermentacija odvija u erlenmajeru zapremine 300 mL. Kada se koriste erlenmajeri tipa “leteći tanjir” od 1000 mL sa zapreminom podloge od 100 mL Avicelazna aktivnost se povećava čak 8 puta, što ukazuje da povećanje kontaktne površine između podloge i vazduha omogućava bolju difuziju kiseonika koja stimuliše proizvodnju enzima kod soja CKS1. Brzine mešanja orbitalne tresilice (150-200) rpm nemaju značajan uticaj na povećanje prinosa Avicelazne aktivnosti kada soj CKS1 raste u većim erlenmajerima iako je Avicelazna aktivnost bez mešanja veoma niska. Moguće je da soj CKS1, kao fakultativno aeroban

mikroroganizam ima određene zahteve u potrebama za kiseonikom koje nisu direktno srazmerne sa proizvodnjom celulaza. Slično je primećeno kod bakterije *Marinimicrobium* sp. LS-A18 kod koje se aktivnost inulinazna povećava sa povećanjem brzine mešanja tresilice do određenog broja obrtaja (150-180 rpm). Sa daljim povećanjem broja obrtaja (iznad 180 rpm) nije došlo do značajnih promena u proizvodnjinaведеноg enzima (Li et al., 2012).

### 6.2.3. Proizvodnja celulaza u podlozi sa ječmenim mekinjama(eksperiment 4)

U ovom eksperimentu korišćene su ječmene mekinje kao jeftina otpadna sirovina za proizvodnju celulaza, endoglukanaza i egzoglukanaza. Kako je ječam žitarica koja obiluje ugljenim hidratima, mineralima i vitaminima, tako su se ječmene mekinje pokazale kao dobar izvor ugljenika koji povoljno utiče na proizvodnju celulaza.

Soj CKS1 proizvodi endoglukanaze i egzoglukanaze sa različitom aktivnošću tokom svog rasta u podlozi obogaćenoj ječmenim mekinjama. Maksimalna CMC-azna i Avicelazna aktivnost se postiže već nakon 24h inkubacije sa 10% inokuluma (Slika 6.11. a). Nakon 24 h, dolazi do veoma blagog opadanja celulazne aktivnostiala činjenica da ne dolazi do daljeg rasta celulitičke aktivnosti može biti posledica potrošnje supstrata ili pojave kataboličke represije izazvane nagomilavanjem celobioze (Bano et al., 2013). Takođe, vreme inkubacije zavisi od karakteristika samog mikroorganizma, od njegove brzine rasta kao i od vrste korišćenog susprata za dati proces proizvodnje enzima (Bano et al., 2013; Gangadharan et al., 2008; Qaisar et al., 2014). Još jedan od uzroka opadanja enzimske aktivnosti može biti denaturacija samog enzima usled menjanja pH vrednosti podloge i ćelijskog metabolizma tokom fermentacije (Liu & Yang, 2007).



Slika 6.11. Uticaj a) vremena inkubacije i b) koncentracije inokuluma na celulaznu aktivnost

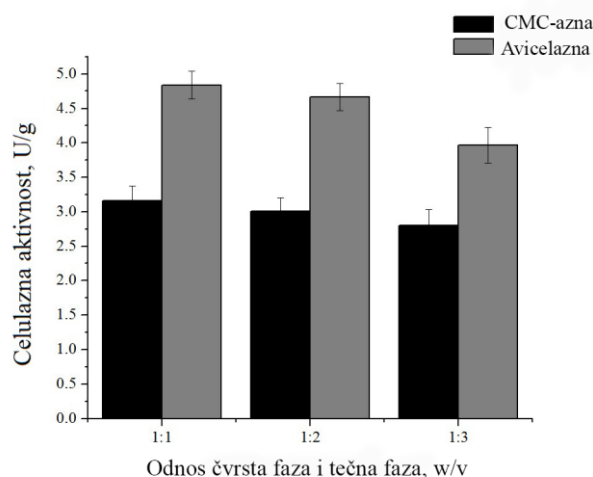
Do značajnog povećanje celulazne aktivnosti, CMC-azne i Avicelazne, dolazi usled povećanja koncentracije inokuluma sa 5 na 10% (Slika 6.11. b). Koncentracija inokuluma pri kojoj se postiže maksimalna CMC-azna i Avicelazna aktivnost iznosi 10%.

## 6.2.2. Proizvodnja celulaza na čvrstom supstratu

U okviru ove disertacije proizvodnja celulaza je praćena u tečnoj podlozi dok će se u ovom delu eksperimenta ispitati mogućnost rasta soja CKS1 na čvrstom otpadnom supstratu koja za posledicu ima proizvodnju enzima celulaza.

### 6.2.2.1. Proizvodnja celulaza na izluženom repinom rezancu

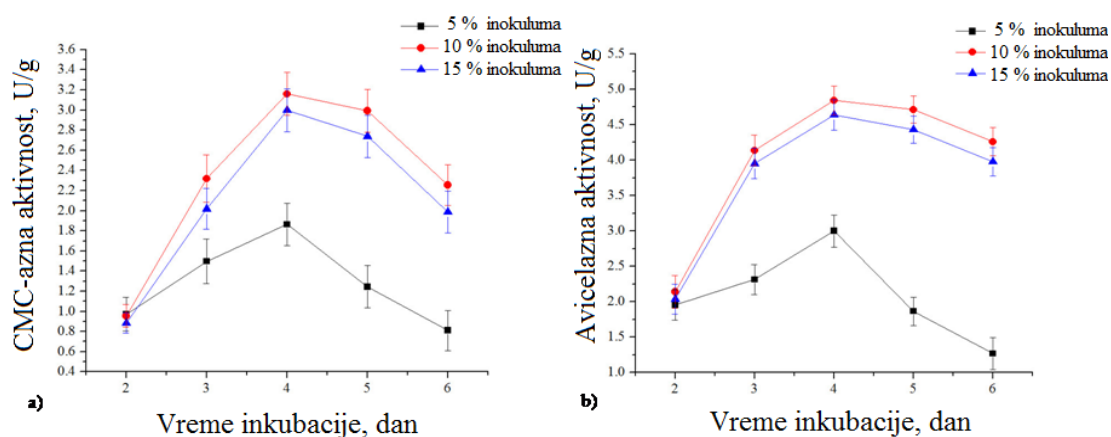
Ispitivanje proizvodnje celulaza, tokom rasta *P. chitinolyticus* CKS1 na čvrstoj podlozi koju čine izluženi rezanci šećerne repe, ukazuje da dati mikroorganizam proizvodi celulaze, sa različitom efikasnošću, pri različitim odnosima sadržaja čvrste faze (izluženog repinog rezanca) i tečne faze (rastvora melase) (slika 6.12.).



Slika 6.12. Proizvodnja celuloza pomoću *P.chitinolyticus* CKS1 tokom rasta na podlozi sa izluženim rezancima šećerne repe pri različitim odnosu sadržaja čvrste i tečne faze (w/v)

Literaturni podaci pokazuju da je proizvodnja enzima celuloza inducibilna i da zavisi od prirode korišćenog ugljenog hidrata tokom fermentacije (Kumar et al., 2008). Izluženi rezanci šećerne repe sadrže celulozu kao induktor celulozne aktivnosti. Dostupni publikovani radovi ukazuju da većinom plesni iz *Trichoderma* roda koriste izlužene rezance šećerne repe kao supstrat za proizvodnju celuloza (Moosavi-Nasab & Majdi-Nasab, 2008; Olsson et al., 2003) dok do danas nema literaturnih podataka vezanih za proizvodnju celuloza pomoću *Paenibacillus* vrsta koristeći izlužene repine rezance. *P.chitinolyticus* CKS1, tokom svog rasta na čvrstom supstratu – izluženim rezancima šećerne repe, proizvodi endoglukanaze i egzoglukanaze nakon 4 dana inkubacije pri različitim odnosima sadržaja čvrste faze i tečnosti. Za soj CKS1, optimalni početni odnos čvrste i tečne faze, iznosi 1:1 i pri tome se proizvodi maksimum CMC-azne aktivnosti od  $3,159 \pm 0,213$  U/g i Avicelazne aktivnosti od  $4,840 \pm 0,201$  U/g. Sadržaj vlage u supstratu je bitan faktor, tokom fermentacije na čvrstoj podlozi, koji utiče na rast mikroorganizma (Alshelmani et al., 2013). Nizak sadržaj vlage vodi do nepotpunog iskorišćavanja nutrijentata i do smanjenog bubrenja supstrata što za posledicu ima smanjen mikrobnii rast i smanjenu enzimsku proizvodnju. Sa druge strane, visok sadržaj vlage smanjuje poroznost supstrata, izaziva gubitak prvobitne strukture supstrata i uzrokuje lepljivost koja sprečava prodiranje kiseonika (Moftah et al., 2012). Optimalan odnos čvrste i tečne faze (destilovane vode) za

*Paenibacillus curdolanolyticus* DSMZ10248 tokom fermentacije na otpadnoj pogači palminog ulja iznosi 1:1 (w/v) dok za isti supstrat optimalan odnos čvrste i tečne faze (destilovane vode kod) *P.polymyxa* ATCC 842 iznosi 1:0,8 (w/v) (Alshelmani et al., 2013).



Slika 6.13. Proizvodnja celulaza pomoću bakterijskog izolata *P.chitinolyticus* CKS1 na izluženim rezancima šećerne repe tokom 6 dana inkubacije: a) CMC-azna aktivnost i b) Avicelazna aktivnost

Proizvodnja enzima endoglukanaza i egzoglukanaza raste tokom fermentacije i maksimum aktivnosti oba enzima dostižu nakon 4 dana fermentacije. Nakon toga, dolazi do opadanja enzimske aktivnosti (CMC-azne i Avicelazne aktivnosti) (slika 6.13.). Do opadanja celulitičke aktivnosti, na oba testirana supstrata, dolazi usled promena uslova u samoj podlozi (promena pH vrednosti, proizvodnja inhibitornih produkata...) kao i usled iscrpljivanja nutrijenata u samom fermentacionoj podlozi što je uočeno kod većine bakterijskih vrsta (Karim et al., 2015).

Kod mikrobnih fermentacija, koncentracija inokuluma ima važnu ulogu u proizvodnji sporednih proizvoda. Sa povećanjem koncentracije inokuluma sa 5 na 10% dolazi do povećanja produkcije celulaza (slika 6.13.) Maksimum proizvodnjeobe celulazese dostiže pri koncentraciji inokuluma od 10%. Maksimum CMC-azne aktivnosti od  $3,159 \pm 0,213$  U/g i Avicelazne aktivnosti od  $4,840 \pm 0,201$  U/g se postiže nakon četiri dana inkubacije sa 10% inokuluma. Veća koncentracija inokuluma od 15% dovodi do opadanja celulazne aktivnosti. Ovo pokazuje da inokulum, odnosno njegova



koncentracija, ima ograničen uticaj na proces fermentacije. Visoka koncentracija inokuluma utiče na opadanje enzimske aktivnosti zbog relativnog nedostatka nutrijenata u hranljivoj podlozi (veći je broj unetih ćelija mikroorganizama koje troše hranljive materije) dok niska koncentracija inokuluma može dovesti takođe do opadanja enzimske aktivnosti usled smanjenog broja ćelija mikroorganizama (Reddy et al., 2008).

S obzirom na to da u dostupnoj literaturi nema podataka o proizvodnji celulaza na čvrstom otpadnom supstratu pomoću vrste *P.chitinolyticus*, u ovom delu eksperimenta je pokazano da soj CKS1 poseduje mogućnost rasta na izluženom repinog rezancu, koja za posledicu ima proizvodnju dve vrste celulolitičkih enzima (endoglukanaza i egzoglukanaza). Osim toga, korišćenje izluženog repinog rezanca i melase kao otpadnih proizvoda iz industrije prerade šećerne repe za proizvodnju enzima je sa ekonomske strane veoma prihvatljivo. Konverzija celuloze iz izluženog repinog rezanca do fermentabilnih šećera čini ovaj supstrat veoma pogodnom otpadnom sirovinom za potencijalnu primenu u proizvodnji bioetanol.

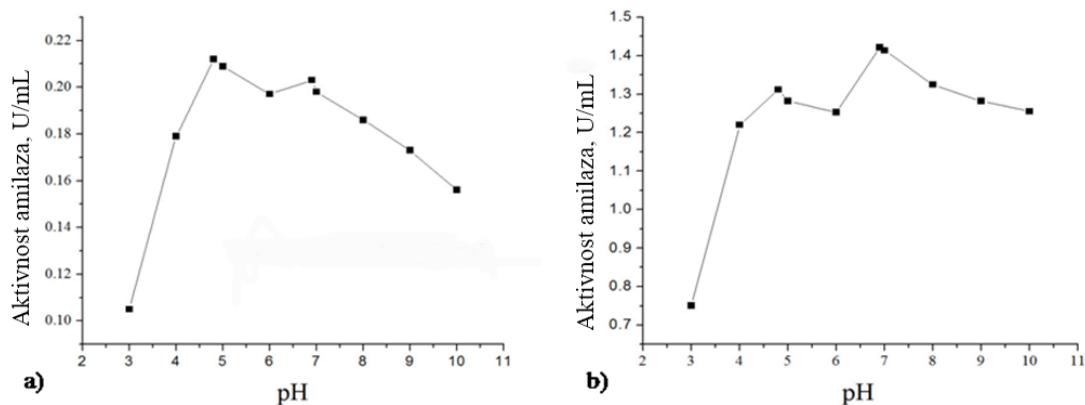
### 6.3. Proizvodnja amilaza

Da bi se odredilo koji tip amilolitičkog enzima ( $\alpha$ -amilaze ili  $\beta$ -amilaze) proizvodi *P.chitinolyticus* CKS1, na samom početku istraživanja, ispitan je uticaj pH vrednosti na aktivnost sirovog enzima u komercijalnoj podlozi i u otpadnoj vodi iz industrije prerade kartona. U nastavku istraživanja, zbog svojih poželjnih karakteristika, ispitivana je samo proizvodnja  $\beta$ -amilaza na otpadnim materijalima: otpadnoj vodi iz industrije prerade kartonske ambalaže i na melasi i izluženom repinom rezancu.

#### ***6.3.1. Proizvodnja amilaza na komercijalnoj podlozi i u podlozi sa otpadnom vodom iz industrije prerade kartonske ambalaže (eksperiment 1 i eksperiment 2)***

##### *6.3.1.1. Uticaj pH na aktivnost sirovih amilaza*

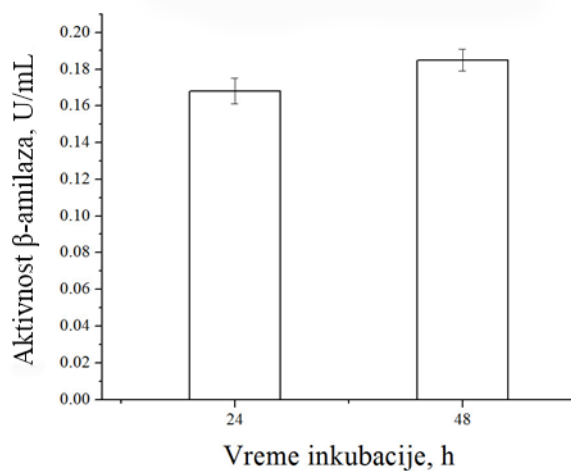
Tokom ispitivanja uticaja pH na amilolitičku aktivnost sirovog enzima (bakterijski supernatant) utvrđeno je postojanje dva pika, koji nagoveštavaju prisustvo dva amilolitička enzima koje proizvodi *P.chitinolyticus* CKS1 (slika 6.14.). Dobijeni rezultati pokazuju da jedan enzim ima optimalno pH 4,8 ( $\beta$ -amilaza) a drugi 6,9 ( $\alpha$ -amilaza). Na osnovu literaturnih podataka i dobijenih proizvoda hidrolize skroba, može se zaključiti da je pri izvođenju enzimskog testa pri pH 4,8 enzimska aktivnost predominantno  $\beta$ -amilazna. Da bi se odredio tip enzima ( $\alpha$ -amilaza ili  $\beta$ -amilaza) koji proizvodi testirani soj, proizvodi hidrolize skroba koji se dobijaju sa sirovim enzimom na pH 4,8 i pH 6,9 su analizirani tečnom hromatografijom visokih performansi (HPLC). Dobijeni rezultati pokazuju predominantno prisustvo maltoze u hidrolizatu dobijenom pri pH 4,8 sa tragovima ostalih ugljenih hidrata uključujući glukozu i duže oligosaharide (Prilog 3, SlikaP3-1).



Slika 6.14. Uticaj pH na amilolitičku aktivnost sirovog enzima dobijenog na otpadnoj vodi (a) i skrobnoj podlozi (b)

### 6.3.1.2. Uticaj vremena inkubacije i pasažiranja kulture na proizvodnju $\beta$ -amilaza

Produkcija  $\beta$ -amilaza pomoću soja CKS1 je praćena u podlozi koja sadrži otpadnu vodu i dodatni izvor azota u formi kvašćevog ekstrakta i kazein hidrolizata. U cilju postizanja maksimalne enzimske hidrolize, dobijeni hidrolizati su nakon 24 h i 48 h inkubacije analizirani na aktivnost  $\beta$ -amilaza.  $\beta$ -Amilaze pokazuju aktivnost nakon 24 h inkubacije soja CKS1 koja se dalje povećava sa povećanjem vremena inkubacije i nakon 48 h iznosi 0,185 U/mL (slika 6.15.).



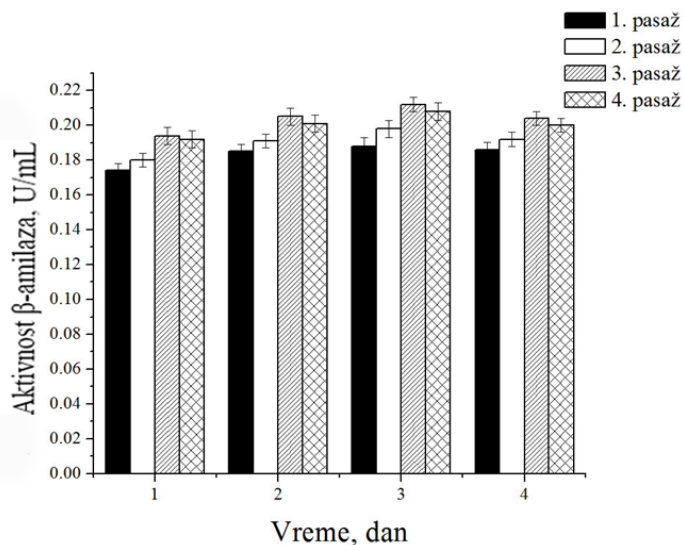
Slika 6.15. Uticaj vremena inkubacije na aktivnost  $\beta$ -amilaza

U poređenju sa amilaznom aktivnošću drugih bakterija, ovo je veoma niska vrednost. Treba imati u vidu da je dobijena aktivnost amilazačak 10 puta niža od one koja se dobija korišćenjem komercijalnog skroba kao induktora sinteze amilaza u tečnojpodlozi (Slika 6.14.). Amilaze su inducibilni enzimi i za njihovu proizvodnju neophodan je odgovarajući izvor ugljenika. U ovom eksperimentu, otpadna voda korišćena je kao supstrat za rast mikroorganizma i proizvodnju enzima. Ova otpadna voda sadrži svega 0,1% suspendovanih čvrstih materija (Prilog 5, Tabela P5-1) koje se sastoje uglavnom od ostataka skrobnog lepka, koji predstavljaju izvor ugljenika za rast mikroorganizma i proizvodnju amilaza. Niske vrednosti aktivnosti amilaza mogu da se objasne malom koncentracijom skroba u otpadnoj vodi. Pored ograničene količine supstrata, otpadna voda može sadržati i različite inhibitore mikrobnog rasta (vrednosti nisu praćene) i/ili različite toksične materije koje mogu negativno uticati na bakterijski rast i enzimsku proizvodnju.

Hernandez i saradnici (Hernández et al., 2006) su ispitivali uticaj početne koncentracije skroba 10,0-40,0 g/L u otpadnim vodama iz industrije piva i mesa na proizvodnju amilaza. Obe otpadne vode su obogaćene dodavanjem skroba. Pri dodatoj koncentraciji skroba, od 40,0 g/L, postiže se maksimalna amilazna aktivnost od 70,29 U/mL u otpadnoj vodi iz industrije piva, dok je 60,12 U/mL zabeleženo u otpadnoj vodi iz industrije prerade mesa. Ovi rezultati ukazuju da skrob, kao izvor ugljenika, ima veliki uticaj na proizvodnju enzima. S obzirom na to, da je cilj ovog eksperimenta bio prečistiti otpadnu vodu i proizvesti enzim amilazu, u otpadnu vodu iz industrije prerade kartonske ambalaženije dodavan dodatni izvor ugljenika.

Prema Boidin-u i Effront-u (Boidin & Effront, 1917), adaptacija mikroorganizma, njegovim pasažiranjem u podlozi koja je istog sastava kao ona koja se koristi za finalno izvođenje procesa proizvodnje, se pokazala kao efikasan način povećanja prinosa željenih proizvoda. Ovo ukazuje da je određena adaptacija mikroorganizma neophodna da bi se dobila njegova željena karakteristika.

U cilju ispitivanja uticaja adaptacije mikroorganizma u podlozi na formiranje željenih osobina mikroorganizma, u ovom slučaju proizvodnju enzima amilaza, praćen je uticaj pasažiranja mikroorganizma na aktivnost i proizvodnju  $\beta$ -amilaza. Rezultati su pokazali da se aktivnost  $\beta$ -amilaza povećava sa pasažiranjem mikroorganizma i sa vremenom inkubacije (Slika 6.16.).



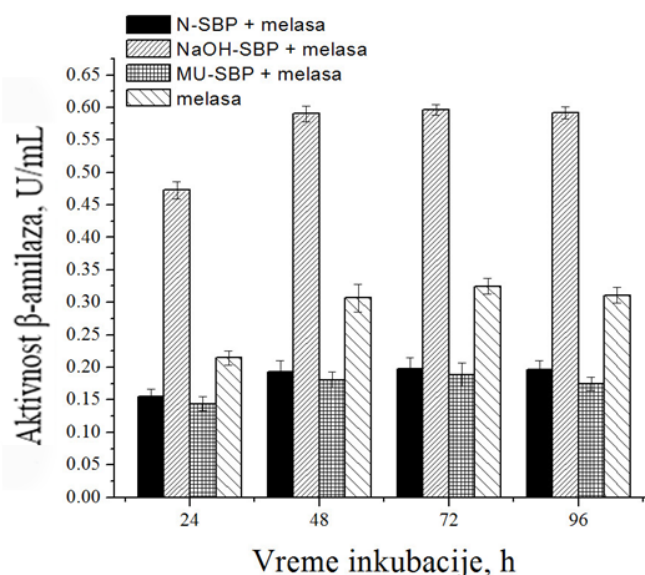
Slika 6.16. Uticaj pasažiranja na proizvodnju  $\beta$ -amilaza

Maksimum aktivnosti  $\beta$ -amilaza od 0,212 U/mL je primećen u trećem pasažu trećeg dana inkubacije. Blago opadanje aktivnosti je detektovano u četvrtom pasažu. Stoga, drugi pasaž se dalje koristi kao inokulum za izvođenje eksperimenta proizvodnje  $\beta$ -amilaza zbog toga što ovakav “dizajn” omogućava izvođenje ostalih eksperimenata sa maksimalnom aktivnošću enzima u trećem pasažu.

### 6.3.2. Proizvodnja $\beta$ -amilaza na malasi i izluženom repinom rezancu (eksperiment 3)

$\beta$ -amilaze su inducibilni enzimi (Hensley et al., 1980; Olufunke & Azeez, 2012) i njihova indukcija se vrši u uglavnom u prisustvu skroba (Ajayi & Fagade, 2003), skroba i glicerola (Cotârleț, 2013) i kola-orašastog skroba (eng. *kola nut starch*) (Olufunke & Azeez, 2012). Nema dostupnih literaturnih podataka o proizvodnji  $\beta$ -amilaza na melasi ili na melasi i repinim rezancima. Takođe, u maloj meri je ispitivana mogućnost proizvodnje amilaza pomoću vrsta iz roda *Paenibacillus*, gde postoji doprinos samo istraživanja Hameed-a i saradnika (Hameed et al., 2012). Sa idejom da se ispita mogućnost korišćenja melase za indukciju sinteze  $\beta$ -amilaza pomoću *P.chitinolyticus* CKS1, u ovom eksperimentu, melasa šećerne repe (melasa) je korišćena kao tečna podloga, uz dodatak čvrstog repinog rezanca (SBP), i ovaj dvofazni sistem je optimizovan u cilju maksimalne proizvodnje amilaza.

Visoke količine ukupnih šećera u melasi, ukazuju na to da bi melasa mogla biti pogodan izvor ugljenika za rast mikroorganizama. Ukupna količina azota u melasi je dovoljna za rast soja CKS1 iako naša prethodna istraživanja (odjeljak 5.5.2. eksperiment 2) ukazuju na povoljan uticaj dodatka azota u obliku kvašćevog ekstrakta i kazein hidrolizata (Mihajlovski et al., 2015b). Na osnovu preliminarnih ispitivanja (rezultati nisu prikazani), proizvodnja  $\beta$ -amilaza je najveća u medijumu sa 2% rastvorom melase, i zbog toga je ova koncentracija melase odabrana u daljem ispitivanju. U nastavku istraživanja, ispitan je uticaj izluženog repinog rezanca u melasi, uključujući netretirani repin rezanac (N-SBP), rezanac tretiran NaOH (NaOH-SBP) i rezanac tretiran kombinacijom mikrotalasnog i ultrazvučnog zračenja (MU-SBP) na proizvodnju  $\beta$ -amilaza tokom četiri dana inkubacije soja CKS1 (slika 6.17.). Tokom prva dva dana fermentacije, aktivnost  $\beta$ -amilaza se povećava u svim testiranim uzorcima, dostižući maksimum trećeg dana da bi nakon toga došlo do opadanja enzimske aktivnosti. Maksimum aktivnosti  $\beta$ -amilaza od 0,596 U/mL se detektuje u uzorku koji sadrži izluženi repin rezanac tretiran NaOH i melasu. Niže vrednosti aktivnosti  $\beta$ -amilaza se beleže u uzorcima sa čistom melasom (0,324 U/mL), zatim u uzorcima sa netretiranim i melasom (0,197 U/mL), dok se najniža vrednost postiže u uzorku sa dodatkom rezanca tretiranog kombinacijom mikrotalasa i ultrazvuka (0,189 U/mL).



Slika 6.17. Aktivnost  $\beta$ -amilaza tokom 4 dana inkubacije soja CKS1 na izluženom repinom rezancu (različiti predtretman) i melasi

*P.chitinolyticus* CKS1 za svoj rast i proizvodnju enzima amilaza koristi rastvorne šećere iz melase. Dodatkom netretiranog repinog rezanca u melasu amilazna aktivnost se smanjuje u odnosu na uzorak sa melasom. Kada su mikroorganizmu istovremeno dostupna dva supstrata kao izvor ugljenika i energije, on prvo koristi onaj supstrat koji mu omogućava bržu stopu rasta. Tek nakon što je prvi supstrat koji mu je omogućavao brži rast iscrpljen, mikroorganizam počinje sintezu novih enzima neophodnih za korišćenje drugog supstrata (Kompala et al., 1986). Pored amilaza, u uzorku melase i netretiranog repinog rezanca prisutne su i celulaze sa CMC-aznom i Avicelaznom aktivnošću od 0,081 U/mL i 0,094 U/mL, pojedinačno.

Kombinacija mikrotalasnog i ultrazvučnog predtretmana nije pokazala pozitivan uticaj na indukciju sinteze  $\beta$ -amilaza ali je u ovom uzorku takođe zabeležena aktivnost enzima celulaza i to CMC-azna aktivnost 0,084 U/mL i Avicelazna aktivnost 0,096 U/mL koja je nešto veća od vrednosti endoglukanaza i egzoglukanaza u uzorku sa melasom i netretiranim repinim rezancem. Moguće objašnjenje smanjene amilazne aktivnosti na račun blagog povećanja celulazne aktivnosti leži u oslobađanju određenih količina rastvornih šećera mikrotalasnim i ultrazvučnim tretmanom repinog rezanca koji pogoduju sintezi celulaza. Oslobađanje velikih količina saharoze i manjih količina rastvornih monosaharida ultrazvučnim predtretmanom repinog rezanca zabeležili su Rezić i saradnici koristeći različita vremena ultrazvuka prilikom tretiranja uzorka (5-45 min) (Rezić et al., 2013). Nerastvorni ugljeni hidrati u rezancima šećerne repe (celuloza, hemiceluloza i pektin) nisu lako dostupni soju CKS1 tokom fermentacije i amilazne proizvodnje i stoga za uspešnu fermentaciju, ćelijski zid repinog rezanca mora da se degradira (Kühnel et al., 2011). Kada se govori o predtretmanu, on mora biti dovoljno jak da razori celulozno-hemiceluloznu mrežu i, ako je prisutna, celulozno-ligninsku mrežu (Kühnel et al., 2011). Predtretman izluženog repinog rezanca sa NaOH ima pozitivan uticaj na proizvodnju  $\beta$ -amilaza koja je najveća u ovom uzorku u poređenju sa netretiranim rezancem ili sa kombinacijom mikrotalasa i ultrazvuka tretiranim rezancem. U ovom uzorku enzimska aktivnost je najveća jer tokom fermentacije ćelije *P.chitinolyticus* CKS1 se imobilizuju na repin rezanac. Skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) (Prilog 4, Slika P4-1) je zabeležen izgled unutar repinog rezanca kao i njegova površina nakon fermentacije. Na slici (Prilog 4, Slika P4-1) prikazana je morfologija repinog rezanca tretiranog sa NaOH koja je veoma gruba i

porozna. Površina repinog rezanca ima dosta šupljina i pora koje omogućavaju ćelijama bakterije da se vežu. Imobilisane ćelije, na površini i u porama i šupljinama repinog rezanca prikazane su na slici (Prilog 4, Slika P4-1).

Izluženi repin rezanac je u ranije publikovanoj literaturi opisan kao potentan nosač za imobilizaciju ćelija kvasca *S.cerevisiae* u proizvodnji bioetanol (Vučurović & Razmovski, 2012a). Adhezija ćelija mikroorganizma na nosač je rezultat elektrostatičkih interakcija između pozitivno naelektrisanih vezujućih mesta na nosaču i nativno negativno naelektrisane površine ćelija (Vučurović & Razmovski, 2012a). U zavisnosti od pH vrednosti podloge, površina repinog rezanca može biti pozitivno ili negativno naelektrisana (Vučurović et al., 2012). Površina ćelija *P.polymyxa* je negativno naelektrisana u širokom opsegu pH vrednosti (Sharma et al., 2001). Kako se slično može pretpostaviti i za *Paenibacillus chitinolyticus*, tokom procesa fermentacije, pH rastvora opada i stoga pozitivno naelektrisana površina nosača (repin rezanac) stvara uslove za povećanje adhezije ćelija *P.chitinolyticus* CKS1 na površinu repinog rezanca.

#### **6.4. Primena eksperimentalnog dizajna za optimizaciju procesa proizvodnje enzima**

##### ***6.4.1. Optimizacija procesa proizvodnje celulaza u podlozi sa ječmenim mekinjama***

U ovom eksperimentu je izvršeno određivanje uticaja sadržaja ječmenih mekinja i koncentracije kvašćevog ekstrakta na proizvodnju celulaza u cilju optimizacije procesa fermentacije sa ciljem dobijanja celulaza. Kvašćev ekstrakt je odabran kao jedna od procesnih promenljivih zato što se u prethodnim ispitivanjima (odjeljak 5.4.1.1. eksperiment 1) ovaj izvor azota pokazao optimalnim za proizvodnju endoglukanaza pa se pretpostavlja da će imati uticaj i na proizvodnju egzoglukanaz abudući da ova dva enzima predstavljaju enzimski kompleks.

Izlazni parametri, tj. odzivi, koji su u modelima određivani, su CMC-azna i Avicelazna aktivnost.



#### 6.4.1.1. Ocena značajnosti modela

Na osnovu zadatih graničnih vrednosti dve procesne promenljive (prikazanih u tabeli 5.3., odeljak 5.6.1.1.), program je zadao 14 eksperimentalnih uslova prikazanih u tabeli 6.2. Primenom ovih eksperimentalnih uslova, izvršeno je merenje CMC-azne i Avicelazne aktivnosti, što je takođe prikazano u tabeli 6.2.

Tabela 6.2. Definisane vrednosti procesnih promenljivih (A i B) i eksperimentalne vrednosti CMC-azne i Avicelazne aktivnosti (odziv sistema, Y1 i Y2)

Eksperiment	Procesne promenljive		Odziv sistema	
	A (%)	B (g/L)	Y1 (U/mL)	Y2 (U/mL)
1	4	2	0,389	0,421
2	4	6	0,297	0,381
3	2,5	6,4	0,164	0,182
4	1	6	0,028	0,027
5	2,5	1,6	0,208	0,211
6	2,5	6,4	0,121	0,170
7	0,7	4	0,032	0,041
8	4,3	4	0,424	0,487
9	0,7	4	0,028	0,023
10	2,5	4	0,156	0,174
11	4,3	4	0,420	0,475
12	2,5	4	0,183	0,191
13	1	2	0,029	0,036
14	2,5	1,6	0,184	0,195

A: koncentracija ječmenih mekinja; B: koncentracija kvašćevog ekstrakta Y1: CMC-azna aktivnost; Y2: Avicelazna aktivnost.

#### 6.4.1.1.1. Ocena značajnosti modela 1 –proizvodnja endoglukanaza

Za ocenu značajnosti modela 1, odnosno proizvodnje endoglukanaza i uticaja ispitivanih parametara, kao i njihovih međusobnih interakcija korišćena je analiza varijanse (ANOVA), a rezultati su prikazani u tabeli 6.3.

Tabela 6.3. Analiza varijanse (ANOVA) modela ispitivanja uticaja sadržaja ječmenih mekinja i koncentracije kvašćevog ekstrakta na proizvodnju endoglukanaza

	F - vrednost	p- vrednost Prob >F
Model	159,45	< 0,0001 <sup>a</sup>
A	755,47	< 0,0001 <sup>a</sup>
B	15,03	0,0047 <sup>a</sup>
AB	6,20	0,0376 <sup>a</sup>
A <sup>2</sup>	10,13	0,0129 <sup>a</sup>
B <sup>2</sup>	1,47	0,2594 <sup>b</sup>
Nedostatak fitovanja	1,13	0,4208 <sup>b</sup>
R <sup>2</sup>	0,9901	
Podešeni R <sup>2</sup>	0,9839	
Predviđeni R <sup>2</sup>	0,9685	
C.V, %	9,61	
Adekvatna preciznost	32,134	

<sup>a</sup>Značajni koeficijent (P< 0,05)  
<sup>b</sup>Neznačajni koeficijent

Veza između dve nezavisne promenljive i jednog odziva sistema bila je u dobroj saglasnosti sa kvadratnim modelom. Utvrđeno je i da se rezultati ponašaju u skladu sa predviđenom jednačinom polinoma drugog reda. Na osnovu dobijenih podataka i analize sprovedene programom *Design Expert* 8.0, izvedena je jednačina za dati model koja ima sledeći oblik:

$$Y1 = - 0.085 + 0.073A + 0.030B - 7.5810^{-3}AB + 0.013A^2 - 2.7710^{-3}B^2 \quad (6.1.)$$

gde je Y1(CMC-azna aktivnost) odziv sistema a A (koncentracija ječmenih mekinja) i B (koncentracija kvašćevog ekstrakta) su procesne promenljive.

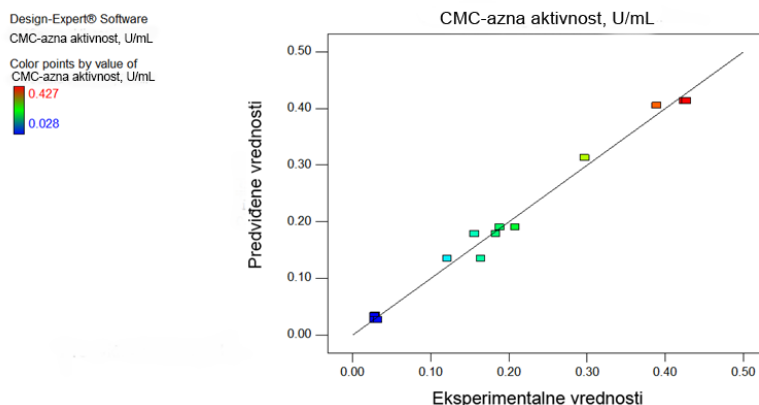
Iz vrednosti koeficijenata možemo da zaključimo da najveći uticaj na CMC-aznu aktivnost ima koncentracija ječmenih mekinja.

Vrednost  $p < 0,0001$  znači da je model u celini značajan. Neznačajna vrednost F-vrednost nedostatka fitovanja (0,4208), u poređenju sa čistom greškom, ukazuje da je model dobro opisan predviđenom jednačinom. Vrednost adekvatne preciznosti 32,134 je veća od 4 što ukazuje da je signal adekvatan. Koeficijent varijacije C.V. definiše reproduktivnost modela, i ako C.V. modela nije veći od 10% model se može smatrati reproduktivnim. Vrednost C.V. 9,61 sugerise da je model pouzdan i reproduktivan (tabela 6.3.).

Značajni faktori (p-vrednost  $< 0,05$ ) koji utiču na odziv sistema su A, B, kvadratni koeficijent A ( $A^2$ ) kao i interakcija AB.

Vrednosti koeficijenta  $R^2(0,9901)$  je bliska 1 za dati model što je veoma visoka vrednost i ukazuje da se većina podataka uklapa u regresioni model, odnosno da postoji dobra korelacija između predviđenih i eksperimentalno dobijenih vrednosti rezultata, njihovo dobro uklapanje sa niskom disperzijom (Slika 6.18.)

Slaganje eksperimentalno dobijenih i modelom predviđenih vrednosti su prikazani na slici 6.18.



Slika 6.18. Slaganje eksperimentalno dobijenih i predviđenih vrednosti modela ispitivanja uticaja sadržaja ječmenih mekinja i koncentracije kvašćevog ekstrakta na proizvodnju endoglukanaza

#### 6.4.1.1.1.2. Ocena značajnosti modela 2 – proizvodnja egzoglukanaza

Za ocenu značajnosti modela 2, odnosno proizvodnje egzoglukanaza i uticaja ispitivanih parametara, kao i njihovih međusobnih interakcija korišćena je analiza varijanse (ANOVA), a rezultati su prikazani u tabeli 6.4.

Tabela 6.4. Analiza varijanse (ANOVA) modela ispitivanja uticaja sadržaja ječmenih mekinja i koncentracije kvašćevog ekstrakta na proizvodnju egzoglukanaza

	F - vrednost	p- vrednost Prob >F
Model	358,55	< 0,0001 <sup>a</sup>
A	1730,18	< 0,0001 <sup>a</sup>
B	6,79	0,0313 <sup>a</sup>
AB	1,23	0,2997 <sup>b</sup>
A <sup>2</sup>	35,24	0,0003 <sup>a</sup>
B <sup>2</sup>	0,73	0,4185 <sup>b</sup>
Nedostatak fitovanja	2,84	0,1454 <sup>b</sup>
R <sup>2</sup>	0,9956	
Podršeni R <sup>2</sup>	0,9928	
Predviđeni R <sup>2</sup>	0,9843	
C.V, %	6,49	
Adekvatna preciznost	48,630	

<sup>a</sup>Značajni koeficijent (P< 0,05)  
<sup>b</sup>Neznačajni koeficijent

Veza između dve nezavisne promenljive i jednog odziva sistema bila je u dobroj saglasnosti sa kvadratnim modelom. Utvrđeno je i da se rezultati ponašaju u skladu sa predviđenom jednačinom polinoma drugog reda. Na osnovu dobijenih podataka i analize sprovedene programom *Design Expert* 8.0, izvedena je jednačina za dati model koja ima sledeći oblik:

$$Y_2 = 0.032 + 0.043A + 0.0125B - 2.58310^{-3}AB + 0.018A^2 - 1.48810^{-3}B^2 \quad (6.2.)$$

gde je Y<sub>1</sub> (Avicelazna aktivnost) odziv sistema a A (koncentracija ječmenih mekinja) i B (koncentracija kvašćevog ekstrakta) su procesne promenljive.

Iz vrednosti koeficijenata možemo da zaključimo da najveći uticaj na Avicelaznu aktivnost ima koncentracija ječmenih mekinja.

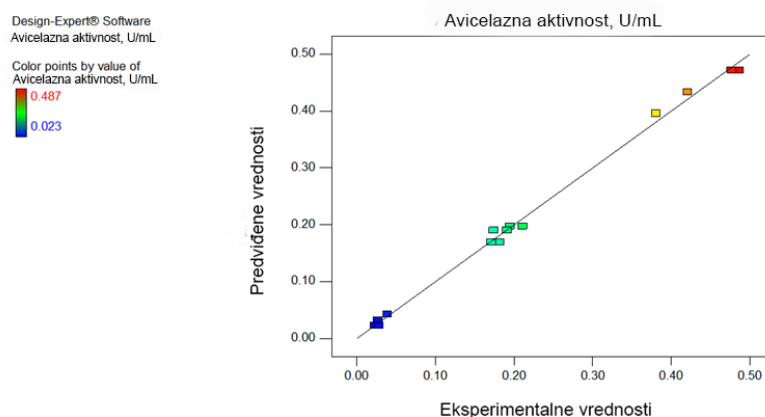
Vrednost p<0,0001 znači da je model u celini značajan. Neznačajna vrednost F-vrednost nedostatka fitovanja (0,1454), u poređenju sa čistom greškom, ukazuje da je

model dobro opisan predviđenom jednačinom. Vrednost adekvatne preciznosti 48,630 je veća od 4 što ukazuje da je signal adekvatan. Koeficijent varijacije C.V. definiše reproduktivnost modela, i ako C.V. modela nije veći od 10% model se može smatrati reproduktivnim. Vrednost C.V. 6,49 sugerise da je model pouzdan i reproduktivan (tabela 6.4.).

Značajni faktori ( $p$ -vrednost $<0,05$ ) koji utiču na odziv sistema su A, B, i kvadratni koeficijent A ( $A^2$ ).

Vrednosti koeficijenta  $R^2$  (0,9956) je bliska 1 za dati model što je veoma visoka vrednost i ukazuje da se većina podataka uklapa u regresioni model, odnosno da postoji dobra korelacija između predviđenih i eksperimentalno dobijenih vrednosti rezultata, njihovo dobro uklapanje sa niskom disperzijom (Slika 6.20.)

Slaganje eksperimentalno dobijenih i modelom predviđenih vrednosti su prikazani na slici 6.20.

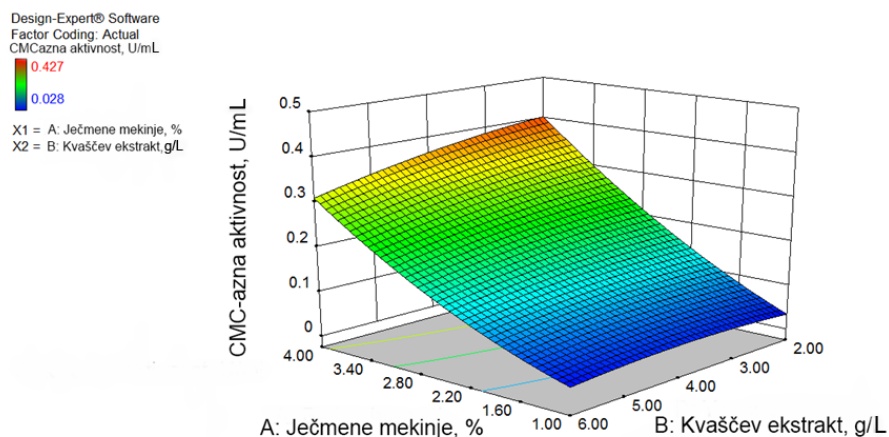


Slika 6.20. Slaganje eksperimentalno dobijenih i predviđenih vrednosti modelaispitivanja uticaja sadržaja ječmenih mekinja i koncentracije kvašćevog ekstrakta na proizvodnju egzoglukanaza

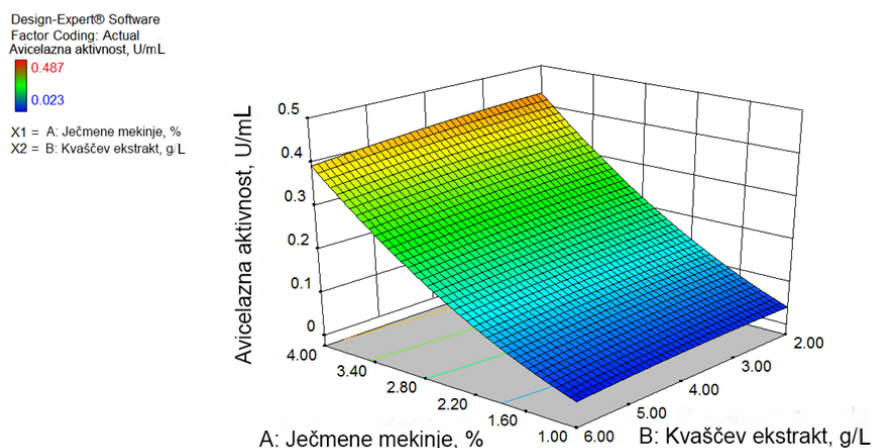
#### 6.4.1.2. Uticaj procesnih promenljivih na CMC-aznu i Avicelaznu aktivnost

Regresionom analizom je utvrđeno da je uticaj koncentracije ječmenih mekinja (A) i koncentracije kvašćevog ekstrakta (B) na proizvodnju endoglukanaza statistički značajno ( $p<0,05$ ) kao i njihova međusobna interakcija AB. Kvadratni član  $A^2$  ima statistički značajan uticaj na proizvodnjuen doglukanaza dok član  $B^2$  nije statistički značajan. Koncentracija ječmenih mekinja u ovom eksperimentu varirana je od 0,7 –

4,3% (Tabela 6.2.) pri čemu su eksperimentalno dobijene vrednosti CMC-azne aktivnosti u opsegu 0,027-0,424 U/mL (Tabela 6.2.). Maksimalna vrednost CMC-azne aktivnosti, dobijena pod optimalnim uslovima, bila je veoma bliska sa modelom predviđenom vrednošću od 0,405 U/mL uz korišćenje 4% ječmenih mekinja i 2,0 g/L kvašćevog ekstrakta. Na slici 6.21 a grafički su prikazani interaktivni efekti ispitivanih parametara na proizvodnju endoglukanaza.



a)



b)

Slika 6.21. 3D grafik međusobnih uticaja koncentracije ječmenih mekinja (A) i koncentracije kvašćevog ekstrakta (B) na a) proizvodnju endoglukanaza i b) proizvodnju egzoglukanaza

Regresionom analizom je utvrđeno da uticaj koncentracije ječmenih mekinja (A) i koncentracije kvašćevog ekstrakta (B) na proizvodnju egzoglukanaza statistički značajno ( $p < 0,05$ ) dok njihova međusobna interakcija AB nije statistički značajna ( $p > 0,05$ ). Kvadratni član  $A^2$  ima statistički značajan uticaj na proizvodnju egzoglukanaza dok član  $B^2$  nije statistički značajan. Koncentracija ječmenih mekinja je u ovom eksperimentu varirana od 0,7 – 4,3% (Tabela 6.2.) pri čemu su eksperimentalno dobijene vrednosti Avicelazne aktivnosti u opsegu 0,036-0,487 U/mL (Tabela 6.2.). Maksimalna vrednost Avicelazne aktivnosti, dobijena pod optimalnim uslovima, bila je veoma bliska sa modelom predviđenom vrednošću od 0,433 U/mL uz korišćenje 4% ječmenih mekinja i 2,0 g/L kvašćevog ekstrakta. Na slici 6.21 b grafički su prikazani interaktivni efekti ispitivanih parametara na proizvodnju egzoglukanaza.

Ječmene mekinje nastaju u procesa mlevenja zrna ječma i uglavnom sastoje od celuloze, hemiceluloze i lignina (Couto & Sanromán, 2005). Tokom procesa mlevenja, sa ljuskom se zahvataju i unutrašnji delovi samog zrna, koje je bogato skrobom, tako da se pored lignoceluloznog sastava u samim mekinjama može nalaziti i skrob (Newman & Newman, 2008). Zbog visokog sadržaja lignina i hemiceluloze, ječmam se uglavnom koristi u procesima fermentacije za proizvodnju enzima lakaza (Gómez et al., 2005; Lorenzo et al., 2002). Nema dostupnih literaturnih podataka o proizvodnji optimizaciji procesa fermentacije za proizvodnju celulaza pomoću vrsti *Paenibacillus* sp. na ječmenim mekinjama. Uopšteno, literaturni podaci su veoma siromašni kada je reč o proizvodnji celulaza pomoću mikroorganizama koristeći ječmam kao supstrat i dostupno je svega nekoliko radova. Assareh i saradnici (Assareh et al., 2012) su koristili netretiranu ječmenu stabljiku za proizvodnju celulaza pomoću novog bakterijskog izolata *Geobacillus* sp. T1. Kombinacija ječmenih mekinja i kukuruzne slame je korišćena za proizvodnju endoglukanaza kod plesni *Aspergillus fumigates*, prilikom selekcije plesni producenata celulaza (Moretti et al., 2012).

U ovom delu eksperimenta ječmene mekinje su korišćene kao supstrat u tečnoj podlozi za rast *P.chitinolyticus* CKS1 i proizvodnju enzima celulaza. Celulaze su inducibilni enzimi i na njihovu proizvodnju najviše utiče izbor ugljenog hidrata koji se koristi kao supstrat u hranljivoj podlozi (Kumar et al., 2008). Literaturni podaci ukazuju da različiti otpadni materijali, koji sadrže celulozu, koji se koriste u procesu fermentacije takođe mogu biti induktori celulazne aktivnosti (Doppelbauer et al., 1987;

Romero et al., 1999). Naša prethodna istraživanja pokazuju da različiti tipovi lignoceluloznih otpadnih materijala mogu indukovati različite nivoe endoglukanaza i egzoglukanaza tokom fermentacije *P.chitinolyticus* CKS1 utečnoj podlozi (Mihajlovski et al., 2015a) (poglavlje 5.4.1.2. eksperiment 1). Tokom svog rasta u podlozi sa ječmenim mekinjama, soj CKS1 proizvodi dva tipa celulaza: endoglukanaze i egzoglukanaze. Pri optimalnim uslovima, koncentraciji ječmenih mekinja od 4% i koncentraciji kvašćevog ekstrakta od 2,0 g/L, maksimum CMC-azne i Avicelazne aktivnosti iznose 0,405 U/mL i 0,433 U/mL, pojedinačno. Druge studije pokazuju više vrednosti CMC-azne aktivnosti od aktivnosti zabeležene u ovom eksperimentu. Tako na primer, tokom rasta na ječmenim stabljikama, *Geobacillus* sp. proizvodi endoglukanaze sa maksimalnom CMC-aznom aktivnošću od 143,5 U/mL (Assareh et al., 2012). Soj CKS1 tokom rasta na ječmenim mekinjama proizvodi dva tipa celulaza, endoglukanaze i egzoglukanaze dok je kod *Geobacillus* sp. sinteza enzima usmerena samo ka endoglukanazama. Avicelazna aktivnost (0,433 U/mL) koju proizvodi soj CKS1 tokom rasta u podlozi sa ječmenim mekinjama je niža u poređenju sa Avicelaznom aktivnošću (1,94 U/mL i 1,75 U/mL) koju proizvodi isti soj prilikom rasta na otpadnom lekovitom bilju i piljevini (poglavlje 5.4.1.2. eksperiment 3). Moguće objašnjenje leži u činjenici da su dva različita otpadna supstrata korišćena za indukciju celulaza pa je shodno tome zabeležena i različita aktivnost egzoglukanaza. Nekoliko studija u literaturi ukazuje na to da je izbor ugljenika koji se koristi u procesima fermentacija jedan od najvažnijih faktora koji utiču na prinos celulaza (Ögel et al., 2001). Na primer, prethodno spomenute ječmene stabljike su odličan induktor CMC-azne aktivnosti (143,5 U/mL) kod *Geobacillus* sp. (Assareh et al., 2012), šećerna trska se koristi za indukciju egzoglukanaza (Avicelazna aktivnost 1.06 U/mL) kod *Geobacillus stearothermophilus* (Makky, 2009) dok ječam indukuje egzoglukanaze (Avicelazna aktivnost 0,10 U/mL) kod plesni *Scytalidium thermophilum* (Ögel et al., 2001). Aktivnost proizvedenih egzoglukanaza na ječmenim mekinjama je veća u odnosu na aktivnost endoglukanaza što ukazuje na to da bakterijski supernatant pretežno sadrži veći nivo egzoglukanaza. Slična pojava je zabeležena tokom rasta soja CKS1 na otpadnom lekovitom bilju i piljevini (poglavlje 5.4.1.2. eksperiment 3). Nema dostupnih literurnih podataka o celulaznoj proizvodnji iz *P. chitinolyticus*, osim publikovanog rada naše istraživačke grupe (Mihajlovski et al., 2015a) dok dostupni



literaturni podaci o celulaznoj proizvodnji iz *Paenibacillus* spp. ukazuju na prisustvo endoglukanaza (de Castro et al., 2011; Emtiazi et al., 2007; Kumar et al., 2012; Pakdeedachakiat et al., 2008), ili endoglukanaza i egzoklukanaza sličnih aktivnosti (Ko et al., 2007; Raddadi et al., 2013). Ladaiera i saradnici (Ladeira et al., 2015) su zabeležili da *Bacillus* sp. SMIA-2 proizvodi oba tipa celulaza, endoglukanaze i egzoglukanaze sa većom aktivnošću (0,29 U/mL vs. 0,83 U/mL). Mehanizmi kojima različite vrste celulaza nadmašuju jedna drugu po svojoj aktivnosti su kompleksni i nisu u potpunosti razjašnjeni, a publikovani radovi na temu su često u suprotnosti (Kostylev & Wilson, 2012).

Tokom rasta na ječmenim mekinjama uz proizvodnju celulaza, soj CKS1 simultano proizvodi i amilaze sa aktivnošću 1,332 U/mL (aktivnost amilaza je merena samo u jednom uzorku odabranom iz numeričke optimizacije – odeljak 6.4.1.3.). Veća vrednost amilazne aktivnosti u poređenju sa celulaznom može biti posledica različite potrošnje supstrata. Kada su mikroorganizmu dostupna dva supstrata, kao izvor ugljenika i energije, prvo se troši onaj supstrat koji podržava bržu stopu rasta (Kompala et al., 1986). S obzirom da se ječmene mekinje sastoje od celuloze i skroba, soj CKS1 verovatno prvo koristi skrob, a nakon toga sintetiše enzime neophodne za korišćenje drugog supstrata celuloze.

Kvašćev ekstrakt predstavlja drugu komponentu sa pozitivnim uticajem na proizvodnju endoglukanaza i egzoglukanaza. Generalno, kvašćev ekstrakt je glavni hranljivi suplement, koji služi kao bogat izvor aminokiselina, vitamina, azota i ugljenika za bakterijski rast i proizvodnju enzima. CMC-azna i Avicelazna aktivnost, pojedinačno su bile u porastu u uslovima povećane koncentracije ječmenih mekinja i niže koncentracije kvašćevog ekstrakta (Slika 6.21. a-b). Pri optimalnim uslovima, koncentraciji kvašćevog ekstrakta od 2,0 g/L i koncentraciji ječmenih mekinja od 4%, *P.chitinolyticus* CKS1 postiže maksimum proizvodnje endoglukanaza i egzoglukanaza (Slika 6.21. a-b).

#### 6.4.1.3. Validacija modela

Validacija modela je izvedena za jednu tačku koja je izabrana iz numeričke optimizacije koji je ponudio sam model. Eksperiment je urađen za dve vrednosti radne

zapremine 30 mL i 100 mL radne zapremine u erlenmajeru od 300 mL i erlenmajeru tipa “leteći tanjir” zapremine 1000 mL (tabela 6.5.).

Tabela 6.5. Rešenja numeričke optimizacije modela proizvodnje endoglukanaza i egzoglukanaza u podlozi sa ječmenim mekinjama

Radna zapremina, mL	Ječmene mekinje, %	Kvašćev ekstrakt, g/L	CMC-azna aktivnost, U/mL		Avicelazna aktivnost, U/mL	
			Predviđeno	Validirano	Predviđeno	Validirano
30	4	2	0,405	0,413	0,433	0,438
100	4	2	0,405	0,447	0,433	0,457

Predviđena vrednost izlaza sistema CMC-azne aktivnosti 0,405 U/mL, 95% interval predviđanja (PI) 0,350-0,460 U/mL i Avicelazne aktivnosti 0,433 U/mL, 95% interval predviđanja (PI) 0,400-0,470 U/mL. Validirana odnosno eksperimentalno određena vrednost izlaza sistema, pod optimalnim uslovima, se uklapa u 95% interval predviđanja PI i iznosi za CMC-aze  $0,413 \pm 0,011$  U/mL za radnu zapreminu od 30 mL i  $0,447 \pm 0,012$  U/mL za radnu zapreminu od 100 mL što je veoma blisko predviđenoj vrednosti. Validirana vrednost izlaza sistema, pod optimalnim uslovima odnosno Avicelazna aktivnost, se uklapa u 95% interval predviđanja PI i iznosi  $0,438 \pm 0,012$  U/mL za radnu zapreminu od 30 mL i  $0,457 \pm 0,013$  U/mL za radnu zapreminu od 100 mL što je veoma blisko predviđenoj vrednosti.

Na osnovu dobijenog rezultata, predviđenog i validiranog odziva sistema, zaključuje se da procenjena funkcija može predstavljati eksperimentalni model i da željeni uslovi pokazuju da je model pouzdan.

#### ***6.4.2. Optimizacija procesa proizvodnje $\beta$ -amilaza na otpadnoj vodi iz industrije prerade kartonske ambalaže***

##### *6.4.2.1. Ocena značajnosti modela*

Na osnovu zadatih graničnih vrednosti četiri procesne promenljive (tabela 5.4., odeljak 5.6.1.2.) program je zadao 30 eksperimentalnih uslova prikazanih u tabeli

6.6. Primenom ovih eksperimentalnih uslova, izvršeno je merenje aktivnosti  $\beta$ -amilaze, što je takođe prikazano u tabeli 6.6.

Tabela 6.6. Definisane vrednosti zavisno promenljivih (A, B, C i D) i eksperimentalne vrednosti aktivnosti  $\beta$ -amilaza (odziv sistema, Y)

Eksperiment	procesne promenljive				Odziv sistema
	A (h)	B (%)	C (g/L)	D(g/L)	Y (U/mL)
1	60	5	5	5	0,231
2	60	5	5	2	0,281
3	32	3	5	2	0,111
4	60	3	5	5	0,223
5	60	5	2	2	0,205
6	60	5	2	5	0,177
7	46	4	3,5	3,5	0,226
8	32	3	5	5	0,172
9	60	3	2	2	0,246
10	32	3	2	2	0,182
11	32	5	2	2	0,156
12	46	4	3,5	3,5	0,218
13	60	3	5	2	0,141
14	32	3	2	5	0,265
15	46	4	3,5	3,5	0,231
16	32	5	5	5	0,203
17	46	4	3,5	3,5	0,226
18	32	5	5	2	0,235
19	60	3	2	5	0,322
20	32	5	2	5	0,106
21	46	4	3,5	6,5	0,134
22	46	4	6,5	3,5	0,119
23	46	4	3,5	0,5	0,093
24	46	2	3,5	3,5	0,186
25	74	4	3,5	3,5	0,270
26	46	6	3,5	3,5	0,149
27	46	4	3,5	3,5	0,187
28	46	4	3,5	3,5	0,175
29	18	4	3,5	3,5	0,168
30	46	4	0,5	3,5	0,146

A: vreme inkubacije; B: koncentracija inokuluma; C: koncentracija kazein hidrolizata; D: koncentracija kvašćevog ekstrakta; Y: aktivnost  $\beta$ -amilaza.

Na osnovu analize spovedene programom *Design Expert* 8.0 izvedena je jednačina (6.3.), polinomalna funkcija drugog reda za dati model:

$$Y = 0.012 + 2.064 \cdot 10^{-3}A - 0.012B - 0.062C + 8.928 \cdot 10^{-3}D - 2.738 \cdot 10^{-3}AC + 0.027BC - 7.22 \cdot 10^{-4}BD + 4.974 \cdot 10^{-1}A^2 - 3.13 \cdot 10^{-3}B^2 - 5.278 \cdot 10^{-3}C^2 - 7.389 \cdot 10^{-3}D^2 \quad (6.3.)$$

gde je Y odziv sistema (aktivnost  $\beta$ -amilaza), A (vreme inkubacije), B (koncentracija inokuluma), C (koncentracija kazein hidrolizata) i D (koncentracija kvašćevog ekstrakta) su procesne promenjlive.

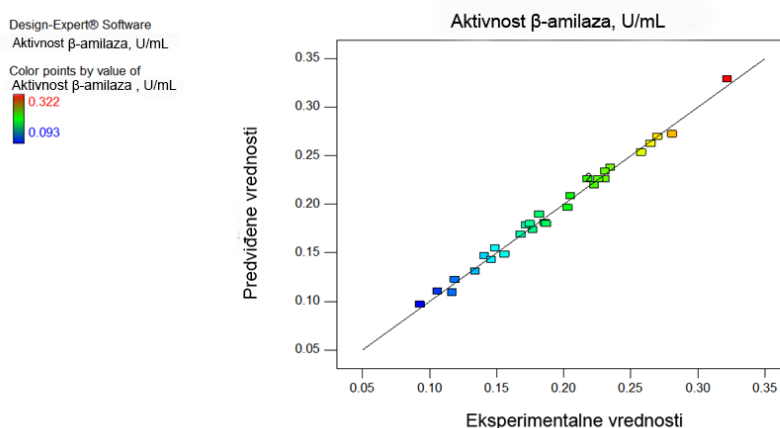
Za ocenu značajnosti modela i uticaja ispitivanih parametara, kao i njihovih međusobnih interakcija korišćena je analiza varijanse (ANOVA), a rezultati su prikazani u tabeli 6.7.

Table 6.7. Analiza varijansi (ANOVA) za dati kvadratni model

	F - vrednost	p- vrednost Prob >F
Model	101,67	< 0,0001 <sup>a</sup>
A	279,88	< 0,0001 <sup>a</sup>
B	17,37	0,0009 <sup>a</sup>
C	9,60	0,0079 <sup>a</sup>
D	37,70	< 0,0001 <sup>a</sup>
AB	-	0,9460 <sup>b</sup>
AC	10,07	0,0068 <sup>a</sup>
AD	0,69	0,4216 <sup>b</sup>
BC	530,93	< 0,0001 <sup>a</sup>
BD	247,41	< 0,0001 <sup>a</sup>
CD	0,80	0,3850 <sup>b</sup>
A <sup>2</sup>	49,64	< 0,0001 <sup>a</sup>
B <sup>2</sup>	5,10	0,0404 <sup>a</sup>
C <sup>2</sup>	73,63	< 0,0001 <sup>a</sup>
D <sup>2</sup>	144,32	< 0,0001 <sup>a</sup>
Nedostatak fitovanja	1,45	0,3836 <sup>b</sup>
R <sup>2</sup>	0,9903	
Podršeni R <sup>2</sup>	0,9805	
Predviđeni R <sup>2</sup>	0,9458	
C.V. %	3,76	
Adekvatna preciznost	43,846	
<sup>a</sup> Značajni koeficijenti (P < 0,05)		
<sup>b</sup> Nisu značajni koeficijenti		

Značajni faktori ( $p$ -vrednost  $< 0,05$ ) koji utiču na odziv sistema su A, B, C, D, kvadratni koeficijenti A, B, C i D kao i interakcije AC, BC i BD.

Vrednosti koeficijenta  $R^2(0,9903)$  je bliska 1 za dati model što je veoma visoka vrednost i ukazuje da se većina podataka uklapa u regresioni model, odnosno da postoji dobra korelacija između predviđenih i eksperimentalno dobijenih vrednosti rezultata, njihovo dobro uklapanje sa niskom disperzijom (Slika 6.22.) (Nair & Ahammed, 2013; Ranic et al., 2014).



Slika 6.22. Slaganje eksperimentalno dobijenih i predviđenih vrednosti odziva u eksperimentalnom dizajnu

Vrednost  $p < 0,0001$  znači da je model u celini značajan. Neznačajna vrednost  $F$ -vrednost nedostatka fitovanja (1,45), u poređenju sa čistom greškom, ukazuje da je model dobro opisan predviđenom jednačinom. Vrednost adekvatne preciznosti 43,846 je veća od 4 što ukazuje da je signal adekvatan. Koeficijent varijacije C.V. definiše reproduktivnost modela, i ako C.V. modela nije veći od 10% model se može smatrati reproduktivnim. Vrednost C.V. 3,76 sugeriše da je model pouzdan i reproduktivan (Adinarayana & Ellaiah, 2002; Nair & Ahammed, 2013).

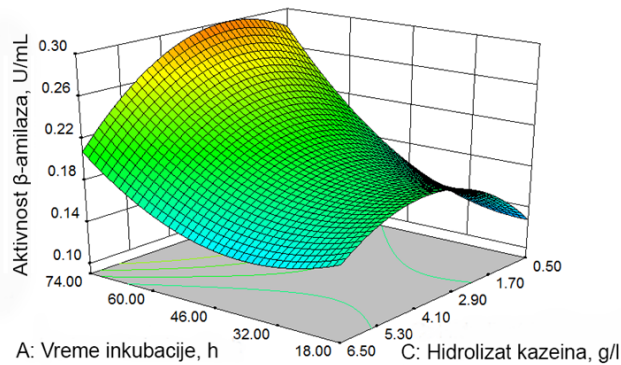
#### 6.4.2.2. Uticaj procesnih promenljivih na proizvodnju $\beta$ -amilaza

Regresionom analizom je utvrđeno da je uticaj koncentracije kazein hidrolizata (C) i koncentracije kvašćevog ekstrakta (D) na proizvodnju  $\beta$ -amilaza statistički značajno ( $p < 0,05$ ) ali da njihove interakcije CD nisu statistički značajne (tabela 6.7.).

Slično ponašanje se uočava kod vremena inkubacije (A) i koncentracije inokuluma (B) i kod njihovih interakcija. Interakcije AC, BC i BD su statistički značajne kao i svikvadratni članovi  $A^2$ ,  $B^2$ ,  $C^2$  i  $D^2$ .

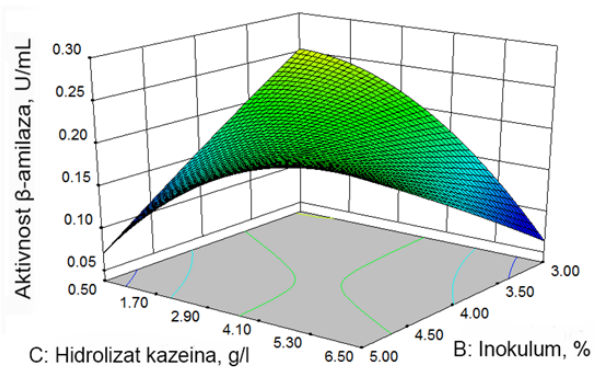
Vreme inkubacije soja CKS1, koje je statistički najznačajnije, je varirano od 18-74 h (Tabela 6.26.) pri čemu su eksperimentalno dobijene vrednosti aktivnosti  $\beta$ -amilazai u opsegu 0,093-0,322 U/mL (Tabela 6.6).Maksimalna vrednost aktivnosti  $\beta$ -amilaze od 0,333 U/mL, dobijena pod optimalnim uslovima (vremenu inkubacije od 62h), bila je veoma bliska sa vrednošću predviđenom modelom. Na slici 6.23 a grafički su prikazani međusobni uticaji ispitivanih parametara na aktivnost  $\beta$ -amilaza.

Design-Expert® Software  
 Factor Coding: Actual  
 Aktivnost  $\beta$ -amilaza, U/mL  
 0.32  
 0.09  
 X1 = A: Vreme inkubacije, h  
 X2 = C: Hidrolizat kazeina, g/l  
 Actual Factors  
 B: Inokulum, % = 4.00  
 D: Kvašėev ekstrakt, g/l = 3.50

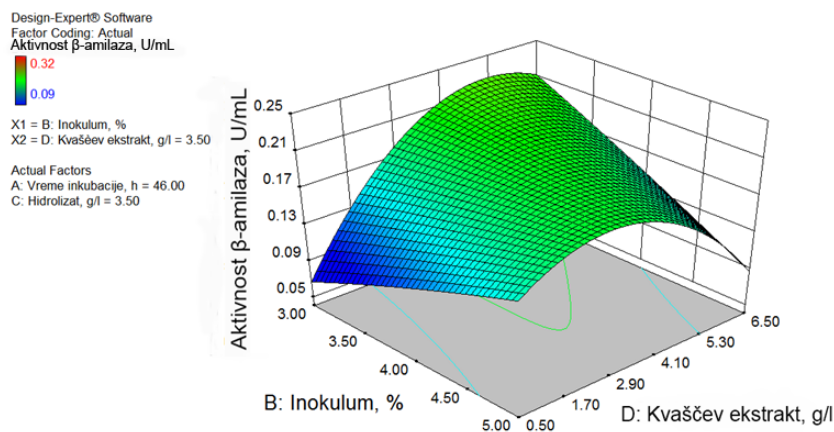


a)

Design-Expert® Software  
 Factor Coding: Actual  
 Aktivnost  $\beta$ -amilaza U/mL  
 0.32  
 0.09  
 X1 = B: Inokulum, %  
 X2 = C: Hidrolizat, g/l  
 Actual Factors  
 A: Vreme inkubacije, h = 46.00  
 D: Kvašėev ekstrakt, g/l = 3.50



b)



c)

Slika 6.23.3D grafik međusobnih uticaja: a) vremena inkubacije (A) i koncentracije kazein hidrolizata (C); b) vremena inkubacije (A) i koncentracije inokuluma (B) i c) koncentracije inokuluma (B) i koncentracije kvašičevog ekstrakta (D) na proizvodnju  $\beta$ -amilaza

Opadanje enzimske aktivnosti nakon optimalnog vremena inkubacije od 62 h se može objasniti denaturacijom ili deaktivacijom amilaza usled interakcije sa drugim komponentama u reakcionoj smeši (Gangadharan et al., 2008).

Generalno, optimalno vreme inkubacije zavisi od karakteristika samog mikroorganizma i od njegove brzine rasta (Gangadharan et al., 2008). Tokom svog rasta na pšeničnim mekinjama (fermentacija na čvrstoj podlozi) *P. amylolyticus* proizvodi  $\alpha$ -amilaze sa maksimalnom aktivnošću od 80 U/g/min nakon 72 h inkubacije (Hameed et al., 2012). Nešto kraće vreme inkubacije od 62 h je potrebno *Streptomyces erumpens* MTCC 7317 da fermentiše kasava vlakno i proizvede amilaze maksimalne aktivnosti 3457,67 U/g (Shaktimay et al., 2010). Fermentacijom agro-industrijskih čvrstih otpadaka, *Bacillus megaterium* B69 proizvodi maksimum amilaza (1034 U/g) za 84h fermentacije (Saxena & Singh, 2014). 42 h inkubacije su potrebna da *Bacillus amyloliquefaciens* proizvede maksimum amilaza (965,9 U/mL) tokom fermentacije tečnepodloge koja sadrži pšenične mekinje i pogaču ulja kikirikija (Gangadharan et al., 2008). Suprotno od ovih rezultata, najduže zabeleženo vreme inkubacije za proizvodnju

amilaza iznosi 180 h kod *Streptomyces rimosus* tokom fermentacije otpadaka slatkog krompira (Yang & Wang, 1999).

Dostupni literaturni podaci o proizvodnji amilaza na otpadnoj vodi ili na drugim otpadnim materijalima koje proizvodi *Paenibacillus* spp. su veoma ograničeni i rezultati se veoma teško mogu porediti jedni sa drugima zbog različitih uslova gajenja različitih mikroorganizama (Gangadharan et al., 2008; Saxena & Singh, 2014; Shaktimay et al., 2010), različitih supstrata ili otpadnih materijala (Hernández et al., 2006; Yang & Wang, 1999) i različitih procedura i jedinica izražavanja enzimske aktivnosti (Cotârleț, 2013; Tanyildizi et al., 2005). Ipak, treba napomenuti da ostale studije beleže tipično više vrednosti enzimske aktivnosti u poređenju sa ovom dobijenom iz soja CKS1. Dok relativno niska vrednost amilazne aktivnosti može biti u izvesnoj meri karakteristika *P.chitinolyticus* vrste, koji je prikazana kao neamilolitička vrsta u Berdžijevom priručniku (De Vos et al., 2009), treba imati na umu da je koncentracija otpadnog supstrata korišćenog u ovom eksperimentu mnogo niža nego kod drugih otpadnih sirovina koji se obično koriste za proizvodnju amilaza.

Pored vremena inkubacije, koncentracija kvašćevog ekstrakta ima jak uticaj na proizvodnju  $\beta$ -amilaza. U ovom eksperimentu koncentracija kvašćevog ekstrakta je varirala od 0,5 do 6,5 g/L i maksimum amilazne aktivnosti, pri optimalnim uslovima se dostiže sa 3,98 g/L kvašćevog ekstrakta. Generalno, kvašćev ekstrakt je glavni hranljivi suplement koji služi kao bogat izvor aminokiselina, vitamina, azota i ugljenika za bakterijski rast i proizvodnju enzima. Koncentracija od 5,0 g/L kvašćevog ekstrakta je optimalna za maksimalni prinos amilaza pomoću *Streptomyces* sp. (Cotârleț, 2013). Maksimum amilazne aktivnosti se postiže plesan *Aspergillus oryzae* uz dodatak 4,5 kvašćevog ekstrakta (Gigras et al., 2002), dok je 20,0 g/L kvašćevog ekstrakta neophodno za maksimum amilazne proizvodnje pomoću bakterije *Bacillus circulans* GRS 313 (Dey et al., 2001). Treba napomenuti, da relativno niska koncentracija kvašćevog ekstrakta (0,1-1,0 g/L) dovodi do maksimalne proizvodnje amilaza kod visoko potentnog *Bacillus* sp. producenta amilaza (Tanyildizi et al., 2005).

Hidrolizat kazeina je odličan izvor slobodnih amino kiselina i kratkih peptidnih lanaca koji su neophodni za rast mikroorganizma. Takođe, on sadrži tragove minerala i jona koji mogu poboljšati sekreciju enzima (Kammoun et al., 2008). Dok se proizvodnja amilaza kod nekih fungálnih sojeva može povećati dodatkom izvora azota



kao što su urea, hidrolizat kazeinske kiseline, hidrolizat soje i  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Kammoun et al., 2008; Nwe & Stevens, 2004), kod soja CKS1 hidrolizata kazeina služi kao izvor azota. U ovom eksperimentu, pod optimalnim uslovima, maksimum proizvodnje  $\beta$ -amilaza se postiže koristeći 2,02 g/L hidrolizata kazeina. Sa slike 6.23. b se uočava da se aktivnost  $\beta$ -amilaza povećava se povećanjem koncentracije kazein hidrolizata i koncentracije inokuluma.

Koncentracija inokuluma je sledeći faktor koji značajno utiče na amilaznu aktivnost (Slika 6.23 c.). Dobro je ustanovljena činjenica da na sekreciju mikrobnih amilaza suštinski utiču ne samo komponente podloge, uključujući izvor ugljenika i azota, već i uslovi gajenja mikroorganizma uključujući pH, temperaturu, koncentraciju rastvorenog kiseonika i inokuluma. Značaj koncentracije inokuluma kod mikrobioloških procesa fermentacije je opšte prihvaćena pojava (Reddy et al., 2008). Kao što je prikazano na slici 6.23c, proizvodnja  $\beta$ -amilaza se povećava kako se koncentracija inokuluma smanjuje od 5 do 3% sve dok se ne dostigne određena koncentracija inokuluma (2,4%) pri kojoj je enzimska proizvodnja maksimalna. Ovo ukazuje da koncentracija inokuluma ne vrši neograničen uticaj na proces fermentacije. Postoji optimalna vrednost koncentracije inokuluma i ona zavisi od mikrobne vrste i fermentacionog sistema koji se koristi (Reddy et al., 2008). Koncentracija inokuluma je posebno bitan faktor kod sporulišućih bakterija (Mnif et al., 2013) kao što je *Paenibacillus* sp. i stoga može da utiče na prinos  $\beta$ -amilaza. Optimizacija koncentracije inokuluma je važna, zato što visoka koncentracija inokuluma može da smanji proizvodnju enzima zbog velike konkurencije za raspoloživim hranljivim materijama. Na sličan način, niska koncentracija inokuluma dovodi do smanjenja sekrecije enzima jer dolazi do opadanja broja ćelija (Reddy et al., 2008). Takođe, sa slike 6.23. c se uočava da se aktivnost  $\beta$ -amilaza povećava sa smanjenjem koncentracije inokuluma i povećanjem koncentracije kvašćevog ekstrakta.

Pod optimalnim vrednostima, koje se dobijaju iz numeričke optimizacije modela, maksimum aktivnosti  $\beta$ -amilaza iznosi 0,333 U/mL pri vremenu inkubacije od 62h, koncentraciji inokuluma 2,4%, koncentraciji kazein hidrolizata 2,02 g/L i koncentraciji kvašćevog ekstrakta 3,98 g/L.

### 6.4.2.3. Validacija modela

Validacija modela je izvedena za dve tačke koje su izabrane iz numeričke optimizacije koju je ponudio sam model. U cilju procene validnosti modela dodatni eksperiment je određen pod ovim uslovima (Tabela 6.8.).

Tabela 6.8. Rešenja numeričke optimizacije modela proizvodnje  $\beta$ -amilaza na otpadnoj vodi

Uzorak	Vreme inkubacije, h	Inokulum, %	Kazein hidrolizat, g/L	Kvaščev ekstrakt, gl	Aktivnost $\beta$ -amilaza, U/mL	
					Predviđeno	Validirano
1	62,00	2,40	2,02	3,98	0,333	0,334
2	18,00	2,14	3,05	6,50	0,263	0,261

Predviđena vrednost izlaza sistema aktivnost  $\beta$ -amilaza za tačku (uzorak) 1 iznosi 0,333 U/mL, 95% interval predviđanja (PI) 0,299-0,369 U/mL, a za tačku (uzorak) 2 iznosi 0,263 U/mL, 95% interval predviđanja (PI) 0,253-0,286 U/mL. Validirana, odnosno eksperimentalno određena vrednost izlaza sistema, pod optimalnim uslovima, se uklapa u 95% interval predviđanja PI i iznosi za uzorak 1 0,334 U/mL a za uzorak 2 0,261 U/mL što je veoma blisko predviđenim vrednostima.

Na osnovu dobijenih rezultata, predviđenog i validiranog odziva sistema, zaključuje se da procenjena funkcija može predstavljati eksperimentalni model i da je model pouzdan.

### 6.4.3. Optimizacija procesa proizvodnje $\beta$ -amilaza na melasi i repinom rezancu

#### 6.4.3.1. Ocena značajnosti modela

Na osnovu zadatih graničnih vrednostiza ispitivanje tri procesne promenljive (koncentracije inokuluma (A), vremena inkubacije (B) i koncentracije repinog rezanca SBP (C)), a u cilju ispitivanja uticaja na proizvodnju  $\beta$ -amilaze (tabela 5.5. odeljak 5.6.1.3.) koristeći RSM metodu i CCD dizajn definisano je 26 eksperimenata (tabela 6.9.). Za svaki od definisanih eksperimenata, izvršeno je merenje aktivnosti  $\beta$ -amilaza, što je takođe prikazano u tabeli 6.9.

Tabela 6.9. Definisane vrednosti procesnih promenljivih (A, B i C) i eksperimentalne vrednosti aktivnosti  $\beta$ -amilaza (odziv sistema, Y)

Eksperiment	Procesne promenljive			Odziv sistema Y(U/mL)
	A (%)	B (h)	C (%)	
1	4	24	1,5	1,008
2	10	24	1,5	1,646
3	4	120	1,5	1,836
4	10	120	1,5	1,844
5	4	24	3	0,624
6	10	24	3	1,664
7	4	120	3	1,505
8	10	120	3	1,895
9	2,8	72	2,25	1,262
10	2,8	72	2,25	1,469
11	11,2	72	2,25	2,187
12	11,2	72	2,25	1,988
13	7	4,8	2,25	0,129
14	7	4,8	2,25	0,176
15	7	139,2	2,25	1,257
16	7	139,2	2,25	1,241
17	7	72	1,2	2,097
18	7	72	1,2	2,180
19	7	72	3,3	1,819
20	7	72	3,3	1,995
21	7	72	2,25	1,434
22	7	72	2,25	1,455
23	7	72	2,25	1,607
24	7	72	2,25	1,412
25	7	72	2,25	1,621
26	7	72	2,25	1,537

A: koncentracija inokuluma; B: vreme inkubacije; C: koncentracija SBP; Y: aktivnost  $\beta$ -amilaza.

Na osnovu izmerenih vrednosti ustanovljeno je da odziv sistema (proizvodnja  $\beta$ -amilaze) u funkciji tri ispitvane promenljive može opisati jednačinom polinomalne funkcije drugog reda (6.4.):

$$Y = 1.5 + 0.26A + 0.33B - 0.082C - 0.16AB + 0.098AC + 0.011 BC + 0.12A^2 - 0.40B^2 + 0.27C^2 \quad (6.4.)$$

gde je Y (aktivnost  $\beta$ -amilaza) odziv sistema a A (koncentracija inokuluma), B (vreme inkubacije) i C (koncentracija repinog rezanca) su procesne promenljive.

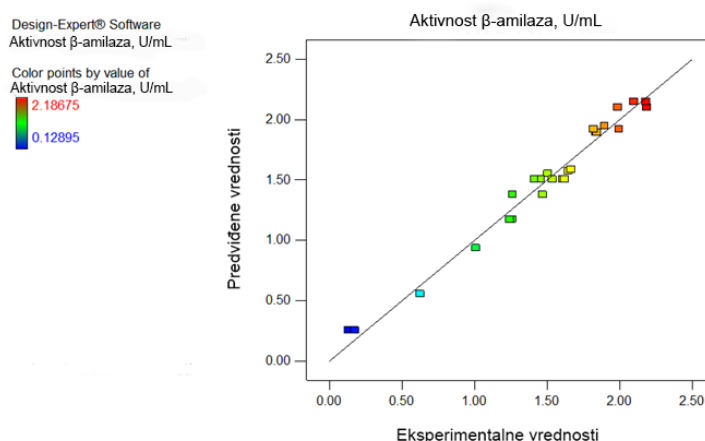
Za ocenu značajnosti modela u celini alii uticaj ispitivanih parametara i njihovih međusobnih interakcija na odziv sistema korišćena je analiza varijanse (ANOVA, tabela 6.6).

Tabela 6.10. Analiza varijansi (ANOVA) za kvadratni model

	F – vrednost	p- vrednost Prob >f
Model	74,74	< 0,0001 <sup>a</sup>
A	101,68	< 0,0001 <sup>a</sup>
B	164,34	< 0,0001 <sup>a</sup>
C	10,16	0,0057 <sup>a</sup>
AB	19,61	0,0004 <sup>a</sup>
AC	7,37	0,0153 <sup>a</sup>
BC	0,087	0,7719 <sup>b</sup>
A <sup>2</sup>	18,39	0,0006 <sup>a</sup>
B <sup>2</sup>	206,72	<0,0001 <sup>a</sup>
C <sup>2</sup>	93,81	< 0,0001 <sup>a</sup>
Nedostatak fitovanja	1,39	0,2999 <sup>b</sup>
R <sup>2</sup>	0,9768	
Podešeni R <sup>2</sup>	0,9637	
Predviđeni R <sup>2</sup>	0,9278	
C.V. %	6,83	
Adekvatna preciznost	29,959	
<sup>a</sup> Značajni koeficijent (P < 0,05)		
<sup>b</sup> Neznačajni koeficijent		

Značajni faktori (p-vrednost Prob>F<0,05) koji utiču na odziv sistema su A, B, C, kvadratni koeficijenti A, B, C kao i interakcije AB i AC. Vrednost p<0,0001 znači da je model u celini značajan (tabela 6.10.).

Vrednosti koeficijenta R<sup>2</sup> (0,9768) je bliska 1 za dati model što je veoma visoka vrednost i ukazuje na dobru korelaciju između izmerenih podataka i onih predviđenih regresionim modelom(Slika 6.24.). Neznačajna vrednost, F-vrednost nedostatka fitovanja (1.39), u poređenju sa čistom greškom, ukazuje da model dobro opisuje realne podatke. Vrednost adekvatne preciznosti od 29,959 je veća od 4, što, opet, govori u prilog adekvatnosti primenjene matematičke jednačine kao modela ispitivanog sistema. Koeficijent varijacije C.V. definiše reproduktivnost modela, i ako C.V. modela nije veći od 10% model se može smatrati reproduktivnim. Uzimajući u obzir i ovaj parametar - vrednost C.V. od 6,83, potvrđuje pouzdanost matematičkog modela (Adinarayana & Ellaiah, 2002).



Slika 6.24. Slaganje eksperimentalno dobijenih i predviđenih vrednosti odziva u eksperimentalnom dizajnu

#### 6.4.3.2. Uticaj procesnih promenljivih na proizvodnju $\beta$ -amilaza

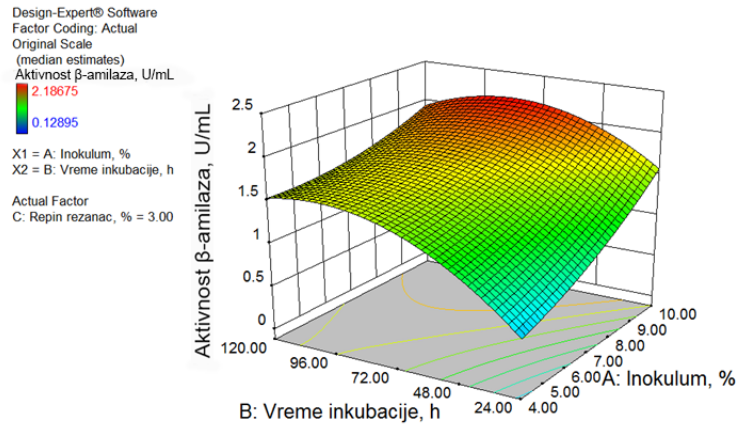
Prisustvo ugljenika i azota u podlozi je neophodno za bakterijski rast i sintezu enzima. Uzimajući u obzir da su preliminarana ispitivanja (poglavlje 6.3.2.) pokazala da je podloga sa melasom i izluženim repinim rezancem tretiranim NaOH najbolji susprat za proizvodnju amilaza, izvršena je optimizacija ove podloge varirajući tri procesne promenljive. Ispitan je uticaj koncentracije inokuluma (A), vremena inkubacije (B) i koncentracije repinog rezanca SBP (C) na proizvodnju  $\beta$ -amilaza pomoću soja *P.chitinolyticus* CKS1.

Regresionom analizom je utvrđeno da su koncentracija inokuluma (A), vreme inkubacije (B) i koncentracija izluženog repinog rezanca (C) statistički značajni parametri ( $p < 0,05$ ) kao i interakcije AB i AC dok interakcija BC nije statistički značajna. Kvadratni članovi,  $A^2$ ,  $B^2$  i  $C^2$  su statistički značajni (Tabela 6.10.).

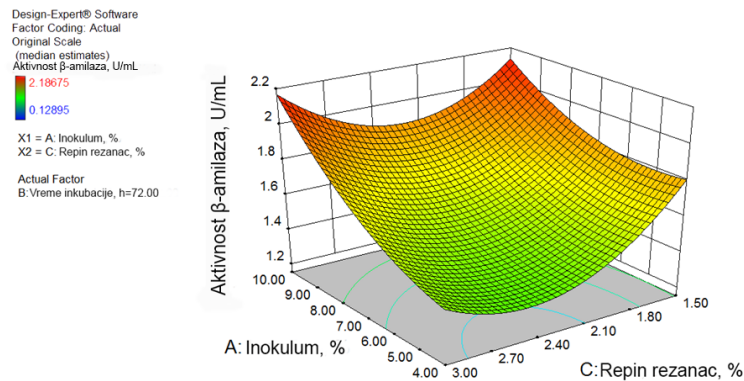
Niža p-vrednost (tabela 6.10.) ukazuje na veću značajnost datih koeficijenata (Tanyildizi et al., 2005), te rezultati ukazuju da su promenljive sa najvećim uticajem A, B i  $B^2$  i  $C^2$  (Tabela 8.6).

Na osnovu regresione analize utvrđeno je da vreme inkubacije ima najveći uticaj na proizvodnju  $\beta$ -amilaza. Primećeno je da proizvodnja  $\beta$ -amilaza počinje već nakon 4.8 h inkubacije (0,129 – 0,176 U/mL) i enzim se proizvodi sve do 139,2 h

vremena inkubacije (Tabela 6.9). Nakon 72 h proizvodnja  $\beta$ -amilaza se smanjuje (Tabela 6.9). Pri optimalnim uslovima, maksimalna aktivnost  $\beta$ -amilaza (2,189 U/mL) se postiže pri vremenu inkubacije od 83.07 h (Slika 6,25 a). Smanjenje prinosa enzima nakon optimalnog perioda inkubacije može biti posledica denaturacije ili dekompozicije amilaza usled interakcije sa drugim komponentama u tečnoj podlozi (Gangadharan et al., 2008).



a)



b)

Slika 6.25.3D grafik međusobnih uticaja: a) koncentracije inokulumai vremena inkubacije (AB) i b) koncentracije inokuluma i repinog rezanca (AC) na proizvodnju  $\beta$ -amilaza

Optimizacija parametara fermentacije igra važnu ulogu u proizvodnji enzima. Za postizanje maksimalne enzimске aktivnosti, vreme inkubacije datog mikroorganizma kao i odgovarajući izvor ugljenika predstavljaju najvažniji faktor (Pervez et al., 2014). Literaturni podaci ukazuju na to da su različitim mikroorganizmima potrebna različita vremena inkubacije za postizanje maksimuma proizvodnje amilaza (Gangadharan et al., 2008; Saxena & Singh, 2014; Yang & Wang, 1999) i ovo zavisi od karakteristika konkretnog soja i njegove brzine rasta (Gangadharan et al., 2008). Amilazama fungalnog porekla je potrebno 3-7 dana inkubacije za maksimalnu proizvodnju, ali postoje i slučajevi produžene sekrecije enzima čak do 15 dana. Produženo vreme inkubacije je jedna od mana korišćenja filamentoznih plesni na industrijskom nivou jer dolazi do povećanja troškova proizvodnje (Pervez et al., 2014). U našim eksperimentima dobijena je maksimalna proizvodnja enzima nakon 72h inkubacije, što se slaže sa proizvodnjom amilaza pomoću *Paenibacillus amylolyticus* (Hameed et al., 2012). Kraće vreme inkubacije je zabeleženo kod *Bacillus amyloliquefaciens* (42h) (Gangadharan et al., 2008) i *Streptomyces erumpens* MTCC 7317 (60h) (Shaktimay et al., 2010) dok *Streptomyces rimosus* postiže maksimum proizvodnje amilaza nakon 180h inkubacije (Yang & Wang, 1999).

Na proizvodnju  $\beta$ -amilaza značajno utiče i koncentracija inokuluma. Aktivnost enzima se povećava sa povećanjem koncentracije inokuluma, dok se ne postigne maksimum (slika 6.25.). Takođe, sa slike 6.25 a se može uočiti da se aktivnost  $\beta$ -amilaza povećava sa povećanjem vremena inkubacije do postizanja optimalnog vremena inkubacije i povećanjem koncentracije inokuluma. Blago zakrivljena kriva pokazuje da se primetne interakcije dešavaju između dva posmatrana parametra (slika 6.25.) (Reddy et al., 2008). Niska koncentracija inokuluma vodi do nedovoljnog broja ćelija, što za posledicu ima smanjenje enzimске proizvodnje dok visoka koncentracija inokuluma vodi do smanjenja količine rastvorenog kiseonika i povećava konkurenciju prema hranljivim materijama što, opet, vodi do smanjene proizvodnje enzima (Suganthi et al., 2013).

Koncentracija izluženog repinog rezanca (SBP) je faktor sa najmanjim, ali statistički značajnim uticajem na enzimsku aktivnost. Koncentracija repinog rezanca je varirana u opsegu od 1,20 do 3,30 % (Tabela 6.9.). Pri optimalnim uslovima,

maksimum produkcije  $\beta$ -amilaze se postiže pri koncentraciji repinog rezanca od 3%. Negativan uticaj koncentracije repinog rezanca na proizvodnju enzima se javlja pri koncentracijama repinog rezanca većim od 3% (Slika 6.25.b). Sa povećanjem koncentracije repinog rezanca i inokuluma povećava se i aktivnost  $\beta$ -amilaza (Slika 6.25.b).

Pod optimalnim vrednostima, koje se dobijaju iz numeričke optimizacije modela, maksimum proizvodnje  $\beta$ -amilaze iznosi 2.189 U/mL pri vremenu inkubacije od 83.07h, koncentraciji inokuluma 10% i koncentraciji repinog rezanca 3%.

Osim rada (Hameed et al., 2012) nema dostupnih literaturnih podataka o proizvodnji amilaza na otpadnim suspratima pomoću *Paenibacillus* spp. Usled različitih uslova gajenja mikroorganizma i različitih jedinica izražavanja enzimske aktivnosti, ponekad je teško porediti dobijene rezultate sa literaturnim podacima (Hameed et al., 2012; Hensley et al., 1980; Li & Yu, 2011). Druge studije pokazuju veću enzimsku aktivnost od aktivnosti dobijene u ovom eksperimentu. Na primer, *P. amylolyticus* proizvodi amilaze sa maksimalnom aktivnošću od 80U/g/min nakon 72 h fermentacije na čvrstoj podlozi tokom svog rasta na pšeničnim mekinjama (Hameed et al., 2012). Aktivnost  $\beta$ -amilaz između 2,80 – 6,04 U/mL poseduje enzim koji proizvodi *Bacillus polymyxa* NRRL B-367 tokom svog rasta pri različitim koncentracijama kukuruznog skroba u tečnoj podlozi (Hensley et al., 1980). Viša aktivnost  $\beta$ -amilaza, koja dostiže 77,8 U/mL pomoću halofilnog bakterijskog izolata *Halobacillus* sp. LY9 je zabeležena u radu Li i saradnika (Li & Yu, 2011). Relativno niska vrednost aktivnosti  $\beta$ -amilaze koja iznosi 2,237U/mL, dobijena u ovom eksperimentu, može biti karakteristika vrste *P. chitinolyticus*, iako je ista opisana kao neamilolitička u Berdžijevom priručniku (De Vos et al., 2009)

#### 6.4.3.3. Validacija modela

Validacija modela je izvedena za jednu tačku koja je izabrana iz numeričke optimizacije koji je ponudio sam model. U cilju procene validnosti modela dodatni eksperiment je određen pod ovim optimalnim uslovima (vreme inkubacije 83.07h, koncentracija inokuluma 10% i koncentracija repinog rezanca 3%). Predviđena vrednost izlaza sistema (aktivnost  $\beta$ -amilaza) iznosi 2,189 U/mL, 95% interval



predviđanja (PI) 1,94-2,44. Validirana odnosno eksperimentalno određena vrednost izlaza sistema, pod optimalnim uslovima, se uklapa u 95% interval predviđanja PI i iznosi 2,237 U/mL što je veoma blisko predviđenoj vrednosti. Na osnovu dobijenog rezultata, predviđenog i validiranog odziva sistema, zaključuje se da procenjena funkcija može predstavljati

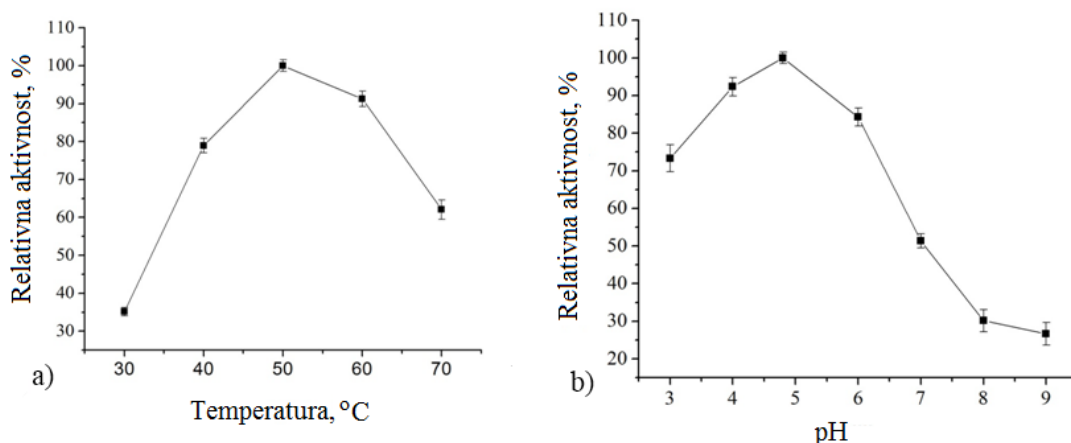
## 6.5. Karakterizacija celulaza

U okviru karakterizacije sirovih celulaza određene su optimalne vrednosti temperature i pH pri kojima je CMC-azna aktivnost najveća. Kod egzoglukanaza, koje su u prethodnom eksperimentu (poglavlje 6.2.2.) pokazale predominantnost u odnosu na endoglukanaze po pitanju aktivnosti, određene su optimalne vrednosti temperature i optimalnog pH pri kojima je aktivnost enzima najveća, a ispitan je i uticaj jona na aktivnost i termostabilnost egzoglukanaza. Celulaze su prečišćene i izolovane. Kvantifikovani su proizvodi hidrolize celuloze.

### 6.5.1. Određivanje optimalne temperature i optimalnog pH celulaza

Za određivanje optimalne temperature i optimalnog pH na CMC-aznu aktivnost korišćeni su bakterijski supernatanti čije je dobijanje opisano u poglavlju 5.4.1.1. (eksperiment 1).

Određivanje optimalne temperature je praćeno preko uticaja temperature na CMC-aznu aktivnost. Optimalna temperatura pri kojoj se postiže maksimum CMC-azne aktivnosti iznosi 50 °C pri pH 4.8 (Slika 6.26.a).



Slika 6.26. Uticaj (a) temperature i (b) pH na CMC-aznu aktivnost

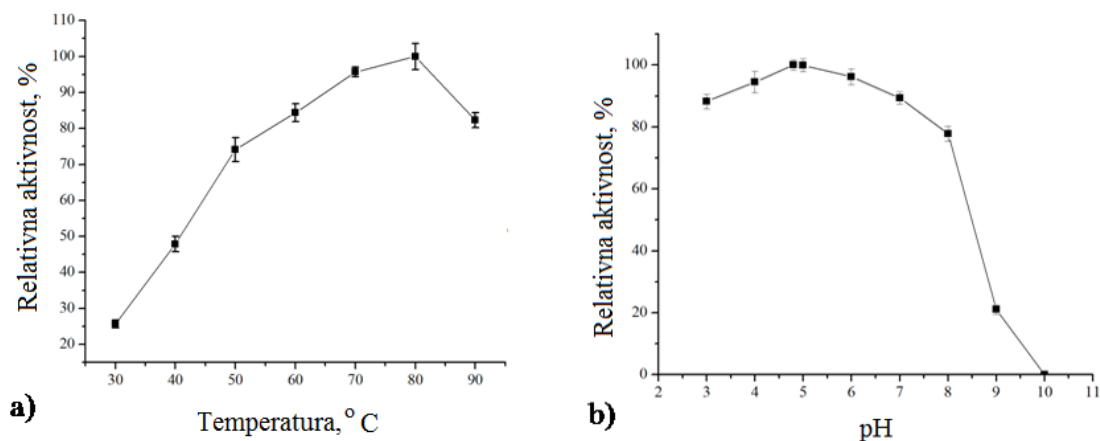
Optimalna temperatura za endoglukanaze kod drugih *Paenibacillus* spp. sojeva je slična ili malo viša od optimalne temperature zabeležene kod soja CKS1 i iznosi 50 °C za *P.terrae* ME27-1 (Liang et al., 2014), 55 °C za *P. cookii* SS-24 (Shinoda et al.,

2012), 60 °C za *Paenibacillus* sp. B39A i *P.elgii* (Lisdiyanti et al., 2012; Wang et al., 2008) i 65 °C za *P.barcinonensis* CMC-aze (Asha et al., 2012).

Optimalna pH vrednost pri kojoj se postiže maksimum CMC-azne aktivnosti kod soja CKS1 iznosi 4.8 (Slika 6.26.b). Ovaj podatak o aktivnosti endoglukanaza u kiseloj sredini, koje proizvode soj CKS1, je u suprotnosti sa većinom podataka iz literature, u kojima su endoglukanaze uglavnom aktivne u neutralnoj ili baznoj sredini (Ko et al., 2007; Liang et al., 2014; Lisdiyanti et al., 2012) iako postoji izuzetak kao što je npr. *P.polymyxa* čija endoglukanaza pokazuje optimalnu aktivnost u slabo kiselj sredini pH 5.5 (Kumar et al., 2012).

Za određivanje optimalne temperature i optimalne pH vrednosti na aktivnost egzoglukanaza korišćeni su bakterijski supernatanti čije je dobijanje opisano u poglavlju 5.4.1.1. (eksperiment 3).

Rezultati ispitivanja uticaja temperature na Avicelaznu aktivnost sirovog enzima, kojeg proizvodi *P.chitinolyticus* CKS1 tokom svog rasta na otpadnom lekovitom bilju, pokazuju da je optimalna temperatura pri kojoj se postiže maksimalna aktivnost egzoglukanaza 80 °C (Slika 6.27. a). Optimalna temperatura egzoglukanaza koje proizvodi soj CKS1 je viša od optimalne temperature endoglukanaza kod *Paenibacillus polymyxa* MTCC 10056, gajenom na kori manga kao supstratu (Kumar et al., 2012), kao i od mnogih drugih celulolitičkih *Paenibacillus* spp. uključujući *P.curdlanolyticus* B-6 sa optimalnom temperaturom između 50 i 60 °C (Pason et al., 2006), *Paenibacillus* sp. B39A i *P. elgii* sa optimalnom temperaturom od 60 °C (Lisdiyanti et al., 2012; Wang et al., 2008), *P.barcinonensis* sa optimalnom temperaturom od 65 °C (Asha et al., 2012). Većina industrijskih procesa zahteva visoke temperature i stoga je poželjno da celulaze, sa potencijalnom primenom u industrijskoj proizvodnji, imaju visoku optimalnu temperaturu kao što je slučaj sa sojem CKS1.



Slika 6.27. Uticaj a) temperature i b) pH na Avicelaznu aktivnost

U cilju određivanja optimalne pH vrednosti, ispitan je uticaj pH na aktivnost sirovih egzoglukanaza koje proizvodi *P.chitinolyticus* CKS1u pH opsegu od 3 do 11. Rezultati pokazuju da je optimalna pH vrednost za Avicelaznu aktivnost 4,8 (Slika 6.27. b), iako je enzim aktivan u širem pH opsegu (pH 3,0-7,0). Detekcija enzimske aktivnosti u širem pH opsegu sugerise na prisustvo nekoliko celulaza, u okviru enzimskog kompleksa, sa različitom tolerancijom na pH vrednosti (Raddadi et al., 2013) ilina eventualno prisustvo nekih drugih tipova hidrolaza uključujući ksilanaze ili pektinaze (Ko et al., 2007). Ovo nije prvi slučaj celulaza iz vrsti *Paenibacillus* roda koje poseduju široku toleranciju prema pH, iako se tipična aktivnost detektuje u blago kiseloj ili alkalnoj sredini u pH opsegu 4,0-9,5 (Ko et al., 2007; Pason et al., 2006). Slično soju CKS1, celulazna aktivnost *P.polymyxa* MTCC 10056 je najvećau kiseljoj sredini (pH 5.5) (Kumar et al., 2012). Optimalna pH vrednost za proizvodnju egzoglukanaza kod *P. champinasensis* BL11 je 8,5 (Ko et al., 2007), pH 8 kod endoglukanaza *P. elgii* (Lisdiyanti et al., 2012) i pH 6,0-8,5 za egzoglukanaze iz *Paenibacillus* sp. KSM-N659 (Ogawa et al., 2007). Osim toga, egzoglukanaze iz *Geobacillus stearothermophilus* postizu maksimalnu aktivnost u blago alkalnoj sredini (Makky, 2009). Zbog svoje aktivnosti u kiseljoj sredini pri pH 4,8 ovaj enzim može imati potencijalnu primenu u industriji bioetanolu (Kuhad et al., 2011), u industriji prerade papira i pulpe za enzimsko obezbojavanje pulpe (Jegannathan & Nielsen, 2013) kao i u tekstilnoj industriji za poboljšavanje mekoće i vodenog kapaciteta vlakana (Kuhad et al., 2011).

### 6.5.2. Uticaj metalnih jona i EDTA na aktivnost sirovih egzoglukanaza

Ispitan je uticaj različitih metalnih jona (10 mM) i EDTA na Avicelaznu aktivnost. Rezultati pokazuju da  $K^+$  (KCl) jon pozitivno utiče na enzimsku aktivnost i povećava aktivnost enzima skoro tri puta, dok  $Ca^{2+}$  ( $CaCl_2$ ) jon uzrokuje trostruko opadanje enzimske aktivnosti slično kao i dodatak EDTA (Tabela 6.11.). NaCl ima blagi negativni uticaj na Avicelaznu aktivnost. Rezidualne aktivnosti za  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$  i EDTA iznose 32,47%, 294,84%, 98,45% i 27,61%, pojedinačno. Prečišćene endoglukanaze iz *Paenibacillus* sp. BP-23 pokazuju blago povećanje aktivnosti (121%) prilikom dodatka 10 mM  $Ca^{2+}$  jona u reakcionu smešu (Pastor et al., 2001) dok dodatak 1mM  $Ca^{2+}$  jona pet puta povećava endoglukanaznu aktivnost kod *Paenibacillus* sp. B39(Wang et al., 2008). U većini studija  $Ca^{2+}$  jon stimulatивно deluje na aktivnost celulaza dok kod soja CKS1,  $K^+$  jon nasuprot  $Ca^{2+}$  ima pozitivan uticaj na aktivnost sirovih egzoglukanaza.

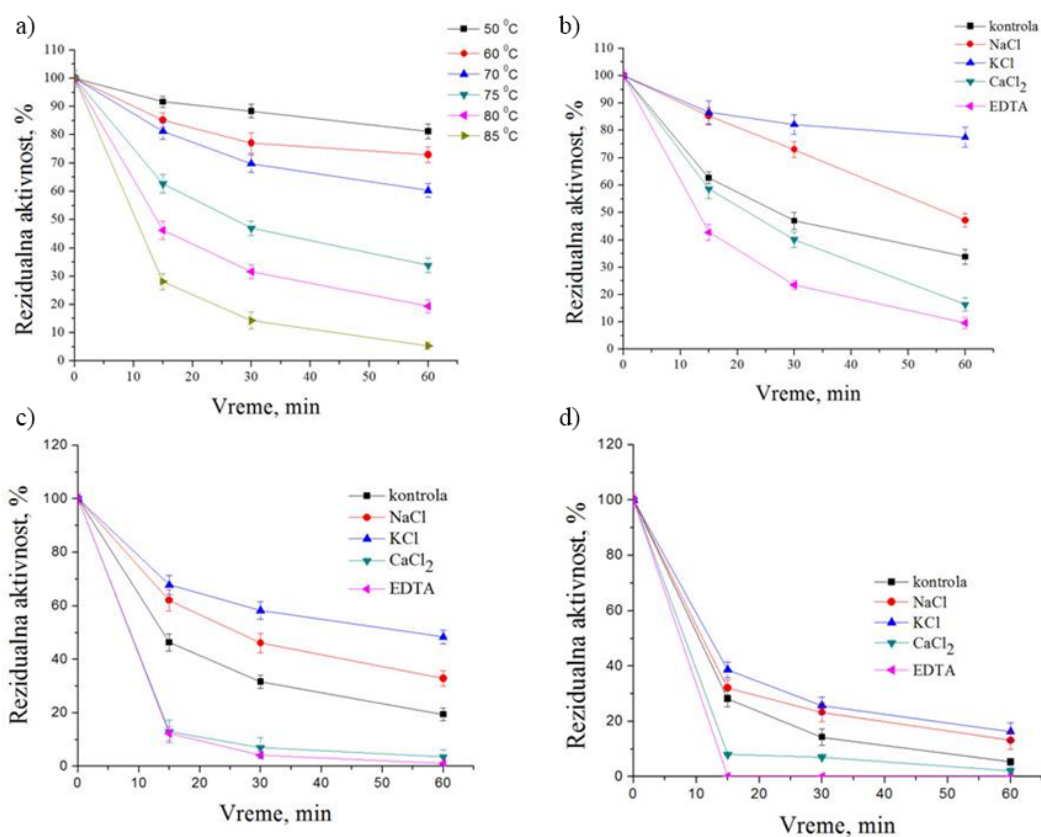
Tabela 6.11. Uticaj različitih metalnih jona i EDTA na aktivnost sirovih egzoglukanaza

Metalni joni (10mM)	Rezidualna aktivnost, %
$CaCl_2$	32,47
KCl	294,84
NaCl	98,45
Helirajući agens (10 mM)	
EDTA	24,61
Aktivnost enzima je izražena kao rezidualna aktivnost – procenat početne aktivnosti enzima koja iznosi 1,94 U/mL	

### 6.5.3. Temperaturna stabilnost i uticaj jona i EDTA na temperaturnu stabilnost

Većina industrijskih procesa se odigrava na visokim temperaturama pa je od velike važnosti da celulaze imaju dobru termostabilnost na visokim temperaturama (Kumar et al., 2012; Lynd et al., 2002; Maki et al., 2009). Temperaturna stabilnost sirovih celulaza merena preko Avicelazne aktivnosti je ispitivana u supstratu bez metalnih jona i u prisustvu jona  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  i EDTA (Slika 6.28.). Rezultati pokazuju da su u odsustvu metalnih jona egzoglukanaze stabilne na 50 °C sa rezidualnom aktivnošću od 81,23% 60 min, dok na 70 °C enzim zadržava 60,33% svoje aktivnosti

tokom 60 min. Na temperaturama preko 70 °C enzim naglo gubi svoju aktivnost (Slika 6.28.a). Dodatak KCl ima stabilizujući efekat na enzim i na 75 °C enzim zadržava 86,62%, 82,15% i 77,54 % svoje početne aktivnosti nakon 15, 30 i 60 min, pojedinačno (Slika 6.28.b), koja je primetno veća od aktivnosti kontrolnog uzorka (nakon 60 min rezidualna aktivnost iznosi 33,8%). Slično je zabeleženo i na temperaturi od 80 °C (Slika 6.28.c) kada enzim sa dodatkom KCl zadržava 48,39% svoje početne aktivnosti nakon 60 min (Slika 6.28.d). Dodatak NaCl takođe ima pozitivan uticaj na temperaturnu stabilnost egzoglukanaza i enzim zadržava 47,15, 32,88 i 13,09% svoje početne aktivnosti nakon 60 min inkubacije na 75, 80 i 85 °C, pojedinačno (Slika 6.28.b, 6.28.c, 6.28.d). Dodatak CaCl<sub>2</sub> i EDTA ima negativan uticaj na temperaturnu stabilnost enzima (Slika 6.28.b, 6.28.c i 6.28d). Temperaturno stabilne celulaze imaju širok spektar primene u prehrambenoj i industriji šećera, gde su neophodne visoke temperature za odvijanje procesa.



Slika 6.28. Temperaturna stabilnost a) i uticaj metalnih jona i EDTA na temperaturnu stabilnost egzoglukanaza koje proizvodi *P.chitinolyticus* CKS1 na različitim temperaturama: b) 75 °C, c) 80 °C i d) 85 °C. Enzim se inkubira u 0,1 M acetatnom puferu (pH 4,80) pri različitim temperaturama i pri različitim vremenima inkubacije

(15, 30 and 60 min) pre određivanje rezidualne aktivnosti. Početna aktivnost enzima se izražava kao 100%

Makky (Makky, 2009) je zabeležio da egzoglukanaze iz termofila *Geobacillus stearothermophilus* pokazuju dobru temperaturnu stabilnost, između 30-80 °C. Nasuprot rezultatima temperaturne stabilnosti za soj CKS1, Ogawa i saradnici (Ogawa et al., 2007) su zabeležili da se rezidualna aktivnost celulaza bitno ne menja do temperature od 45 °C bez prisustva CaCl<sub>2</sub> i do 55 °C u prisustvu 5 mM CaCl<sub>2</sub> kod prečišćene rekombinantne Egl-659*Paenibacillus* spp.

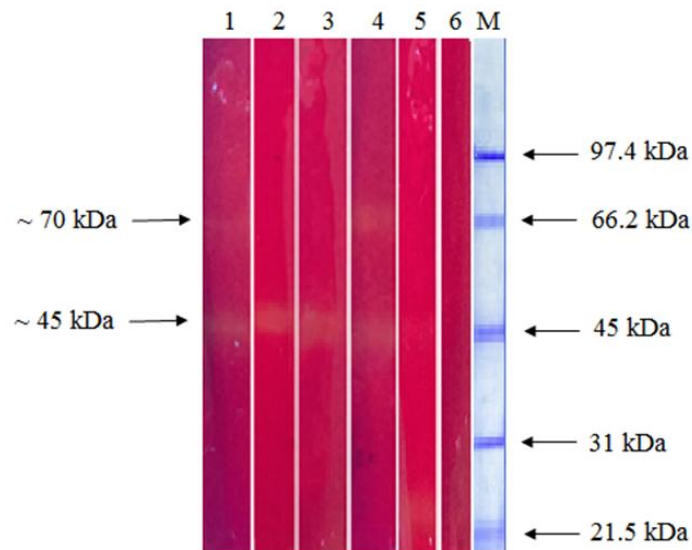
#### **6.5.4. Proizvodi hidrolize celuloze**

*P. chitinolyticus* CKS1 hidrolizuje Avicel i CMC do glukoze i oligosaharida koji su preliminarno identifikovani kao celobioza, celotrioza, celotetroza. Takođe, neki složeniji molekuli kompleksne strukture, kao što su oligosaharidni ostaci celuloze su prisutni u hidrolizatu (Prilog 3, Slika P-3.2. i Slika P-3.3.). Prisustvo glukoze u koncentraciji od 0,501 g/L i ostalih oligosaharida ukazuje na prisustvo enzimskog kompleksa koje produkuje *P.chitinolyticus* CKS1 koji degradira kristalnu celulozu Avicel (Prilog 3, Slika P-3.2.) ali i amorfni derivat celulozu (CMC) (Prilog 3, Slika P-3.3.) do glukoze u koncentraciji od 0,621 g/L. Endoglukanaze, egzoglukanaze i  $\beta$ -glukozidaze deluju sinergistički da oslobode glukozu kao glavni proizvod hidrolize celuloze. Literaturni podaci pokazuju da većina celulaza deluju kao endoglukanaze i egzoglukanaze (Ko et al., 2007; Rastogi et al., 2010; Wang et al., 2008). Činjenica da soj CKS1 može da hidrolizuje i kristalnu i amorfnu celulozu sugerise da ovaj mikroorganizam produkuje endoglukanaze i egzoglukanaze.

#### **6.5.5. Elektroforetska i zimogramska analiza celulazne aktivnosti**

Renaturaciona elektroforeza SDS- PAGE, koja sadrži Avicel kao supstrat, pokazala je prisustvo dve egzoglukanaze na ~70 and ~ 45 kDa na Kongo-crvenom gelu pod standardnim uslovima (Slika 6.29). Avicelazna aktivnost je ispitivana u supernatantima koristeći različite izvore ugljenika (5,0g/L) za rast soja CKS1 (Slika

6.29.): 1) celobioza; 2) Avicel, 3) CMC; 4) otpadno lekovito bilje; 5) glukoza i 6) saharoza.

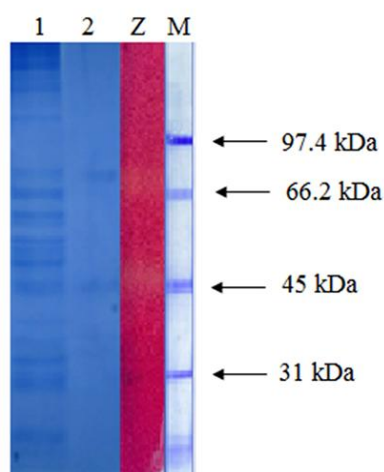


Slika 6.29. Zimogramska analiza Avicelazne aktivnosti supernatanta *P. chitinolyticus* CKS1 koji je rastao u medijumu sa različitim izvorima ugljenika (1-6), urađena na elektroforezi 10% SDS-PAGE sa 0.1% Avicelom kao supstratom. (1) celobioza; (2) Avicel; (3) CMC; (4) otpadno lekovito bilje; (5) glukoza i (6) saharoza; (M) marker.

Zimogramska analiza (Slika 6.29.) pokazuje da soj CKS1 proizvodi egzoglukanaze tokom svog rasta na Avicel-u, celobiozi, CMC i otpadnom lekovitom bilju. Celulazna aktivnost nije detektovana u podlozi sa glukozom i saharozom, pojedinačno.

U prisutvu različitih izvora ugljenika primećeno je različito ponašanje egzoglukanaza. Tokom rasta na celobiozi i otpadnom lekovitom bilju dve trake približno istog intenziteta se proizvode na približno 70 i 45 kDa dok na Avicelu i CMC-i jedna traka na približno 45 kDa se pojavljuje. Prečišćeni enzim (Slika 6.30.) pokazuje prisustvo dve celulaze na približno 70 i 45 kDa.





Slika 6.30. Elektroforeza SDS–PAGE i zimogramska analiza celulozne aktivnosti prečišćenog enzima. (1) Sirovi bakterijski supernatant (otpadno lekovito bilje); (2) prečišćeni enzim; (Z) zimogram enzimske aktivnosti prečišćenog enzima i (M) marker

Prisustvo različitih celuloza kod *Paenibacillus* spp. je zabeleženo u literaturi. *Paenibacillus* sp. BL11 proizvoditri celuloze molarne mase 42, 57 i 86 kDa (Ko et al., 2007), *Paenibacillus polymyxa* MTCC10056 dve celuloze (26,5 i 34 kDa) (Kumar et al., 2012) dok je prisustvo multienzimskog kompleksa zabeleženo kod *P. curdlanolyticus* B-6 (Waeonukul et al., 2009).

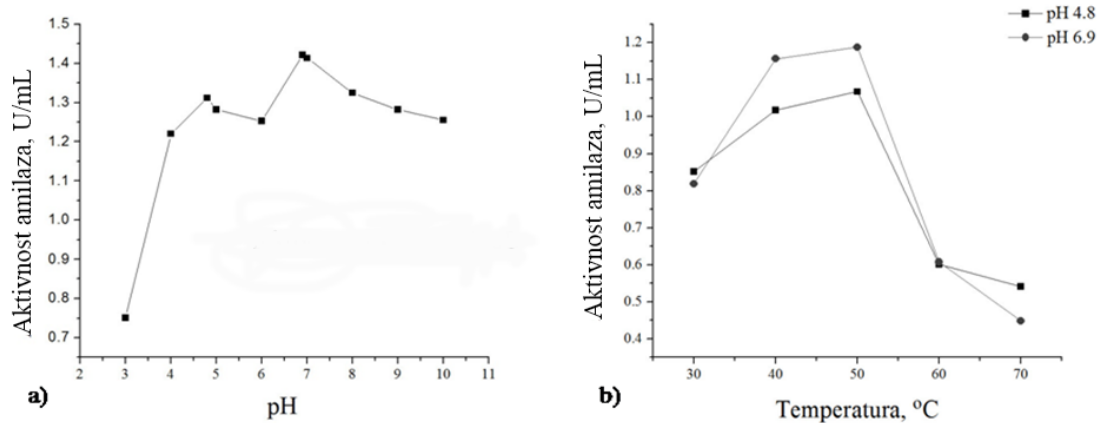
## 6.6. Karakterizacija amilaza

### 6.6.1. Određivanje optimalne temperature i optimalnog pH amilaza

Određivanje optimalne temperature i optimalnog pH amilaza vršeno je ispitivanjem uticaja temperature i pH na aktivnost enzima. Za ovo ispitivanje korišćeni su supernatanti (sirovi enzim) oslobođeni ćelija dobijeni prilikom rasta soja CKS1 u komercijalnoj podlozi (poglavljje 5.5.1. eksperiment 1).

Ispitivanje uticaja pH na amilolitičku aktivnost sirovog enzima (bakterijski supernatant) je prethodno opisano i prodiskutovano u poglavljju 6.3.1.1.a ovde je dat samo grafički prikaz (Slika 6.31. a).

Rezultati određivanja optimalne temperature pokazuju da optimalna temperatura, pri kojoj se postiže maksimum amilazne aktivnosti, za oba ispitivane pH vrednosti (pH 4,8 i 6,9) iznosi 50 °C (Slika 6.31.b). Pri pH vrednosti 4,8 ispitana je optimalna temperatura  $\beta$ -amilaza dok je pri pH 6,9 određivana optimalna temperatura  $\alpha$ -amilaza.



Slika 6.31. Ispitivanje uticaja a) pH i b) temperature na aktivnost amilaza

Bakterijske  $\alpha$ -amilaze i  $\beta$ -amilaze mogu imati različite temperaturne optimume što svakako zavisi od vrste mikroorganizma (Pandey et al., 2000a). Amilaze koje proizvodi *P. chitinolyticus* CKS1 pri pH 4,8 ( $\beta$ -amilaze) i pri pH 6,9 ( $\alpha$ -amilaze) imaju istu optimalnu temperaturu. Slično je zabeleženo kod *Bacillus stearothermophilus* koji proizvodi  $\alpha$ -amilaze i  $\beta$ -amilaze koje imaju istu optimalnu temperaturu od 80 °C.

### 6.6.2. Uticaj metalnih jona i površinski aktivnih materijana na aktivnost $\beta$ -amilaza

Ispitan je uticaj različitih metalnih jona (10 mM) i surfaktanata (0,1 %) Tween 80 i Triton X-100 na aktivnost sirovih  $\beta$ -amilaza. Rezultati pokazuju da  $Mn^{2+}$  ( $MnCl_2$ ),  $Ca^{2+}$  ( $CaCl_2$ ) i  $Mg^{2+}$  ( $MgCl_2$ ) jon pozitivno utiče na enzimsku aktivnost kao i Tween 80 i Triton X-100, dok  $K^+$  ( $KCl$ ) jon uzrokuje blago opadanje enzimске aktivnosti (Tabela 6.12.).

Tabela 6.12. Uticaj različitih metalnih jona i surfakanata na aktivnost sirovih  $\beta$ -amilaza

Metalni joni (10mM)	Rezidualna aktivnost, %
MnCl <sub>2</sub>	121,53
CaCl <sub>2</sub>	167,16
KCl	97,77
MgCl <sub>2</sub>	148,24
Površinski aktivne materije (10mM)	
Tween 80	118,18
Triton X-100	117,81
Kontrola	100

Maksimalna aktivnost  $\beta$ -amilaza je zabeležena u prisustvu jona Ca<sup>2+</sup>. Uloga Ca<sup>2+</sup> jona kao dobrog aktivatora amilazne aktivnosti je zabeležena kod većine amilolitičkih mikroorganizama npr. kod termofilne plesni *Thermomyces langinosus* ATCC34626 (Nguyen et al., 2002), *Bacillus licheniformis* CUMC 305 (Krishnan & Chandra, 1983), *B.amyloliquefaciens* P-001 (Deb et al., 2013), *Bacillus* sp. ANT-6 (Burhan et al., 2003) dok je kod nekih mikroorganizma kao kod *Bacillus* sp. SMIA-2(Cordeiro et al., 2002) zabeležen blag negativni uticaj.

Površinski aktivne materije Tween 80 (118,18%) i Triton X-100 (117,81%) imaju stimulišu aktivnost amilaza. Nasuprot ovim rezultatima, Fincan i saradnici (Fincan et al., 2014) su zabeleželi da dodatak 0,5% Tween 80 i Triton X-100 uzrokuje blago opadanje amilazne aktivnosti kod *Anoxybacillus flavithermis*.

### 6.6.3. Proizvodi hidrolize skroba

$\beta$ -Amilaze koje proizvodi *P.chitinolyticus* CKS1 tokom svog rasta na otpadnoj vodi i na melasi i repinom rezancu, pojedinačno hidrolizuju skrob do maltoze kao glavnog proizvoda (Prilog 3, slika P3-1 i slika P3-4). Maltoza nastaje u ranim fazama reakcije (15 min) pri čemu se koncentracija maltoze povećava kako se produžava vreme trajanja reakcije (Prilog 3, slika P3-1). Takođe se proizvode maltooligosaharidi (npr. graničnidekstrini), maltotrioze i manje količine glukoze. Hyan i saradnici (Zeikus & Hyun, 1987) su zabeležili da je maltoza glavni proizvod hidrolize skroba pomoću  $\beta$ -amilaza koje proizvodi *Clostridium thermosulfurogenes*. Prisustvo maltoze kao glavnog proizvoda hidrolize i relativno malih količina glukoze pomoću amilaza koje produkuje

*C.thermosulfurogenes* SV2 ukazuje na to da su proizvedene amilaze  $\beta$  tipa (Reddy et al., 1997). Amilaze koje proizvodi *Halobacillus* sp. LY9 hidrolizuju skrob do glavnog proizvoda maltoze sa prisutnim tragovima dužih lanaca oligosaharida (Li & Yu, 2011). Prema istraživanju Hansley-a i saradnika (Hensley et al., 1980), linerani lanac amiloze sa neparnim brojem glukoznih jedinica je odgovoran za nastanak malih količina glukoze i maltotrioze kada amiloza hidrolizuje pomoću  $\beta$ -amilaza. Stoga, amilaze koje proizvodi *P.chitinolyticus* CKS1 prvenstveno razgrađuju  $\alpha$ -1,4 glikozidne veze sa ne redukujućeg kraja molekula skroba, oslobađajući maltozu koja ukazuje na aktivnost  $\beta$ -amilaza. S obzirom na to da su svi eksperimenti rađeni sa sirovim, dakle neprečišćenim enzimom, tragovi ostalih ugljenih hidrata na HPLC slikama se mogu objasniti zaostalom aktivnošću  $\alpha$ -amilaza pod pH uslovima koji su nepovoljni za ovaj enzim.

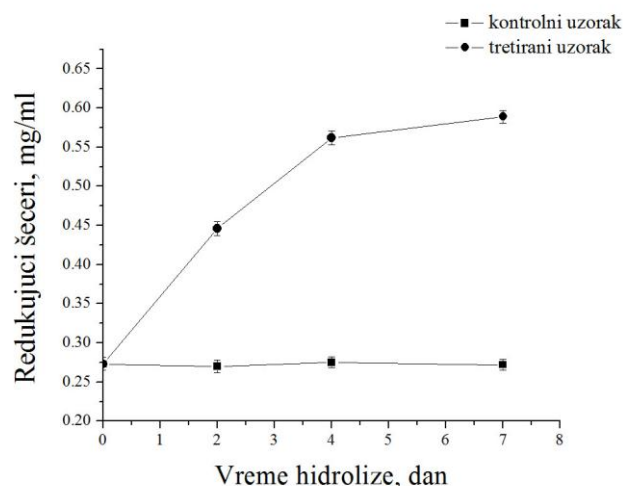
### **6.7. Primena celulaza i amilaza- hidroliza pamučnog materijala i ječmenih mekinja**

Da bi se ispitao celulolitički i amilolitički potencijal soja CKS1, bakterijski supernatant (sirovi enzimi) dobijen nakon optimizacije procesa fermentacije u podlozi sa ječmenim mekinjama (poglavlje 6.4.1.3.) je korišćen za proces hidrolize pamučnog materijala i ječmenih mekinja, pojedinačno.

Enzimska hidroliza, pomoću enzima celulaza, se zasniva na hidrolizi  $\beta$ -1,4 glikozidnih veza unutar molekula celuloze što dovodi do formiranja rastvornih šećera, glukoze i oligosaharida (Lazić et al., 2015; Tomšič et al., 2011). Sadržaj celuloze u pamučnom materijalu iznosi 99% pa je na osnovu toga moguća njegova hidroliza enzimima do glukoze, koja se dalje može fermentisati do etanola (Jeihanipour & Taherzadeh, 2009).

U cilju efkasnije razgradnje pamučne otpadne sirovine ispitivana je hidroliza pamučnog materijala, kao otpadne sirovine iz tekstilne industrije.

Prilikom tretmana pamučnog materijala sirovim celulazama, koje proizvodi soj CKS1, tokom 7 dana hidrolize dolazi do postepenog povećanja koncentracije redukujućih šećera (Slika 6.32.). Maksimalna koncentracija redukujućih šećera je zabeležena nakon 7 dana hidrolize i iznosi 0,589 mg/mL odnosno 0,044 g/g<sub>mat.</sub>

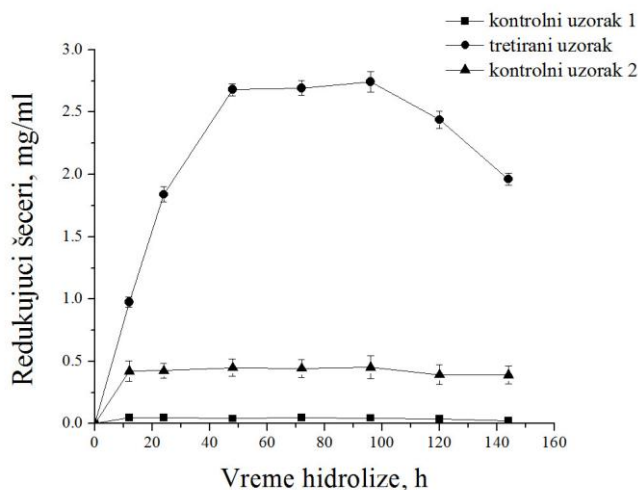


Slika 6.32. Hidroliza pamučnog materijala pomoću celulaza koje proizvodi soj  
CKS1

Iako je proizvodnja celulaza pomoću *Paenibacillus* sp. ranije dokumentovana uliterturi (Ko et al., 2007; Kumar et al., 2012; Mihajlovski et al., 2015a; Ogawa et al., 2007; Pason et al., 2006; Raddadi et al., 2013), njihova potencijalna primena u postupcima enzimske hidrolize celuloznih i lignoceluloznih materijala nije utvrđena. Koncentracija redukujućih šećera, nakon enzimske hidrolize pamučnog materijala (1% w/v), zabeležena u ovom eksperimentu (0,044 g/g<sub>mat</sub>) je daleko niža od vrednosti zabeleženih u radu (Jabasingh & ValliNachiyar, 2011) (50-80 mg/g<sub>mat</sub>). Jabasingh i saradnici (Jabasingh & ValliNachiyar, 2011), su koristili celulazu dobijenu iz plesni *Aspergillus nidulans* za hidrolizu pamučnog materijala u različitim koncentracijama (5-50%). Aktivnost celulaza koje proizvodi plesan *Aspergillus nidulans* (Jabasingh & ValliNachiyar, 2011) je daleko viša u odnosu na vrednost proizvedenih celulaza pomoću soja CKS1 pa su shodno tome i očekivane koncentracije redukujućih šećera daleko više.

HPLC analizom uzorka nakon 7. dana hidrolize pamučnog materijala celulazama detektovana je glukoza kao glavni proizvod hidrolize (Prilog 3, Slika P3-5)što potvrđuje činjenicu da je enzimski, odnosno, celulazni sistem kod soja CKS1 kompleksan, da se sastoji od više različitih celulaza čijim sinergističkim delovanjem dolazi do oslobađanja glukoze.

S obzirom na to da bakterijski supernatant, koji proizvodi soj CKS1 u podlozi sa ječmenim mekinjama, pored celulazne poseduje i amilolitičku aktivnost, ispitana je i mogućnost enzimske hidrolize lignocelulozno-skrobne sirovine odnosno ječmenih mekinja (slika 6.33.).



Slika 6.33. Hidroliza ječmenih mekinja pomoću sirovih enzima (celulaza i  $\beta$ -amilaza) koje proizvodi soj CKS1

Koncentracija oslobođenih redukujućih šećera u kontrolnom uzorku 1 i 2 se ne menja tokom hidrolize i iznosi 0,048 mg/mL i 0,421 mg/mL, pojedinačno dok se maksimum redukujućih šećera oslobađa nakon 96 h hidrolize ječmenih mekinja i iznosi 2.74 mg/mL odnosno 0,411 g/g<sub>mat</sub>.

Osim rada Hameed-a i saradnika (Hameed et al., 2012) i radova naše istraživačke grupe (Mihajlovski et al., 2015b; Mihajlovski et al., 2016) o proizvodnji amilaza pomoću *Paenibacillus* vrsta nema dostupnih literaturnih podataka. Slično kao i kod celulaza, potencijalna primena amilolitičkih enzima u hidrolizi skrobnih sirovina, koje proizvodi *Paenibacillus*, nije utvrđena. U literaturi je zabeleženo nekoliko radova o primeni  $\alpha$ -amilaza u hidrolizi različitih skrobnih sirovina koje proizvode bakterije roda *Bacillus* (Dettori-Campus et al., 1992; Goyal et al., 2005; Konsula & Liakopoulou-Kyriakides, 2004) dok o primeni  $\beta$ -amilaza nema mnogo dostupnih publikovanih radova. HPLC analizom uzoraka nakon hidrolize ječmenih mekinjadetektovane su glukoza i maltoza (Prilog 3, Slika P3-6) što ukazuje na prisustvo dve grupe enzima, celulaza i  $\beta$ -amilaza, u supernatantu soja CKS1. Naša

prethodna istraživanja (Mihajlovski et al., 2015b; Mihajlovski et al., 2016) (odjeljak 6.6.3.) također pokazuju prisustvo maltoze kao glavnog proizvoda hidrolize skroba pomoću amilaza koje proizvodi soj CKS1.

## ZAKLJUČAK

Predmet rada ove doktorske disertacije jeste iskorišćenje otpadnih sirovina poljoprivrednog i industrijskog porekla, za proizvodnju enzima iz grupe celulaza i amilaza uz pomoć novog bakterijskog soja *P.chitinolyticus* CKS1. Pored toga, razvijeni su originalni postupci optimizacije proizvodnje enzima kako na komercijalnim tako i na otpadnim supstratima.

Na osnovu analize svih dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

- Izvršena je identifikacija radnog mikroorganizma metodom sekvencioniranja 16S rRNK kodirajuće genomske sekvence, koja je potvrdila da ovaj izolat pripada *Paenibacillus chitinolyticus* vrsti.
- Novoizolovani bakterijski soj *P.chitinolyticus* CKS1 poseduje sposobnost proizvodnje više različitih celulaza i amilaza.
- Tokom rasta na komercijalnoj podlozi sa celobiozom, kao jedinim izvorom ugljenika, kvašćevim ekstraktom kao izvorom azota, pri pH vrednosti podloge 7, korišćenjem 40 mL radne zapremine podloge u erlenmajeru od 500 mL, na tresilici sa 150 rpm, soj CKS1 proizvodi celulaze sa maksimalnom CMC-aznom aktivnošću od 0,532 U/mL.
- Soj *P.chitinolyticus* CKS1 poseduje mogućnost proizvodnje celulaza, endoglukanaza i egzoglukanaza tokom svog rasta na različitim komercijalnim supstratima. Soj CKS1 je prvi zabeležen *Paenibacillus* sa predominantnom Avicelaznom aktivnošću. Maksimum Avicelazne aktivnosti (1,83 U/mL) i CMC-azne aktivnosti (0,181 U/mL) se postiže u podlozi sa celobiozom kao jedinim izvorom ugljenika.
- Soj *P.chitinolyticus* CKS1 poseduje mogućnost proizvodnje različitih grupa celulaza tokom svog rasta na podlogama sa otpadnim lignocelulaznim materijalima. Maksimum CMC-azne (0,203 U/mL) i Avicelazne (1,94 U/mL) aktivnosti se postiže u podlozi sa otpadnim lekovitim biljem dok se u podlozi sa piljevinom postižu nešto niže vrednosti celulazne aktivnosti i to za endoglukanazu 0,145 U/mL i egzoglukanazu 1,75 U/mL.
- Optimizacijom proizvodnje enzima metodom statistički planiranog eksperimenta dobijeni su sledeći optimalni uslovi za proizvodnju



endoglukanaza i egzoglukanaza, pomoću soja *P. chitinolyticus* CKS1, u podlozi sa ječmenim mekinjama: koncentracija ječmenih mekinja 4% i koncentracija kvašćevog ekstrakta 2,0 g/L. Pod optimalnim uslovima maksimalne vrednosti CMC-azne i Avicelazne aktivnosti iznose 0,405 U/mL i 0,433 U/mL, pojedinačno.

- *P.chitinolyticus* CKS1 poseduje mogućnost rasta na čvrstom otpadnom supstratu- izluženom repinom rezancu. Maksimum proizvodnje celulaza, za oba enzima se dostiže pri koncentraciji inokuluma od 10% nakon 4 dana inkubacije pri odnosu čvrste faze (izluženog rezanca) i tečne faze (rastvora melase) 1:1 i za endoglukanaze iznosi 3,159 U/g a za egzoglukanaze 4,840 U/g.
- Optimalna temperatura i optimalna pH vrednost pri kojima se postže maksimum CMC-azne aktivnosti iznose 50 °C i pH 4,8.
- Optimalna temperatura i optimalna pH vrednost pri kojima se postiže maksimum Avicelazne aktivnosti iznose 80 °C i pH 4,8.
- Dodatak K<sup>+</sup> (KCl) jona povećava Avicelaznu aktivnost skoro ti puta, povećava termostabilnost enzima tako da enzim zadržava 48,39% svoje početne aktivnosti nakon 60 min inkubacije na temperaturi od 80 °C.
- *P. chitinolyticus* CKS1 hidrolizuje Avicel i CMC do glukoze i oligosaharida koji su preliminarno identifikovani kao: celobioza, celotrioza, celotetraza. Prisustvo glukoze u koncentraciji od 0,501 g/L i oligosaharida ukazuje na delovanje enzimskog kompleksa, koje produkuje soj CKS1, a degradira kristalnu celulozu Avicel i amorfni derivat celuloze (CMC) do glukoze u koncentraciji od 0,621 g/L.
- Prečišćene celulaze sadrže dva proteina veličine približno 70 i 45 kDa.
- Iako je u literaturi *P.chitinolyticus* vrsta opisana kao neamilolitička, izolovani soj CKS1 poseduje sposobnost proizvodnje amilaza, kako na komercijalnoj podlozi tako i na otpadnim sirovinama. *P.chitinolyticus* CKS1 proizvodi amilaze sa dominantnom aktivnošću  $\beta$ -amilaze, koja nije svojstvena većini mikroorganizama.
- Primenom metode statistički planiranog eksperimenta, pod optimalnim uslovima, maksimum produkcije  $\beta$ -amilaze, na otpadnoj vodi iz industrije prerade kartonske ambalaže, iznosi 0,333U/mL i postiže se nakon 62 h

inkubacije pri koncentraciji inokuluma 2,40%, koncentraciji kazein hidrolizata 2,02 g/L i koncentraciji kvašćevog ekstrakta 3,98 g/L.

- Približno 3,66 puta je povećana proizvodnja  $\beta$ -amilaze u optimizovanoj podlozi sa melasom i izluženim repinim rezancem u odnosu na istu neoptimizovanu podlogu. SEM analizom rezanca, nakon fermentacije melase i izluženog repinog rezanca sojem CKS1, utvrđena je imobilizacija ćelija *P. chitinolyticus* CKS1 na rezancu, što za posledicu ima veću aktivnost  $\beta$ -amilaza u ispitivanom uzorku.
- Primenom metode statistički planiranog eksperimenta, pod optimalnim uslovima, maksimum proizvodnje  $\beta$ -amilaze, u podlozi sa melasom i izluženim repinim rezancem, iznosi 2,237 U/mL i postiže se nakon 83,07 h inkubacije pri koncentraciji inokuluma 10% i pri koncentraciji repinog rezanca 3%.
- *P. chitinolyticus* CKS1 proizvodi dve vrste amilaza  $\alpha$ -amilaze i  $\beta$ -amilaze koje imaju istu optimalnu temperaturu od 50 °C . Optimalno pH  $\beta$ -amilaza iznosi 4,8, a  $\alpha$ -amilaza 6,9.
- Primena sirovih celulaza koje proizvodi soj CKS1 ogleda se u mogućnosti hidrolize pamučnog materijala pri čemu se oslobađa 0,589 mg/mL ukupnih redukujućih šećera, računatih na glukozu.
- Primena sirovih celulaza i amilaza koje proizvodi soj CKS1 ogleda se u mogućnosti hidrolize ječmenih mekinja, pri čemu se nakon 96 h hidrolize oslobađa 2,74 mg/mL redukujućih šećera, računatih na maltozu.

Na osnovu dobijenih eksperimentalnih podataka i detaljnog literaturnog pregleda, naučni doprinos ove disertacije ogleda se u razvoju mikrobiološke proizvodnje celulaza, pre svega egzoglukanaza na otpadnim sirovinama odnosno na lignoceluloznoj biomasi i amilolitičkih enzima, posebno  $\beta$ -amilaza na otpadnoj vodi i na melasi i izluženom repinom rezancu. Razvijene metode optimizacije proizvodnje celulaza i amilaza se mogu smatrati pogodnim za potrebe proizvodnje enzima, jer su ekonomski isplative, budući da se baziraju na iskorišćenju različitih otpadnih sirovina. Takođe, dobijene celulaze i amilaze mogu imati potencijalnu industrijsku primenu u hidrolizi celuloznih i saharifikaciji skrobnih sirovina za industrijsku proizvodnju bioetanola. Proizvodi hidrolize celuloze i skroba, glukozu i maltozu, predstavljaju

vredne biotehnoške proizvode sa širokom mogućnošću primene u prehrambenoj i škrobnoj industriji.

## LITERATURA

- [1] Abou, D.M., El-Sayed, A., El-Fallal, A., Omar, N. 2010. Production and partial characterization of high molecular weight extracellular alpha-amylase from *Thermoactinomyces vulgaris* isolated from Egyptian soil. *Polish journal of microbiology/Polskie Towarzystwo Mikrobiologow= The Polish Society of Microbiologists*, **60**(1), 65-71.
- [2] Abraham, J., Gea, T., Sánchez, A. 2014. Substitution of chemical dehairing by proteases from solid-state fermentation of hair wastes. *Journal of cleaner production*, **74**, 191-198.
- [3] Acharya, P., Acharya, D., Modi, H. 2008. Optimization for cellulase production by *Aspergillus niger* using saw dust as substrate. *African Journal of Biotechnology*, **7**(22).
- [4] Adinarayana, K., Ellaiah, P. 2002. Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* sp. *J Pharm Pharm Sci*, **5**(3), 272-278.
- [5] Adsul, M., Ghule, J., Singh, R., Shaikh, H., Bastawde, K., Gokhale, D., Varma, A. 2004. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. *Carbohydrate Polymers*, **57**(1), 67-72.
- [6] Adsul, M., Sharma, B., Singhanian, R.R., Saini, J.K., Sharma, A., Mathur, A., Gupta, R., Tuli, D.K. 2014. Blending of cellulolytic enzyme preparations from different fungal sources for improved cellulose hydrolysis by increasing synergism. *RSC Advances*, **4**(84), 44726-44732.
- [7] Aguilera, M., Monteoliva-Sánchez, M., Suárez, A., Guerra, V., Lizama, C., Bennisar, A., Ramos-Cormenzana, A. 2001. *Paenibacillus jamilae* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium able to grow in olive-mill wastewater. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **51**(5), 1687-1692.
- [8] Ahmed, S., Bashir, A., Saleem, H., Saadia, M., Jamil, A. 2009. Production and purification of cellulose-degrading enzymes from a filamentous fungus *Trichoderma harzianum*. *Pakistan Journal of Botany*, **41**(3), 1411-1419.

- [9] Ajayi, A., Fagade, O. 2003. Utilization of corn starch as substrate for  $\beta$ -amylase by *Bacillus* spp. *African Journal of Biomedical Research*, **6**(1), 37-42.
- [10] Aldor, I.S., Keasling, J.D. 2003. Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Current opinion in biotechnology*, **14**(5), 475-483.
- [11] Alshelmani, M.I., Loh, T.C., Foo, H.L., Lau, W.H., Sazili, A.Q. 2013. Characterization of cellulolytic bacterial cultures grown in different substrates. *The Scientific World Journal*, **2013**.
- [12] Anderson, M.J., Whitcomb, P.J. 2005. *RSM simplified: optimizing processes using response surface methods for design of experiments*. Productivity Press.
- [13] Angenent, L.T., Karim, K., Al-Dahhan, M.H., Wrenn, B.A., Domínguez-Espinosa, R. 2004. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *TRENDS in Biotechnology*, **22**(9), 477-485.
- [14] Annamalai, N., Thavasi, R., Vijayalakshmi, S., Balasubramanian, T. 2011. A novel thermostable and halostable carboxymethylcellulase from marine bacterium *Bacillus licheniformis*AU01. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **27**(9), 2111-2115.
- [15] Anwar, Z., Gulfranz, M., Irshad, M. 2014. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, **7**(2), 163-173.
- [16] Aqeel, B.M., Umar, D.M. 2008. Effect of alternative carbon and nitrogen sources on production of alpha-amylase by *Bacillus megaterium*. *Journal of Biotechnology*, **136**, S293.
- [17] Asgher, M., Ahmad, Z., Iqbal, H.M.N. 2013. Alkali and enzymatic delignification of sugarcane bagasse to expose cellulose polymers for saccharification and bio-ethanol production. *Industrial Crops and Products*, **44**, 488-495.
- [18] Ash, C., Farrow, J., Wallbanks, S., Collins, M. 1991. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Letters in Applied Microbiology*, **13**(4), 202-206.

- [19] Ash, C., Priest, F.G., Collins, M.D. 1993. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie van Leeuwenhoek*, **64**(3-4), 253-260.
- [20] Asha, B.M., Revathi, M., Yadav, A., Sakthivel, N. 2012. Purification and characterization of a thermophilic cellulase from a novel cellulolytic strain, *Paenibacillus barcinonensis*. *Journal of microbiology and biotechnology*, **22**(11), 1501-1509.
- [21] Assareh, R., Shahbani Zahiri, H., Akbari Noghabi, K., Aminzadeh, S. 2012. Characterization of the newly isolated *Geobacillus* sp. T1, the efficient cellulase-producer on untreated barley and wheat straws. *Bioresource technology*, **120**, 99-105.
- [22] Babu, K., Satyanarayana, T. 1995.  $\alpha$ -Amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, **30**(4), 305-309.
- [23] Balać, I., Bugarski, B., Ćosić, I., Dramićanin, M., Đorđević, D., Filipović, N., Ignjatović, N., Janačković, Đ., Kojić, M., Manojlović, V. 2010. *Biomaterijali*. Institut tehničkih nauka Srpske akademije nauka i umetnosti.
- [24] Bano, S., Qader, S.A.U., Aman, A., Syed, M.N., Durrani, K. 2013. High production of cellulose degrading endo-1, 4- $\beta$ -D-glucanase using bagasse as a substrate from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. *Carbohydrate polymers*, **91**(1), 300-304.
- [25] Barros, F.F.C., Ponezi, A.N., Pastore, G.M. 2008. Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, **35**(9), 1071-1078.
- [26] Beckord, L., Kneen, E., Lewis, K. 1945. Bacterial Amylases. *Industrial & Engineering Chemistry*, **37**(7), 692-696.
- [27] Belghith, H., Ellouz-Chaabouni, S., Gargouri, A. 2001. Biostoning of denims by *Penicillium occitanis* (Pol6) cellulases. *Journal of biotechnology*, **89**(2), 257-262.
- [28] Ben-Jacob, E., Cohen, I., Golding, I., Gutnick, D.L., Tcherpakov, M., Helbing, D., Ron, I.G. 2000. Bacterial cooperative organization under antibiotic stress. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, **282**(1), 247-282.

- [29] Berlin, A., Maximenko, V., Gilkes, N., Saddler, J. 2007. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, **97**(2), 287-296.
- [30] Bernfeld, P. 1955. Amylases,  $\alpha$  and  $\beta$ . *Methods in enzymology*, **1**, 149-158.
- [31] Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., Escaleira, L.A. 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, **76**(5), 965-977.
- [32] Bhat, M. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology advances*, **18**(5), 355-383.
- [33] Bhatia, L., Johri, S., Ahmad, R. 2012. An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agro waste. **2**, 1-19.
- [34] Bhella, R.S., Altosaar, I. 1988. Role of cAMP in the mediation of glucose catabolite repression of glucoamylase synthesis in *Aspergillus awamori*. *Current genetics*, **14**(3), 247-252.
- [35] Binod, P., Sindhu, R., Singhanian, R.R., Vikram, S., Devi, L., Nagalakshmi, S., Kurien, N., Sukumaran, R.K., Pandey, A. 2010. Bioethanol production from rice straw: an overview. *Bioresource technology*, **101**(13), 4767-4774.
- [36] Boidin, A., Effront, J. 1917. Process for treating amylaceous substances, Google Patents, US 1,227,374.
- [37] Bolton, D.J., Kelly, C.T., Fogarty, W.M. 1997. Purification and characterization of the  $\alpha$ -amylase of *Bacillus flavothermus*. *Enzyme and Microbial Technology*, **20**(5), 340-343.
- [38] Box, G.E., Wilson, K. 1951. On the experimental attainment of optimum conditions. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, **13**(1), 1-45.
- [39] Božić, N., Ruiz, J., López-Santín, J., Vujčić, Z. 2011. Production and properties of the highly efficient raw starch digesting  $\alpha$ -amylase from a *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a. *Biochemical Engineering Journal*, **53**(2), 203-209.
- [40] Bradley, N. 2007. The response surface methodology, Indiana University South Bend.

- [41] Bramucci, M.G., Nagarajan, V. 2000. Industrial wastewater bioreactors: sources of novel microorganisms for biotechnology. *Trends in biotechnology*, **18**(12), 501-505.
- [42] Brijwani, K., Oberoi, H.S., Vadlani, P.V. 2010. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. *Process Biochemistry*, **45**(1), 120-128.
- [43] Bronnenmeier, K., Staudenbauer, W.L. 1990. Cellulose hydrolysis by a highly thermostable endo-1, 4- $\beta$ -glucanase (Avicelase I) from *Clostridium stercorarium*. *Enzyme and Microbial Technology*, **12**(6), 431-436.
- [44] Buckeridge, M.S., Goldman, G.H. 2011. *Routes to cellulosic ethanol*. Springer Science & Business Media.
- [45] Budi, S.W., van Tuinen, D., Arnould, C., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. 2000. Hydrolytic enzyme activity of *Paenibacillus* sp. strain B2 and effects of the antagonistic bacterium on cell integrity of two soil-borne pathogenic fungi. *Applied Soil Ecology*, **15**(2), 191-199.
- [46] Burhan, A., Nisa, U., Gökhan, C., Ömer, C., Ashabil, A., Osman, G. 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochemistry*, **38**(10), 1397-1403.
- [47] Burkert, J., Maugeri, F., Rodrigues, M. 2004. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresource technology*, **91**(1), 77-84.
- [48] Carrard, G., Koivula, A., Söderlund, H., Béguin, P. 2000. Cellulose-binding domains promote hydrolysis of different sites on crystalline cellulose. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**(19), 10342-10347.
- [49] Carvalho, W., Silva, S.S., Converti, A., Vitolo, M. 2002. Metabolic behavior of immobilized *Candida guilliermondii* cells during batch xylitol production from sugarcane bagasse acid hydrolyzate. *Biotechnology and bioengineering*, **79**(2), 165-169.
- [50] Chaabouni, S.E., Belguith, H., Hassairi, I., M'Rad, K., Ellouz, R. 1995. Optimization of cellulase production by *Penicillium occitanis*. *Applied microbiology and biotechnology*, **43**(2), 267-269.



- [51] Chandra, M., Kalra, A., Sharma, P.K., Sangwan, R.S. 2009. Cellulase production by six *Trichoderma* spp. fermented on medicinal plant processings. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, **36**(4), 605-609.
- [52] Chi, M.-C., Chen, Y.-H., Wu, T.-J., Lo, H.-F., Lin, L.-L. 2010. Engineering of a truncated  $\alpha$ -amylase of *Bacillus* sp. strain TS-23 for the simultaneous improvement of thermal and oxidative stabilities. *Journal of bioscience and bioengineering*, **109**(6), 531-538.
- [53] Cohen, I., Ron, I.G., Ben-Jacob, E. 2000. From branching to nebula patterning during colonial development of the *Paenibacillus alvei* bacteria. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, **286**(1), 321-336.
- [54] Collet, C., Schwitzguébel, J.P., Peringer, P. 2003. Improvement of acetate production from lactose by growing *Clostridium thermolacticum* in mixed batch culture. *Journal of applied microbiology*, **95**(4), 824-831.
- [55] Cordeiro, C.A.M., Martins, M.L.L., Luciano, A.B. 2002. Production and properties of alpha-amylase from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, **33**(1), 57-61.
- [56] Cotârleț, M. 2013. Medium optimization for the production of cold-active beta amylase by psychrotrophic *Streptomyces* MIUG 4 alga using response surface methodology. *Microbiology*, **82**(2), 147-154.
- [57] Coutinho, P., Henrissat, B. 1999. Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach server.
- [58] Couto, S.R., Sanromán, M.A. 2005. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal*, **22**(3), 211-219.
- [59] Culbertson, A., Jin, M., da Costa Sousa, L., Dale, B.E., Balan, V. 2013. In-house cellulase production from AFEX™ pretreated corn stover using *Trichoderma reesei* RUT C-30. *RSC Advances*, **3**(48), 25960-25969.
- [60] da Silva, K.R.A., Salles, J.F., Seldin, L., van Elsas, J.D. 2003. Application of a novel *Paenibacillus*-specific PCR-DGGE method and sequence analysis to assess the diversity of *Paenibacillus* spp. in the maize rhizosphere. *Journal of Microbiological Methods*, **54**(2), 213-231.

- [61] Daane, L., Harjono, I., Barns, S., Launen, L., Palleron, N., Häggblom, M. 2002. PAH-degradation by *Paenibacillus* spp. and description of *Paenibacillus naphthalenovorans* sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium from the rhizosphere of salt marsh plants. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **52**(1), 131-139.
- [62] De Almeida Siqueira, E., Mizuta, K., Giglio, J. 1997. *Pycnoporus sanguineus*: A novel source of [alpha]-amylase. *Mycological research*, **101**(02), 188-190.
- [63] De Carvalho, L.M.J., De Castro, I.M., Da Silva, C.A.B. 2008. A study of retention of sugars in the process of clarification of pineapple juice (*Ananas comosus*, L. Merrill) by micro-and ultra-filtration. *Journal of Food Engineering*, **87**(4), 447-454.
- [64] de Castro, A.L., Vollú, R.E., Peixoto, R.S., Grigorevski-Lima, A.L., Coelho, R.R., Bon, E.P., Rosado, A.S., Seldin, L. 2011. Cellulolytic potential of a novel strain of *Paenibacillus* sp. isolated from the armored catfish *Parotocinclus maculicauda* gut. *Brazilian Journal of Microbiology*, **42**(4), 1608-1615.
- [65] De Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N., Ludwig, W., Rainey, F., Schleifer, K.-H., Whitman, W. 2009. Bergey's manual of systematic bacteriology (Volume three: The firmicutes). Editor in Chief: Michael Goodfellow. Segundaedición, London New York: Springer Dordrecht Heidelberg.
- [66] Deb, P., Talukdar, S.A., Mohsina, K., Sarker, P.K., Sayem, S. 2013. Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. *Springer Plus*, **2**(1), 154.
- [67] Dehnavi, G.Z., Laucericca, J.L., Rodriguez, D., Beatón, M., Taherzadeh, M.J., Martin, C. 2011. Fractionation of the main components of barley spent grains from a microbrewery. *Cellulose Chemistry and Technology*, **45**(5), 339-345.
- [68] Del Castillo, E. 2007. *Process optimization: a statistical approach*. Springer Science & Business Media.
- [69] Demain, A.L., Newcomb, M., Wu, J.D. 2005. Cellulase, clostridia, and ethanol. *Microbiology and molecular biology reviews*, **69**(1), 124-154.
- [70] Dettori-Campus, B., Priest, F., Stark, J. 1992. Hydrolysis of starch granules by the amylase from *Bacillus stearothermophilus* NCA 26. *Process biochemistry*, **27**(1), 17-21.

- [71] Dey, G., Mitra, A., Banerjee, R., Maiti, B. 2001. Enhanced production of amylase by optimization of nutritional constituents using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, **7**(3), 227-231.
- [72] Dhawale, M.R., Wilson, J.J., Khachatourians, G.G., Ingledew, W.M. 1982. Improved method for detection of starch hydrolysis. *Applied and environmental microbiology*, **44**(3), 747-750.
- [73] Diderichsen, B., Christiansen, L. 1988. Cloning of a maltogenic alpha-amylase from *Bacillus stearothermophilus*. *FEMS microbiology letters*, **56**(1), 53-59.
- [74] Dienes, D., Egyhazi, A., Reczey, K. 2004. Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases. *Industrial Crops and Products*, **20**(1), 11-21.
- [75] Domingues, F., Queiroz, J., Cabral, J., Fonseca, L. 2000. The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme and Microbial Technology*, **26**(5), 394-401.
- [76] Doppelbauer, R., Esterbauer, H., Steiner, W., Lafferty, R., Steinmüller, H. 1987. The use of lignocellulosic wastes for production of cellulase by *Trichoderma reesei*. *Applied microbiology and biotechnology*, **26**(5), 485-494.
- [77] El-Aassar, S., Omar, S., Gouda, M., Ismail, A., Abdel-Fattah, A. 1992. Purification of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus lentus* cultures. *Applied microbiology and biotechnology*, **38**(3), 312-314.
- [78] El-Fallal, A., Dohara, M.A., El-Sayed, A., Omar, N. 2012. Starch and Microbial  $\alpha$ -Amylases: From Concepts to Biotechnological Applications. *Carbohydrates–Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*. InTech, 459-488.
- [79] Elo, S., Suominen, I., Kämpfer, P., Juhanoja, J., Salkinoja-Salonen, M., Haahtela, K. 2001. *Paenibacillus borealis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from spruce forest humus in Finland. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51**(2), 535-545.
- [80] Emtiazi, G., Pooyan, M., Shamalnasab, M. 2007. Cellulase activities in nitrogen fixing *Paenibacillus* isolated from soil in N-free media. *World J Agril Sci*, **3**, 602-608.

- [81] FAOSTAT, F. 2006. FAO statistical databases. *Food and Agric. Organ. of the United Nations, Rome. FAOSTAT: FAO statistical databases. Food and Agric. Organ. of the United Nations, Rome.*
- [82] Feng, Y., Jiang, J.-x., Zhu, L.-w. 2009. Recent developments in activities, utilization and sources of cellulase. *Forestry Studies in China*, **11**(3), 202-207.
- [83] Fincan, S.A., Enez, B., Özdemir, S., Bekler, F.M. 2014. Purification and characterization of thermostable  $\alpha$ -amylase from thermophilic *Anoxybacillus flavithermus*. *Carbohydrate polymers*, **102**, 144-150.
- [84] Fontaine, S., Bardoux, G., Benest, D., Verdier, B., Mariotti, A., Abbadie, L. 2004. Mechanisms of the priming effect in a savannah soil amended with cellulose. *Soil Science Society of America Journal*, **68**(1), 125-131.
- [85] Freer, S.N. 1993. Purification and characterization of the extracellular alpha-amylase from *Streptococcus bovis* JB1. *Applied and environmental microbiology*, **59**(5), 1398-1402.
- [86] Galante, Y., De Conti, A., Monteverdi, R. 1998. Application of Trichoderma enzymes in the food and feed industries. *Trichoderma and Gliocladium*, **2**, 327-342.
- [87] Gangadharan, D., Sivaramakrishnan, S., Nampoothiri, K.M., Sukumaran, R.K., Pandey, A. 2008. Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Bioresource Technology*, **99**(11), 4597-4602.
- [88] Gáspár, M., Kálmán, G., Réczey, K. 2007. Corn fiber as a raw material for hemicellulose and ethanol production. *Process Biochemistry*, **42**(7), 1135-1139.
- [89] Gigras, P., Sahai, V., Gupta, R. 2002. Statistical media optimization and production of ITS  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus oryzae* in a bioreactor. *Current microbiology*, **45**(3), 203-208.
- [90] Gilkes, N., Henrissat, B., Kilburn, D., Miller, R., Warren, R. 1991. Domains in microbial beta-1, 4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. *Microbiological reviews*, **55**(2), 303-315.
- [91] Gioia, L., Manta, C., Ovsejevi, K., Burgueño, J., Menéndez, P., Rodriguez-Couto, S. 2014. Enhancing laccase production by a newly-isolated strain of

- Pycnoporussanguineus* with high potential for dye decolouration. *RSC Advances*, **4**(64), 34096-34103.
- [92] Giraud, E., Gosselin, L., Marin, B., Parada, J., Raimbault, M. 1993. Purification and characterization of an extracellular amylase from *Lactobacillus plantarum* strain A6. *Journal of applied bacteriology*, **75**(3), 276-282.
- [93] Gómez, J., Pazos, M., Couto, S.R.g., Sanromán, M.Á. 2005. Chestnut shell and barley bran as potential substrates for laccase production by *Coriolopsis rigida* under solid-state conditions. *Journal of Food Engineering*, **68**(3), 315-319.
- [94] Goyal, N., Gupta, J., Soni, S. 2005. A novel raw starch digesting thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. *Enzyme and Microbial Technology*, **37**(7), 723-734.
- [95] Grbavčić, S. 2014. Proizvodnja mikrobnih lipaza i proteaza kao aditiva u detergentsima. Doktorska teza., Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu. Beograd.
- [96] Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B. 2003. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, **38**(11), 1599-1616.
- [97] Gusakov, A.V., Salanovich, T.N., Antonov, A.I., Ustinov, B.B., Okunev, O.N., Burlingame, R., Emalfarb, M., Baez, M., Sinitsyn, A.P. 2007. Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, **97**(5), 1028-1038.
- [98] Ha, Y.M., Lee, D.G., Yoon, J.-H., Park, Y.-H., Kim, Y.J. 2001. Rapid and simple purification of a novel extracellular  $\beta$ -amylase from *Bacillus* sp. *Biotechnology letters*, **23**(17), 1435-1438.
- [99] Hameed, U., Mahmood, Z., Javed, M. 2012. Solid state fermentation for the production of alpha-amylase by *Paenibacillus amylolyticus*. *Pakistan Journal of Botany (Pakistan)*, **44**, 341-346.
- [100] Hayashida, S., Ohta, K., Mo, K. 1988. Cellulases of *Humicola insolens* and *Humicola grisea*. *Methods in Enzymology*, **160**, 323-332.
- [101] Heck, J.X., Hertz, P.F., Ayub, M.A. 2002. Cellulase and xylanase productions by isolated Amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. *Brazilian Journal of Microbiology*, **33**(3), 213-218.

- [102] Heinze, T., Liebert, T. 2001. Unconventional methods in cellulose functionalization. *Progress in Polymer Science*, **26**(9), 1689-1762.
- [103] Heinzelman, P., Snow, C.D., Wu, I., Nguyen, C., Villalobos, A., Govindarajan, S., Minshull, J., Arnold, F.H. 2009. A family of thermostable fungal cellulases created by structure-guided recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**(14), 5610-5615.
- [104] Hensley, D.E., Smiley, K.L., Boundy, J.A., Lagoda, A.A. 1980. Beta-Amylase production by *Bacillus polymyxa* on a corn steep-starch-salts medium. *Applied and environmental microbiology*, **39**(3), 678.
- [105] Hernández, M.S., Rodriguez, M.R., Guerra, N.P., Rosés, R.P. 2006. Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *Journal of food engineering*, **73**(1), 93-100.
- [106] Heyndrickx, M., Vandemeulebroecke, K., Scheldeman, P., Kersters, K., De Vos, P., Logan, N., Aziz, A., Ali, N., Berkeley, R. 1996. A polyphasic reassessment of the genus *Paenibacillus*, reclassification of *Bacillus lautus* (Nakamura 1984) as *Paenibacillus lautus* comb. nov. and of *Bacillus peoriae* (Montefusco et al. 1993) as *Paenibacillus peoriae* comb. nov., and emended descriptions of *P. lautus* and of *P. peoriae*. *International journal of systematic bacteriology*, **46**(4), 988-1003.
- [107] <http://usmle.biochemistryformedics.com/action-of-alpha-amylase-on-starch/>.
- [108] <http://www.rsc.org/Education/Teachers/Resources/cfb/carbohydrates.htm>.
- [109] Ilori, M.O., Amund, O.O., Omidiji, O. 1995. Short communication: Purification and properties of a glucose-forming amylase of *Lactobacillus brevis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **11**(5), 595-596.
- [110] Iqbal, H.M.N., Kyazze, G., Keshavarz, T. 2013. Advances in the valorization of lignocellulosic materials by biotechnology: an overview. *BioResources*, **8**(2), 3157-3176.
- [111] Jabasingh, S.A., ValliNachiyar, C. 2011. Optimization of cellulase production by *Aspergillus nidulans*: application in the biosoftening of cotton fibers. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **27**(1), 85-97.
- [112] Jami Al Ahmadi, K., Tabatabaei Yazdi, M., Fathi Najafi, M., Shahverdi, A., Faramarzi, M., Zarrini, G., Behravan, J. 2008. Isolation and characterization of

- a chitinolytic enzyme producing microorganism, *Paenibacillus chitinolyticus* JK2 from Iran. *Research Journal of Microbiology*, **3**(6), 395-404.
- [113] Jančić, D. 2014. Završni master rad, Upravljanje otpadom i otpadnim vodama u fabrici za izradu transportne ambalaže.
- [114] Jegannathan, K.R., Nielsen, P.H. 2013. Environmental assessment of enzyme use in industrial production—a literature review. *Journal of Cleaner Production*, **42**, 228-240.
- [115] Jeihanipour, A., Taherzadeh, M.J. 2009. Ethanol production from cotton-based waste textiles. *Bioresource technology*, **100**(2), 1007-1010.
- [116] Jin, B., van Leeuwen, J.H., Yu, Q., Patel, B. 1999. Screening and selection of microfungi for microbial biomass protein production and water reclamation from starch processing wastewater. *Journal of chemical technology and biotechnology*, **74**(2), 106-110.
- [117] Jin, B., Yan, X., Yu, Q., Van Leeuwen, J.H. 2002. A comprehensive pilot plant system for fungal biomass protein production and wastewater reclamation. *Advances in Environmental Research*, **6**(2), 179-189.
- [118] Jørgensen, H., Kristensen, J.B., Felby, C. 2007. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, **1**(2), 119-134.
- [119] Kabel, M.A., Van der Maarel, M.J., Klip, G., Voragen, A.G., Schols, H.A. 2006. Standard assays do not predict the efficiency of commercial cellulase preparations towards plant materials. *Biotechnology and bioengineering*, **93**(1), 56-63.
- [120] Kajiyama, S.i., Kawasaki, H., Yagi, M., Seki, T., Fukusaki, E.-i., Kobayashi, A. 2002. *Paenibacillus glycanilyticus* sp. nov., a novel species that degrades heteropolysaccharide produced by the cyanobacterium *Nostoc commune*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **52**(5), 1669-1674.
- [121] Kalishwaralal, K., Gopalram, S., Vaidyanathan, R., Deepak, V., Pandian, S.R.K., Gurunathan, S. 2010. Optimization of  $\alpha$ -amylase production for the green synthesis of gold nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **77**(2), 174-180.

- [122] Kammoun, R., Naili, B., Bejar, S. 2008. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). *Bioresource technology*, **99**(13), 5602-5609.
- [123] Karim, A., Nawaz, M.A., Aman, A., Qader, S.A.U. 2015. Hyper production of cellulose degrading endo (1, 4)  $\beta$ -d-glucanase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB2. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, **8**(2), 160-165.
- [124] Karmakar, M., Ray, R. 2011. Current trends in research and application of microbial cellulases. *Research Journal of Microbiology*, **6**(1), 41-53.
- [125] Kasana, R.C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., Gulati, A. 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current microbiology*, **57**(5), 503-507.
- [126] Kim, B.-K., Lee, B.-H., Lee, Y.-J., Jin, I.-H., Chung, C.-H., Lee, J.-W. 2009. Purification and characterization of carboxymethylcellulase isolated from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53. *Enzyme and Microbial Technology*, **44**(6), 411-416.
- [127] Kim, J., Yun, S., Ounaies, Z. 2006. Discovery of cellulose as a smart material. *Macromolecules*, **39**(12), 4202-4206.
- [128] Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C. 2002. Industrial enzyme applications. *Current opinion in biotechnology*, **13**(4), 345-351.
- [129] Knežević-Jugović, Z. 1998. *Enzimsko inženjerstvo*. Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, Beograd.
- [130] Ko, C.-H., Chen, W.-L., Tsai, C.-H., Jane, W.-N., Liu, C.-C., Tu, J. 2007. *Paenibacillus campinasensis* BL11: a wood material-utilizing bacterial strain isolated from black liquor. *Bioresource technology*, **98**(14), 2727-2733.
- [131] Kompala, D.S., Ramkrishna, D., Jansen, N.B., Tsao, G.T. 1986. Investigation of bacterial growth on mixed substrates: experimental evaluation of cybernetic models. *Biotechnology and Bioengineering*, **28**(7), 1044-1055.
- [132] Konsula, Z., Liakopoulou-Kyriakides, M. 2004. Hydrolysis of starches by the action of an  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*, **39**(11), 1745-1749.



- [133] Koprivica, G., Mišljenović, N., Lević, L., Pribiš, V. 2009. Dehidratacija melase šećerne repe sa skrobom i preparatima na bazi skroba. *VIII Simpozijum «Savremene tehnologije i privredni razvoj», Leskovac, 23. i 24. oktobar 2009. godine, Zbornik radova Tehnološkog fakulteta u Leskovcu*, **19**, 74-82.
- [134] Kostylev, M., Wilson, D. 2012. Synergistic interactions in cellulose hydrolysis. *Biofuels*, **3**(1), 61-70.
- [135] Kracher, D., Oros, D., Yao, W., Preims, M., Rezić, I., Haltrich, D., Rezić, T., Ludwig, R. 2014. Fungal secretomes enhance sugar beet pulp hydrolysis. *Biotechnology journal*, **9**(4), 483-492.
- [136] Krishna, C. 1999. Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes. *Bioresource Technology*, **69**(3), 231-239.
- [137] Krishnan, T., Chandra, A. 1983. Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* CUMC305. *Applied and Environmental Microbiology*, **46**(2), 430-437.
- [138] Kuhad, R.C., Gupta, R., Khasa, Y.P., Singh, A. 2010a. Bioethanol production from lantanacamura (red sage): pretreatment, saccharification and fermentation. *Bioresource technology*, **101**(21), 8348-8354.
- [139] Kuhad, R.C., Gupta, R., Singh, A. 2011. Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme research*, **2011**.
- [140] Kuhad, R.C., Mehta, G., Gupta, R., Sharma, K.K. 2010b. Fed batch enzymatic saccharification of newspaper cellulose improves the sugar content in the hydrolysates and eventually the ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass and Bioenergy*, **34**(8), 1189-1194.
- [141] Kühnel, S., Schols, H.A., Gruppen, H. 2011. Aiming for the complete utilization of sugar-beet pulp: Examination of the effects of mild acid and hydrothermal pretreatment followed by enzymatic digestion. *Biotechnol Biofuels*, **4**, 14.
- [142] Kumar, D., Ashfaq, M., Muthukumar, M., Singh, M., Garg, N. 2012. Production and characterization of carboxymethyl cellulase from *Paenibacillus polymyxa* using mango peel as substrate. *J. Environ. Biol*, **33**, 81-84.
- [143] Kumar, R., Singh, S., Singh, O.V. 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, **35**(5), 377-391.

- [144] Kwan, H., So, K., Chan, K., Cheng, S. 1994. Purification and properties of  $\beta$ -amylase from *Bacillus circulans* S31. *World journal of microbiology & biotechnology*, **10**(5), 597-598.
- [145] Ladeira, S.A., Cruz, E., Delatorre, A.B., Barbosa, J.B., Leal Martins, M.L. 2015. Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp: SMIA-2 and its detergent compatibility. *Electronic Journal of Biotechnology*, **18**(2), 110-115.
- [146] Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, **227**(5259), 680-685.
- [147] Laskin, A.I., Bennett, J.W., Gadd, G.M. 2003. *Advances in applied microbiology*. Academic Press.
- [148] Laufenberg, G., Kunz, B., Nystroem, M. 2003. Transformation of vegetable waste into value added products::(A) the upgrading concept;(B) practical implementations. *Bioresource Technology*, **87**(2), 167-198.
- [149] Lawson, C.L., van Montfort, R., Strokopytov, B., Rozeboom, H.J., Kalk, K.H., de Vries, G.E., Penninga, D., Dijkhuizen, L., Dijkstra, B.W. 1994. Nucleotide sequence and X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 in a maltose-dependent crystal form. *Journal of molecular biology*, **236**(2), 590-600.
- [150] Lazić, V., Radoičić, M., Šaponjić, Z., Radetić, T., Vodnik, V., Nikolić, S., Dimitrijević, S., Radetić, M. 2015. Negative influence of Ag and TiO<sub>2</sub> nanoparticles on biodegradation of cotton fabrics. *Cellulose*, **22**(2), 1365-1378.
- [151] Lazic, Z.R. 2006. *Design of experiments in chemical engineering: a practical guide*. John Wiley & Sons.
- [152] Lee, S., Kim, Y., Ji, G. 1997. Note: purification of amylase secreted from *Bifidobacterium adolescentis*. *Journal of applied microbiology*, **83**(3), 267-272.
- [153] Lee, Y.-J., Kim, B.-K., Lee, B.-H., Jo, K.-I., Lee, N.-K., Chung, C.-H., Lee, Y.-C., Lee, J.-W. 2008. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. *Bioresource Technology*, **99**(2), 378-386.
- [154] Li, A.-X., Guo, L.-Z., Lu, W.-D. 2012. Alkaline inulinase production by a newly isolated bacterium *Marinimicrobium* sp. LS-A18 and inulin hydrolysis by the enzyme. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **28**(1), 81-89.

- [155] Li, W., Zhang, W.-W., Yang, M.-M., Chen, Y.-L. 2008. Cloning of the thermostable cellulase gene from newly isolated *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*. *Molecular biotechnology*, **40**(2), 195-201.
- [156] Li, X., Yu, H.-Y. 2011. Extracellular production of beta-amylase by a halophilic isolate, *Halobacillus* sp. LY9. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, **38**(11), 1837-1843.
- [157] Liang, Y.-L., Zhang, Z., Wu, M., Wu, Y., Feng, J.-X. 2014. Isolation, Screening, and Identification of Cellulolytic Bacteria from Natural Reserves in the Subtropical Region of China and Optimization of Cellulase Production by *Paenibacillus terrae* ME27-1. *BioMed research international*, **2014**.
- [158] Liang, Y., Yesuf, J., Schmitt, S., Bender, K., Bozzola, J. 2009. Study of cellulases from a newly isolated thermophilic and cellulolytic *Brevibacillus* sp. strain JXL. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, **36**(7), 961-970.
- [159] Limón, M.C., Margolles-Clark, E., Benítez, T., Penttilä, M. 2001. Addition of substrate-binding domains increases substrate-binding capacity and specific activity of a chitinase from *Trichoderma harzianum*. *FEMS microbiology letters*, **198**(1), 57-63.
- [160] Lisdiyanti, P., Suyanto, E., Gusmawati, N., Rahayu, W. 2012. Isolation and characterization of cellulase produced by cellulolytic bacteria from peat soil of Ogan Komering Ilir, South Sumatera. *Int J Environ Bioenergy*, **3**, 145-153.
- [161] Liu, J., Cai, Y., Liao, X., Huang, Q., Hao, Z., Hu, M., Zhang, D., Li, Z. 2013. Efficiency of laccase production in a 65-L air-lift reactor for potential green industrial and environmental application. *Journal of Cleaner Production*, **39**, 154-160.
- [162] Liu, J., Yang, J. 2007. Cellulase production by *Trichoderma koningii* AS3. 4262 in solid-state fermentation using lignocellulosic waste from the vinegar industry. *Food Technology and Biotechnology*, **45**(4), 420-425.
- [163] Lorenzo, M., Moldes, D., Couto, S.R., Sanroman, A. 2002. Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*. *Bioresource Technology*, **82**(2), 109-113.

- [164] Lynd, L.R., Van Zyl, W.H., McBride, J.E., Laser, M. 2005. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current opinion in biotechnology*, **16**(5), 577-583.
- [165] Lynd, L.R., Weimer, P.J., Van Zyl, W.H., Pretorius, I.S. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*, **66**(3), 506-577.
- [166] Maki, M., Leung, K.T., Qin, W. 2009. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *International Journal of Biological Sciences*, **5**(5), 500.
- [167] Makky, E. 2009. Avicelase Production by a Thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* isolated from Soil using Sugarcane Bagasse. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, **57**, 87-92.
- [168] Mallonee, D., Speckman, R. 1988. Development of a mutant strain of *Bacillus polymyxa* showing enhanced production of 2, 3-butanediol. *Applied and environmental microbiology*, **54**(1), 168-171.
- [169] Mandels, M., Reese, E.T. 1960. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *Journal of Bacteriology*, **79**(6), 816.
- [170] Marchessault, R., Howsmon, J. 1957. Experimental evaluation of the lateral-order distribution in cellulose. *Textile Research Journal*, **27**(1), 30-41.
- [171] Martins, S.C.S., Martins, C.M., Fiúza, L., Santaella, S.T. 2013. Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater. *Afr. J. Biotechnol*, **12**, 4412-4418.
- [172] Marwoto, B., Nakashimada, Y., Kakizono, T., Nishio, N. 2002. Enhancement of (R, R)-2, 3-butanediol production from xylose by *Paenibacillus polymyxa* at elevated temperatures. *Biotechnology letters*, **24**(2), 109-114.
- [173] Mavingui, P., Heulin, T. 1994. In vitro chitinase and antifungal activity of a soil, rhizosphere and rhizoplane population of *Bacillus polymyxa*. *Soil Biology and Biochemistry*, **26**(6), 801-803.
- [174] Mihajlovski, K.R., Carević, M.B., Dević, M.L., Šiler-Marinković, S., Rajilić-Stojanović, M.D., Dimitrijević-Branković, S. 2015a. Lignocellulosic waste material as substrate for Avicelase production by a new strain of *Paenibacillus*

- chitinolyticus* CKS1. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **104**, 426-434.
- [175] Mihajlovski, K.R., Radovanovic, N.R., Miljkovic, M.G., Siler-Marinkovic, S., Rajilic-Stojanovic, M.D., Dimitrijevic-Brankovic, S.I. 2015b. [small beta]-Amylase production from packaging-industry wastewater using a novel strain *Paenibacillus chitinolyticus* CKS 1. *RSC Advances*, **5**(110), 90895-90903.
- [176] Mihajlovski, K.R., Radovanović, N.R., Veljović, Đ.N., Šiler-Marinković, S.S., Dimitrijević-Branković, S.I. 2016. Improved  $\beta$ -amylase production on molasses and sugar beet pulp by a novel strain *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1. *Industrial Crops and Products*, **80**, 115-122.
- [177] Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, **31**(3), 426-428.
- [178] Milutinović, M., Radovanović, N., Čorović, M., Šiler-Marinković, S., Rajilić-Stojanović, M., Dimitrijević-Branković, S. 2015. Optimisation of microwave-assisted extraction parameters for antioxidants from waste *Achillea millefolium* dust. *Industrial Crops and Products*, **77**, 333-341.
- [179] Milutinović, M., Radovanović, N., Rajilić-Stojanović, M., Šiler-Marinković, S., Dimitrijević, S., Dimitrijević-Branković, S. 2014. Microwave-assisted extraction for the recovery of antioxidants from waste *Equisetum arvense*. *Industrial Crops and Products*, **61**, 388-397.
- [180] Minussi, R.C., Pastore, G.M., Durán, N. 2002. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, **13**(6), 205-216.
- [181] Mitidieri, S., Martinelli, A.H.S., Schrank, A., Vainstein, M.H. 2006. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations. *Bioresource technology*, **97**(10), 1217-1224.
- [182] Mnif, I., Ellouze-Chaabouni, S., Ghribi, D. 2013. Optimization of inocula conditions for enhanced biosurfactant production by *Bacillus subtilis* SPB1, in submerged culture, using Box–Behnken design. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, **5**(2), 92-98.
- [183] Moftah, O.A.S., Grbavčić, S., Žuža, M., Luković, N., Bezbradica, D., Knežević-Jugović, Z. 2012. Adding value to the oil cake as a waste from oil processing

- industry: production of lipase and protease by *Candida utilis* in solid state fermentation. *Applied biochemistry and biotechnology*, **166**(2), 348-364.
- [184] Mojović, L., Nikolić, S., Pejin, D., Pejin, J., Djukić-Vuković, A., Kocić-Tanackov, S., Semenčenko, V. 2011. The potential for sustainable bioethanol production in Serbia: available biomass and new production approaches.
- [185] Montgomery, D.C. 2008. *Design and analysis of experiments*. John Wiley & Sons.
- [186] Moosavi-Nasab, M., Majdi-Nasab, M. 2008. Cellulase Production by *Trichoderma reesei* using Sugar Beet Pulp. *Iran Agricultural Research*, **25**(1.2), 107-116.
- [187] Moretti, M., Bocchini-Martins, D.A., Silva, R.D., Rodrigues, A., Sette, L.D., Gomes, E. 2012. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, **43**(3), 1062-1071.
- [188] Morikawa, Y., Ohashi, T., Mantani, O., Okada, H. 1995. Cellulase induction by lactose in *Trichoderma reesei* PC-3-7. *Applied microbiology and biotechnology*, **44**(1-2), 106-111.
- [189] Mørkeberg, R., Carlsen, M., Nielsen, J. 1995. Induction and repression of  $\alpha$ -amylase production in batch and continuous cultures of *Aspergillus oryzae*. *Microbiology*, **141**(10), 2449-2454.
- [190] Mosier, N.S., Hall, P., Ladisch, C.M., Ladisch, M.R. 1999. Reaction kinetics, molecular action, and mechanisms of cellulolytic proteins. in: *Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics*, Springer, pp. 23-40.
- [191] Murthy, P.S., Madhava Naidu, M., Srinivas, P. 2009. Production of  $\alpha$ -amylase under solid-state fermentation utilizing coffee waste. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **84**(8), 1246-1249.
- [192] Mussatto, S.I., Teixeira, J.A., Ballesteros, L.F., Martins, S. 2012. *Use of agro-industrial wastes in solid-state fermentation processes*. INTECH Open Access Publisher.
- [193] Naidu, M. 2013. Bacterial Amylase A Review. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive*, **4**(2), 274-287.

- [194] Nair, A.T., Ahammed, M.M. 2013. The reuse of water treatment sludge as a coagulant for post-treatment of UASB reactor treating urban wastewater. *Journal of Cleaner Production*.
- [195] Newman, R.K., Newman, C.W. 2008. *Barley for food and health: Science, technology, and products*. John Wiley & Sons.
- [196] Nguyen, Q.D., Rezessy-Szabó, J.M., Claeysens, M., Stals, I., Hoschke, Á. 2002. Purification and characterisation of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. *Enzyme and Microbial Technology*, **31**(3), 345-352.
- [197] Niranjane, A.P., Madhou, P., Stevenson, T.W. 2007. The effect of carbohydrate carbon sources on the production of cellulase by *Phlebia gigantea*. *Enzyme and Microbial Technology*, **40**(6), 1464-1468.
- [198] Nishida, Y., Suzuki, K.-i., Kumagai, Y., Tanaka, H., Inoue, A., Ojima, T. 2007. Isolation and primary structure of a cellulase from the Japanese sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. *Biochimie*, **89**(8), 1002-1011.
- [199] Nwe, N., Stevens, W.F. 2004. Effect of urea on fungal chitosan production in solid substrate fermentation. *Process Biochemistry*, **39**(11), 1639-1642.
- [200] Odibo, F., Okafor, N., Tom, M., Oyeka, C. 1992. Purification and Characterization of a  $\beta$ -Amylase of *Hendersonula toruloidea*. *Starch-Stärke*, **44**(5), 192-195.
- [201] Ogawa, A., Suzumatsu, A., Takizawa, S., Kubota, H., Sawada, K., Hakamada, Y., Kawai, S., Kobayashi, T., Ito, S. 2007. Endoglucanases from *Paenibacillus* spp. form a new clan in glycoside hydrolase family 5. *Journal of biotechnology*, **129**(3), 406-414.
- [202] Ögel, Z., Yarangümel, K., Dündar, H., Ifrij, I. 2001. Submerged cultivation of *Scytalidium thermophilum* on complex lignocellulosic biomass for endoglucanase production. *Enzyme and microbial technology*, **28**(7), 689-695.
- [203] Oliveira, L.R.C., Barbosa, J.B., Martins, M.L.L., Martins, M.A. 2014. Extracellular production of avicelase by the thermophilic soil bacterium *Bacillus* sp. SMIA-2. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, **36**(2), 215-222.
- [204] Olmos, J.C., Hansen, M.Z. 2012. Enzymatic depolymerization of sugar beet pulp: Production and characterization of pectin and pectic-oligosaccharides as a

- potential source for functional carbohydrates. *Chemical Engineering Journal*, **192**, 29-36.
- [205] Olsen, H.S., Falholt, P. 1998. The role of enzymes in modern detergency. *Journal of Surfactants and Detergents*, **1**(4), 555-567.
- [206] Olsson, L., Christensen, T.M., Hansen, K.P., Palmqvist, E.A. 2003. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme and Microbial Technology*, **33**(5), 612-619.
- [207] Olufunke, F.-O.T., Azeez, I.I. 2012. Purification and characterization of beta-amylase of *Bacillus subtilis* isolated from Kolanut Weevil. *Journal of Biology and Life Science*, **4**(1).
- [208] Ong, L., Abd-Aziz, S., Noraini, S., Karim, M., Hassan, M. 2004. Enzyme production and profile by *Aspergillus niger* during solid substrate fermentation using palm kernel cake as substrate. *Applied biochemistry and biotechnology*, **118**(1-3), 73-79.
- [209] Pakdeedachakiat, W., Leelavatcharamas, V., Piyatheerawong, W. 2008. Effect of lignocellulosic waste on xylanase and cellulase induction in *Paenibacillus curdlanolyticus* B6. *Thai J. Biotechnol*, **8**, 10-14.
- [210] Pandey, A. 1992. Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, **27**(2), 109-117.
- [211] Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C., Soccol, V., Singh, D., Mohan, R. 2000a. Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*(31 (Pt 2)), 135-52.
- [212] Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R., Nigam, P. 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current science*, **77**(1), 149-162.
- [213] Pandey, A., Soccol, C.R., Mitchell, D. 2000b. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, **35**(10), 1153-1169.
- [214] Park, H.-N., Yoo, J.-C., Yang, Y.-K. 1995. Purification and Characterization of  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus* sp. JP-1. *The Journal of Microbiology*, **33**(1), 80-84.



- [215] Pason, P., Kyu, K.L., Ratanakhanokchai, K. 2006. *Paenibacillus curdolanolyticus* strain B-6 xylanolytic-cellulolytic enzyme system that degrades insoluble polysaccharides. *Applied and environmental microbiology*, **72**(4), 2483-2490.
- [216] Pastor, F., Pujol, X., Blanco, A., Vidal, T., Torres, A., Diaz, P. 2001. Molecular cloning and characterization of a multidomain endoglucanase from *Paenibacillus* sp BP-23: evaluation of its performance in pulp refining. *Applied microbiology and biotechnology*, **55**(1), 61-68.
- [217] Paul, J., Varma, A. 1990. Influence of sugars on endoglucanase and  $\beta$ -xylanase activities of a *Bacillus* strain. *Biotechnology letters*, **12**(1), 61-64.
- [218] Pérez, J., Munoz-Dorado, J., de la Rubia, T., Martinez, J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, **5**(2), 53-63.
- [219] Pervez, S., Aman, A., Iqbal, S., Siddiqui, N.N., Qader, S.A.U. 2014. Saccharification and liquefaction of cassava starch: an alternative source for the production of bioethanol using amylolytic enzymes by double fermentation process. *BMC biotechnology*, **14**(1), 49.
- [220] Pettersson, B., Rippere, K.E., Yousten, A.A., Priest, F.G. 1999. Transfer of *Bacillus lentimorbus* and *Bacillus popilliae* to the genus *Paenibacillus* with emended descriptions of *Paenibacillus lentimorbus* comb. nov. and *Paenibacillus popilliae* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **49**(2), 531-540.
- [221] Piuri, M., Sanchez-Rivas, C., Ruzal, S. 1998. A novel antimicrobial activity of a *Paenibacillus polymyxa* strain isolated from regional fermented sausages. *Letters in applied microbiology*, **27**(1), 9-13.
- [222] Prakash, O., Jaiswal, N. 2010.  $\alpha$ -Amylase: an ideal representative of thermostable enzymes. *Applied biochemistry and biotechnology*, **160**(8), 2401-2414.
- [223] Qaisar, S., Zohra, R.R., Aman, A., Qader, S.A.U. 2014. Enhanced production of cellulose degrading CMCase by newly isolated strain of *Aspergillus versicolor*. *Carbohydrate polymers*, **104**, 199-203.
- [224] Quiroz-Castañeda, R.E., Folch-Mallol, J.L. 2013. Hydrolysis of biomass mediated by cellulases for the production of sugars. *Sustainable degradation of*

*lignocellulosic biomass—Techniques, applications and commercialization*; Chandel AK, da Silva SS, Eds, 275.

- [225] Raddadi, N., Cherif, A., Daffonchio, D., Fava, F. 2013. Halo-alkalitolerant and thermostable cellulases with improved tolerance to ionic liquids and organic solvents from *Paenibacillus tarimensis* isolated from the Chott El Fejej, Sahara desert, Tunisia. *Bioresource technology*, **150**, 121-128.
- [226] Rajaram, S., Varma, A. 1990. Production and characterization of xylanase from *Bacillus thermoalkalophilus* grown on agricultural wastes. *Applied microbiology and biotechnology*, **34**(1), 141-144.
- [227] Ranic, M., Nikolic, M., Pavlovic, M., Buntic, A., Siler-Marinkovic, S., Dimitrijevic-Brankovic, S. 2014. Optimization of microwave-assisted extraction of natural antioxidants from spent espresso coffee grounds by response surface methodology. *Journal of Cleaner Production*, **80**, 69-79.
- [228] Rao, D., Swamy, A., SivaRamaKrishna, G. 2007. Bioprocess technology strategies, production and purification of amylases: An overview. *The Internet J. Genomics and Proteomics TM ISSN*, 1540-2630.
- [229] Rastogi, G., Bhalla, A., Adhikari, A., Bischoff, K.M., Hughes, S.R., Christopher, L.P., Sani, R.K. 2010. Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. *Bioresource technology*, **101**(22), 8798-8806.
- [230] Ray, A., Bairagi, A., Ghosh, K.S., Sen, S. 2007. Optimization of fermentation conditions for cellulase production by *Bacillus subtilis* CY5 and *Bacillus circulans* TP3 isolated from fish gut. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, **1**(37), 47-53.
- [231] Ray, R.R., Chakraverty, R. 1998. Extracellular  $\beta$ -amylase from *Syncephalastrum racemosum*. *Mycological research*, **102**(12), 1563-1567.
- [232] RAY, R.R., JANA, S.C., Nanda, G. 1997. Production Of Beta-Amylase From Starchy Wastes By A Hyperamylolytic Mutant Of *Bacillus Megaterium*. *Indian journal of experimental biology*, **35**(3), 285-288.
- [233] Reczey, K., Szengyel, Z., Eklund, R., Zacchi, G. 1996. Cellulase production by *T. reesei*. *Bioresource Technology*, **57**(1), 25-30.
- [234] Reddy, L., Wee, Y.-J., Yun, J.-S., Ryu, H.-W. 2008. Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through

- Plackett–Burman and response surface methodological approaches. *Bioresource technology*, **99**(7), 2242-2249.
- [235] Reddy, P.R.M., Swamy, M., Seenayya, G. 1997. Purification and characterization of thermostable  $\beta$ -amylase and pullulanase from high-yielding *Clostridium thermosulfurogenes* SV2. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **14**(1), 89-94.
- [236] Rezic, T.I., Markovic, I., Ludwig, R. 2013. Integrated hydrolyzation and fermentation of sugar beet pulp to bioethanol. *Journal of microbiology and biotechnology*, **23**(9), 1244-1252.
- [237] Romero, M., Aguado, J., González, L., Ladero, M. 1999. Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw. *Enzyme and Microbial Technology*, **25**(3), 244-250.
- [238] Rosado, A., Seldin, L. 1993. Production of a potentially novel anti-microbial substance by *Bacillus polymyxa*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **9**(5), 521-528.
- [239] Roy, J.K., Mukherjee, A.K. 2013. Applications of a high maltose forming, thermo-stable  $\alpha$ -amylase from an extremely alkalophilic *Bacillus licheniformis* strain AS08E in food and laundry detergent industries. *Biochemical Engineering Journal*, **77**, 220-230.
- [240] Rubin, E.M. 2008. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, **454**(7206), 841-845.
- [241] Ryan, S.M., Fitzgerald, G.F., van Sinderen, D. 2006. Screening for and identification of starch-, amylopectin-, and pullulan-degrading activities in bifidobacterial strains. *Applied and environmental microbiology*, **72**(8), 5289-5296.
- [242] Sadhu, S., Saha, P., Sen, S.K., Mayilraj, S., Maiti, T.K. 2013. Production, purification and characterization of a novel thermotolerant endoglucanase (CMCase) from *Bacillus* strain isolated from cow dung. *SpringerPlus*, **2**(1), 1-10.
- [243] Sakiyama, C., Paula, E., Pereira, P., Borges, A., Silva, D. 2001. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. *Letters in applied microbiology*, **33**(2), 117-121.

- [244] Sanchez, O.J., Cardona, C.A. 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource technology*, **99**(13), 5270-5295.
- [245] Saxena, R., Singh, R. 2014. Contemporaneous Production of Amylase and Protease through CCD Response Surface Methodology by Newly Isolated *Bacillus megaterium* Strain B69. *Enzyme research*, **2014**, 1-12.
- [246] Saxena, R.K., Dutt, K., Agarwal, L., Nayyar, P. 2007. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. *Bioresource Technology*, **98**(2), 260-265.
- [247] Saxena, R.K., Malhotra, B., Batra, A. 2003. Commercial importance of some fungal enzymes. *Handbook of fungal biotechnology*. New York: Marcel Dekker, 287-95.
- [248] Schülein, M. 2000. Protein engineering of cellulases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1543**(2), 239-252.
- [249] Shaktimay, K., Datta, T.K., Ray, R.C. 2010. Optimization of thermostable  $\alpha$ -amylase production by *Streptomyces erumpens* MTCC 7317 in solid-state fermentation using cassava fibrous residue. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **53**(2), 301-309.
- [250] Sharan, A., Darmwal, N.S. 2007. Improved production of alkaline protease from a mutant of alkalophilic *Bacillus pantotheneticus* using molasses as a substrate. *Bioresource technology*, **98**(4), 881-885.
- [251] Sharma, N., Mahajan, S., Sharma, N. 2013. Evaluation of different pretreatments versus forest wood waste and its selection as a solid substrate for enhanced cellulase production by *Paenibacillus mucilaginous* B5. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*, **4**(2), 226-236.
- [252] Sharma, P., Rao, K.H., Forssberg, K., Natarajan, K. 2001. Surface chemical characterisation of *Paenibacillus polymyxa* before and after adaptation to sulfide minerals. *International journal of mineral processing*, **62**(1), 3-25.
- [253] Shen, G., Saha, B., Lee, Y., Bhatnagar, L., Zeikus, J. 1988. Purification and characterization of a novel thermostable beta-amylase from *Clostridium thermosulphurogenes*. *Biochem. J*, **254**, 835-840.

- [254] Shinoda, S., Kanamasa, S., Arai, M. 2012. Cloning of an endoglycanase gene from *Paenibacillus cookii* and characterization of the recombinant enzyme. *Biotechnology letters*, **34**(2), 281-286.
- [255] Siggins, K. 1987. Molecular cloning and characterization of the beta-amylase gene from *Bacillus circulans*. *Molecular microbiology*, **1**(3), 86-91.
- [256] Singh, A., Kuhad, R.C., Ward, O.P. 2007. Industrial application of microbial cellulases. *Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects*, 345-358.
- [257] Singh, J., Batra, N., Sobti, R. 2001. A highly thermostable, alkaline CMCase produced by a newly isolated *Bacillus* sp. VG1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **17**(8), 761-765.
- [258] Singhania, R.R., Patel, A.K., Soccol, C.R., Pandey, A. 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, **44**(1), 13-18.
- [259] Singhania, R.R., Sukumaran, R.K., Patel, A.K., Larroche, C., Pandey, A. 2010. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, **46**(7), 541-549.
- [260] Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K.M., Soccol, C.R., Pandey, A. 2006.  $\alpha$ -Amylases from microbial sources—an overview on recent developments. *Food Technol Biotechnol*, **44**(2), 173-184.
- [261] Šljivić-Ivanović, M.Z., Smičiklas, I.D., Marković, J.P., Milenković, A.S. 2013. Analiza faktora koji utiču na sorpciju Cu (II) jona klinoptilolitom. *Chemical Industry/Hemijska Industrija*, **67**(5), 739-745.
- [262] Sohn, C.B., Lee, S.M., Kim, M.H., Ko, J.H., Kim, K.S., Chang, J.E., Ahn, Y.K., Kim, C.H. 1996. Purification and Characterization of  $\beta$ -amylase from *Bacillus polymyxa* No. 26-1. *Journal of food science*, **61**(1), 230-234.
- [263] Souza, P.M.d. 2010. Application of microbial  $\alpha$ -amylase in industry-A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, **41**(4), 850-861.
- [264] Spina, F., Cordero, C., Schilirò, T., Sgorbini, B., Pignata, C., Gilli, G., Bicchi, C., Varese, G.C. 2015. Removal of micropollutants by fungal laccases in model solution and municipal wastewater: evaluation of estrogenic activity and ecotoxicity. *Journal of Cleaner Production*, **100**, 185-194.

- [265] Sreenath, H.K., Shah, A.B., Yang, V.W., Gharia, M.M., Jeffries, T.W. 1996. Enzymatic polishing of jute/cotton blended fabrics. *Journal of fermentation and bioengineering*, **81**(1), 18-20.
- [266] Stewart, B.J., Leatherwood, J. 1976. Derepressed synthesis of cellulase by *Cellulomonas*. *Journal of bacteriology*, **128**(2), 609-615.
- [267] Strokopytov, B., Knegtel, R.M., Penninga, D., Rozeboom, H.J., Kalk, K.H., Dijkhuizen, L., Dijkstra, B.W. 1996. Structure of cyclodextrin glycosyltransferase complexed with a maltononaose inhibitor at 2.6 Å resolution. Implications for product specificity. *Biochemistry*, **35**(13), 4241-4249.
- [268] Suganthi, C., Mageswari, A., Karthikeyan, S., Anbalagan, M., Sivakumar, A., Gothandam, K. 2013. Screening and optimization of protease production from a halotolerant *Bacillus licheniformis* isolated from saltern sediments. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, **11**(1), 47-52.
- [269] Sukumaran, R.K., Singhanian, R.R., Pandey, A. 2005. Microbial cellulases-production, applications and challenges. *Journal of Scientific and Industrial Research*, **64**(11), 832.
- [270] Sun, R., Hughes, S. 1998. Fractional extraction and physico-chemical characterization of hemicelluloses and cellulose from sugar beet pulp. *Carbohydrate polymers*, **36**(4), 293-299.
- [271] Sundarram, A., Murthy, T.P.K. 2014.  $\alpha$ -Amylase Production and Applications: A Review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, **2**(4), 166-175.
- [272] Šušić S., G.E. 1965. *Osnovi tehnologije šećera*. Naučna knjiga, Beograd.
- [273] Šušić S., P.S., Kukić G., Sinobad V., Perunović P., Koronovac B., Bašić Dj. 1995. *Osnovi tehnologije šećera II*. Jugošećer, Beograd.
- [274] Šušić S., P.S., Kukić G., Sinobad V., Perunović P., Koronovac B., Bašić Dj. . 1994. *Osnovi tehnologije šećera I*. Jugošećer, Beograd.
- [275] Suurnäkki, A., Tenkanen, M., Siika-Aho, M., Niku-Paavola, M.-L., Viikari, L., Buchert, J. 2000. *Trichoderma reesei* cellulases and their core domains in the hydrolysis and modification of chemical pulp. *Cellulose*, **7**(2), 189-209.
- [276] Szijártó, N., Faigl, Z., Réczey, K., Mézes, M., Bersényi, A. 2004. Cellulase fermentation on a novel substrate (waste cardboard) and subsequent utilization

- of home-produced cellulase and commercial amylase in a rabbit feeding trial. *Industrial Crops and Products*, **20**(1), 49-57.
- [277] Tanguler, H., Erten, H. 2009. The effect of different temperatures on autolysis of baker's yeast for the production of yeast extract. *Turk J Agric For*, **33**, 149-54.
- [278] Tanyildizi, M.S., Özer, D., Elibol, M. 2005. Optimization of  $\alpha$ -amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology. *Process Biochemistry*, **40**(7), 2291-2296.
- [279] Tcherpakov, M., Ben-Jacob, E., Gutnick, D.L. 1999. *Paenibacillus dendritiformis* sp. nov., proposal for a new pattern-forming species and its localization within a phylogenetic cluster. *International journal of systematic bacteriology*, **49**(1), 239-246.
- [280] Teeri, T.T. 1997. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends in Biotechnology*, **15**(5), 160-167.
- [281] Thompson, D. 2000. On the non-random nature of amylopectin branching. *Carbohydrate Polymers*, **43**(3), 223-239.
- [282] Tomšič, B., Klemenčič, D., Simončič, B., Orel, B. 2011. Influence of antimicrobial finishes on the biodeterioration of cotton and cotton/polyester fabrics: leaching versus bio-barrier formation. *Polymer Degradation and Stability*, **96**(7), 1286-1296.
- [283] Tonkova, A., Ivanova, V., Dobрева, E., Stefanova, M., Spasova, D. 1994. Thermostable  $\alpha$ -amylase production by immobilized *Bacillus licheniformis* cells in agar gel and on acrylonitrile/acrylamide membranes. *Applied microbiology and biotechnology*, **41**(5), 517-522.
- [284] Trivedi, N., Gupta, V., Kumar, M., Kumari, P., Reddy, C., Jha, B. 2011. An alkali-halotolerant cellulase from *Bacillus flexus* isolated from green seaweed *Ulva lactuca*. *Carbohydrate Polymers*, **83**(2), 891-897.
- [285] Tsusaki, K., Watanabe, H., Yamamoto, T., Nishimoto, T., Chaen, H., Fukuda, S. 2012. Purification and Characterization of Highly Branched  $\alpha$ -Glucan-Producing Enzymes from *Paenibacillus* sp. PP710. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **76**(4), 721-731.

- [286] Tubesha, Z., Al-Delaimy, K. 2003. Rennin-like milk coagulant enzyme produced by a local isolate of *Mucor*. *International journal of dairy technology*, **56**(4), 237-241.
- [287] Uguru, G., Robb, D., Akinyanju, J., Sani, A. 1997. Purification, characterisation and mutagenic enhancement of a thermoactive  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **19**(4), 273-279.
- [288] Ukrainczyk, M. 2010. Planiranje pokusa u industriji. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, **5**(3-4), 96-105.
- [289] Van Den Broeck, H.C., De Graaff, L.H., Visser, J., Van Ooijen, A.J. 2001. Fungal cellulases, Google Patents, WO 1997013862 A1.
- [290] Van Der Maarel, M.J., Van Der Veen, B., Uitdehaag, J.C., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *Journal of biotechnology*, **94**(2), 137-155.
- [291] Vasanthakumari, R. 2009. Practical Microbiology, BI publications, New Delhi (140 pp.).
- [292] Vintila, T., Dragomirescu, M., Jurcoane, S., Vintila, D., Caprita, R., Maniu, M. 2009. Production of cellulase by submerged and solid-state cultures and yeasts selection for conversion of lignocellulose to ethanol. *Romanian Biotechnological Letters*, **14**(2), 4275-4281.
- [293] Vučurović, V.M., Razmovski, R.N. 2012a. Ethanol fermentation of molasses by *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized onto sugar beet pulp. *Acta periodica technologica*(43), 325-333.
- [294] Vučurović, V.M., Razmovski, R.N. 2012b. Sugar beet pulp as support for *Saccharomyces cerevisiae* immobilization in bioethanol production. *Industrial Crops and Products*, **39**, 128-134.
- [295] Vučurović, V.M., Razmovski, R.N., Tekić, M.N. 2012. Methylene blue (cationic dye) adsorption onto sugar beet pulp: equilibrium isotherm and kinetic studies. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, **43**(1), 108-111.
- [296] Vujčić, Z. 2002. *Ekperimentalna biohemija, Praktikum*. Rantek.
- [297] Waeonukul, R., Kyu, K.L., Sakka, K., Ratanakhanokchai, K. 2008. Effect of carbon sources on the induction of xylanolytic-cellulolytic multienzyme



- complexes in *Paenibacillus curdlanolyticus* strain B-6. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **72**(2), 321-328.
- [298] Waeonukul, R., Kyu, K.L., Sakka, K., Ratanakhanokchai, K. 2009. Isolation and characterization of a multienzyme complex (cellulosome) of the *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6 grown on Avicel under aerobic conditions. *Journal of bioscience and bioengineering*, **107**(6), 610-614.
- [299] Wang, C.M., Shyu, C.L., Ho, S.P., Chiou, S.H. 2008. Characterization of a novel thermophilic, cellulose-degrading bacterium *Paenibacillus* sp. strain B39. *Letters in applied microbiology*, **47**(1), 46-53.
- [300] Wang, L.-S., Liu, J., Zhang, Y.-Z., Zhao, Y., Gao, P.-J. 2003. Comparison of domains function between cellobiohydrolase I and endoglucanase I from *Trichoderma pseudokoningii* S-38 by limited proteolysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **24**, 27-38.
- [301] Wang, R., Domínguez-Espinosa, R.M., Leonard, K., Koutinas, A., Webb, C. 2002. The application of a generic feedstock from wheat for microbial fermentations. *Biotechnology progress*, **18**(5), 1033-1038.
- [302] Wen, Z., Liao, W., Chen, S. 2005. Production of cellulase/ $\beta$ -glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. *Process Biochemistry*, **40**(9), 3087-3094.
- [303] Wolfenden, R., Snider, M.J. 2001. The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts. *Accounts of chemical research*, **34**(12), 938-945.
- [304] [www.amano-enzyme.co.jp/pdf/wave\\_e/voll13/voll13e\\_p1.pdf](http://www.amano-enzyme.co.jp/pdf/wave_e/voll13/voll13e_p1.pdf).
- [305] Xin, Z., Yinbo, Q., Peiji, G. 1993. Acceleration of ethanol production from paper mill waste fiber by supplementation with  $\beta$ -glucosidase. *Enzyme and Microbial Technology*, **15**(1), 62-65.
- [306] Yang, M., 2015. 2015. The use of lignocellulosic biomass for fermentative butanol production in biorefining processes, Doctoral Dissertation, 2015.
- [307] Yang, S.-S., Wang, J.-Y. 1999. Protease and amylase production of *Streptomyces rimosus* in submerged and solid state cultivations. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, **40**.
- [308] Yang, S.-T. 2011. *Bioprocessing for value-added products from renewable resources: new technologies and applications*. Elsevier.

- [309] Zeikus, J.G., Hyun, H.H. 1987. Thermostable beta-amylase, Google Patents, US 4647538 A.
- [310] Zhang, Y.-H.P., Himmel, M.E., Mielenz, J.R. 2006. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology advances*, **24**(5), 452-481.
- [311] Zhang, Y.-H.P., Lynd, L.R. 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and bioengineering*, **88**(7), 797-824.
- [312] Zhbakov, R. 1992. Hydrogen bonds and structure of carbohydrates. *Journal of molecular structure*, **270**, 523-539.

## PRILOG 1

### Gel za razdvajanje – 10% AA (poliakrilamidni) gel:

4,7 mL H<sub>2</sub>O

6,25 mL 30% AA

3,75 mL 1,5M Tris

0,15 mL 10% SDS

0,3 mL 10% APS

0,012 mL TEMED

### Gel za koncentrovanje – 4% AA gel:

3,07 mL H<sub>2</sub>O

0,83 mL 30% AA

1,25 mL 0,5M Tris

50 µl 10% SDS

100 µl 10% APS

5 µl TEMED

### 10% APS:

0,1 g APS rastvoriti u 1 mL destilovane H<sub>2</sub>O,

### 30% AA:

Akrilamid 29,2 g

Bis-akrilamid 0,8g

dopuniti do 100 mL destilovanom H<sub>2</sub>O

### 1,5M Tris pH 8,8:

18,7 g Tris

0,4 g SDS

dopuniti do 100 mL destilovanom H<sub>2</sub>O (pH podešavati sa čistom HCl),

### 0,5M Tris pH 6,8:

6,06 g Tris

0,4 g SDS

dopuniti do 100 mL destilovanom H<sub>2</sub>O (pH podešavati sa čistom HCl),

### Tank pufer- pufer za elektorforezu pH 8,3:

Tris 3g

Glicin 14,4 g  
SDS 1g  
dopuniti do 1000 mL destilovanom H<sub>2</sub>O,

Pufer za rastvaranje uzorka:

0,5 M Tris pH 6,8 2,5 mL  
10% SDS 4,0 mL  
glycerol 2,0 mL  
 $\beta$ -merkaptoetanol 1,0 mL  
0,1% bromfenol plavo 0,5 mL

dopuniti do 10 mL destilovanom H<sub>2</sub>O,

Rastvor za fiksiranje:

40% methanol 500mL  
10% sirćetna kiselina 100mL  
dopuniti do 1000 mL destilovanom H<sub>2</sub>O,

Rastvor za bojenje:

Coomasie blue R-250 1,0 g  
40% methanol 100mL  
10% sirćetna kiselina 100mL  
etilen-glikol 30 mL  
dopuniti do 1000 mL destilovanom H<sub>2</sub>O,

Rastvor za obezbojavanje:

40% methanol 250mL  
10% sirćetna kiselina 100 mL  
etilen-glikol 30 mL  
dopuniti do 1000 mL destilovanom H<sub>2</sub>O,

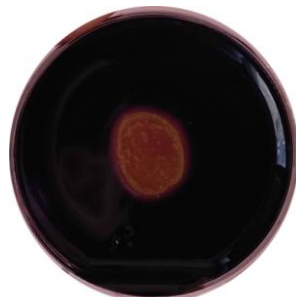
## PRILOG 2



Slika P2-1. Prikaz hidrolize celuloze odnosno pojave bistre zone oko kolonije *P. chitinolyticus* CKS1 tokom rasta na CMC-agarnoj ploči

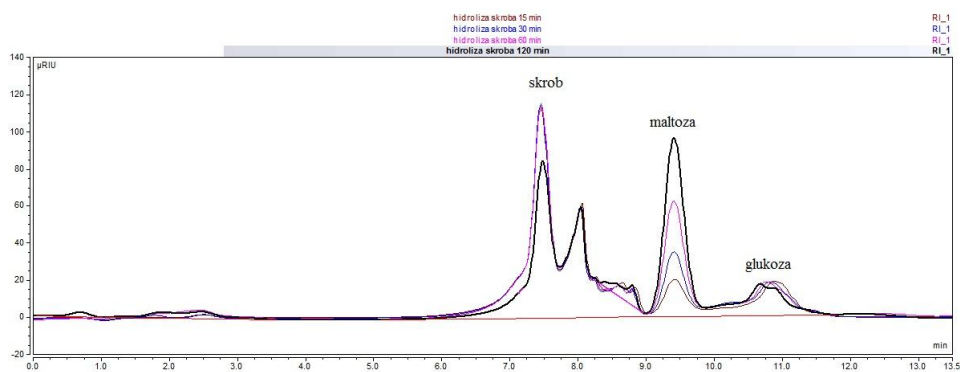


Slika P2-2. Prikaz hidrolize skroba odnosno pojave bistre zone oko kolonije *P. chitinolyticus* CKS1 tokom rasta na skrobnoj ploči

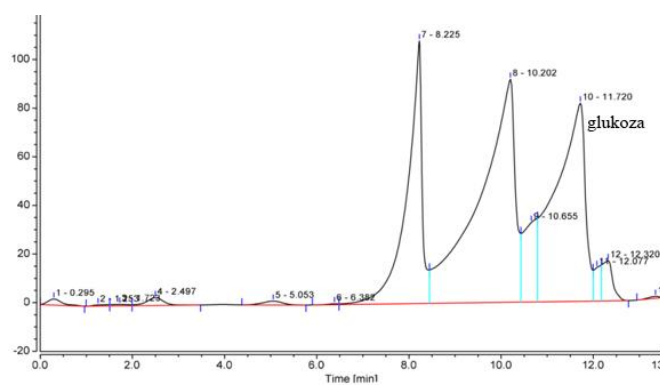


Slika P2-3. Prikaz hidrolize skroba odnosno pojave bistre zone oko kolonije *P. chitinolyticus* DSM11030 tokom rasta na skrobnoj ploči

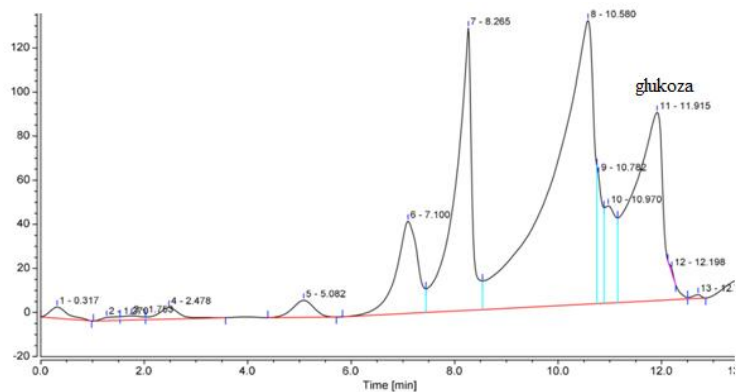
### PRILOG 3



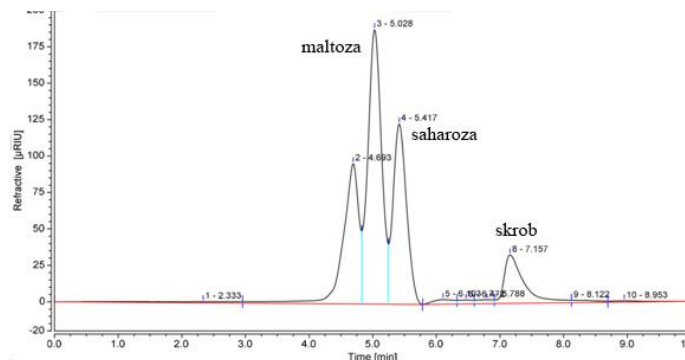
Slika P3-1. HPLC analiza hidrolize skroba (različiti vremenski intervali) pomoću amilaza koje proizvodi *P.chitinolyticus* CKS1 nakon fermentacije otpadne vode



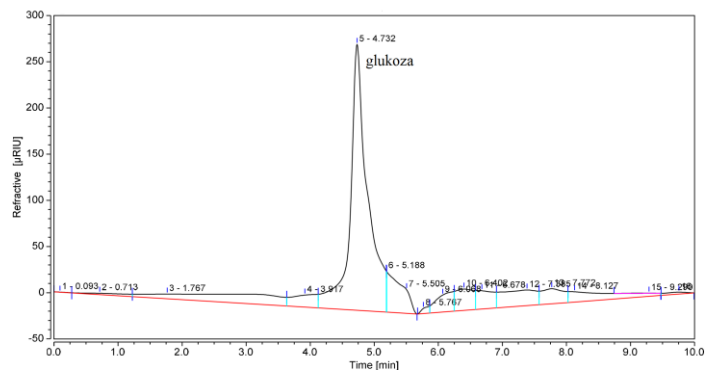
Slika P3-2. HPLC analiza hidrolize Avicela pomoću celulaza koje proizvodi *P.chitinolyticus* CKS1



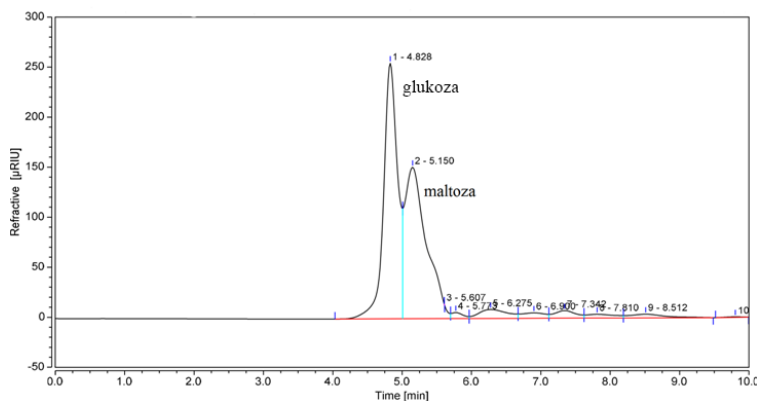
Slika P3-3.HPLC analiza hidrolize CMC pomoću celulaza koje proizvodi *P.chitinolyticus* CKS1



Slika P3-4. HPLC analiza hidrolize škroba pomoću *P. chitinolyticus* CKS1 tokom rasta na melasi i izluženom repinom rezancu



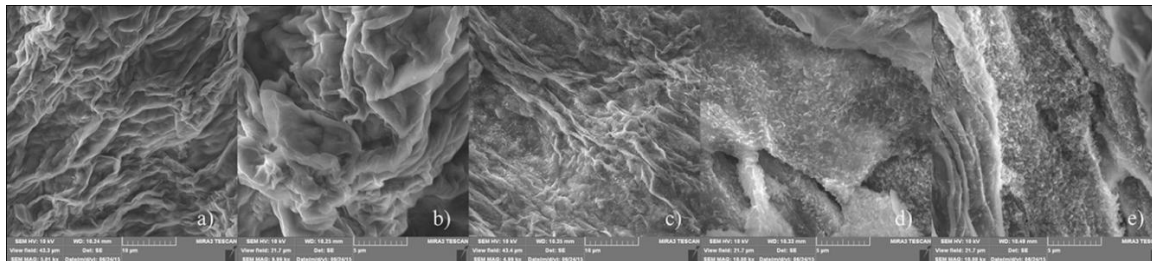
Slika P3-5. HPLC analiza uzorka nakon hidrolize pamučnog materijala pomoću celulaza koje proizvodi *P. chitinolyticus* CKS1



Slika P3-6. HPLC analiza uzorka nakon hidrolize ječmenih mekinja pomoću celulaza i  $\beta$ -amilaza koje proizvodi *P. chitinolyticus* CKS1



## PRILOG 4



Slika P4-1. Skenirajući elektronski mikrorgraf repinog rezanca tretiranog NaOH a) (5000 x); b)(10 000 x); c) *P.chitinolyticus* CKS1 imobilisane ćelije na površini c) (5 000 x); na površini i u šupljinama d) (10 000 x) i e) (5 000 x).

### Kratak opis metode

Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) je korišćena u cilju vizuelizacije morfologije površine repinog rezanca i repinog rezanca sa imobilisanim ćelijama mikroorganizma. Ispitivani uzorci su potapani u 3.5 % glutaraldehid 2-4 sata, a zatim sušeni u 50, 70, 90, 95 i 100 % etanolu. Neposredno pred mikroskopiranje, uzorci su sušeni u termostatu na 30 °C. Nakon sušenja uzorci se presvlače Au-Pd smešom pomoću raspršivača. Za mikroskopiranje je korišćen uređaj TESCAN Mira3 XMU na 10 kV.

## PRILOG 5

Tabela P5-1. Fizičko-hemijske karakteristike otpadne vode iz fabrike prerade

Parametri	Jedinice	Minimalna dozvoljena granica ispuštanja u kanalizaciju	Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost	Srednja vrednost
pH vrednost		6,5-9,5	7	8,2	7,6
Suspendovane čvrste materije	mg/L	150	850	1250	1050
HPK	mgO <sub>2</sub> /l	1000	900	1150	1025
BPK <sub>5</sub>	mgO <sub>2</sub> /l	500	720	780	750
Hloridi	mg/L		45	70	57,5
Sulfati	mg/L	400	46	90	68
Anjonski deterdženti	mg/L		3,2	3,8	3,5
Nitrati	mg/L		10	10,2	10,1
Nitriti	mg/L		8,2	8,6	8,4
Amonijumove soli	mg/L		40	60	50
Fosfati	mg/L		15	23	19
Kalcijum	mg/L	5,0	0,05	0,05	0,05
Gvožđe	mg/L	200	0,05	0,05	0,05
Cink	mg/L	2,0	0,05	0,05	0,05

## PRILOG 6

### SPISAK SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U DISERTACIJI

- ANOVA - analiza varijanse
- CCD - centralni kompozitni dizajn (*Central Composite Design*)
- CMC - karboksimetil celuloza
- DNK - dezoksiribonukleinska kiselina
- DNS - dinitrosalicilna kiselina
- EDTA - etilendiamintetrasirćetna kiselina
- HPLC - tečna hromatografija visokih performansi (*High Performance Liquid Chromatography*)
- PI - interval predviđanja (*Prediction Interval*)
- RSM - metoda odzivne površine (*Response Surface Methodology*)
- SEM - skenirajući elektronski mikroskop
- SSF - fermentacija na čvrstom supstratu (*Solid State Fermentation*)

## BIOGRAFIJA

Katarina R. Mihajlovski, dipl. inž. tehnologije, rođena je 05.12.1978. godine u Beogradu, Republika Srbija, gde je završila osnovnu školu i XI beogradsku gimnaziju. Godine 1997. upisala je studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu. Diplomirala je 17.02.2003. godine na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju sa prosečnom ocenom 8.97 odbranivši diplomski rad na temu „Ispitivanje uticaja ekstrakta omana (*Inula Helenium*) na rast izolata *Bifidobacterium* sp.“ sa ocenom 10. Po završetku redovnih studija, upisala je magistarske studije na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju. Bila je stipendista Ministarstva nauke u periodu od 01.04.2003.-31.12.2006, a nakon toga zasniva radni odnos na TMF-u na Katedri biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija. Pohađala je i stekla diplomu kursa: International Summer School and Training Course on „Cell and Tissue Engineering“, TMF, Beograd, 1-8 jul 2006. Magistarsku tezu na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu pod nazivom „Proučavanje i izbor prirodnih jedinjenja za proizvodnju tekstilnih materijala sa antimikrobnim svojstvima“ odbranila je 14. februara 2007. godine.

Bila je angažovana na sledećim projektima: "Biofermentisani sokovi na bazi biljnih sirovina" (BTH.7.1.4.0721.B, Ministarstvo nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije, 2003-2005), "Razvoj biomedicinskih tekstilnih materijala i proizvoda programiranih svojstava" (Tehnološki razvoj, TR6713, Ministarstvo nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije, 2006-2007) i "Razvoj novih prehrambenih i dijetetskih proizvoda sa medicinskim gljivama i lekovitim biljem" (Tehnološki razvoj, TR20049, Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, 2008-2010). Sada učestvuje na istraživanju u okviru projekta "Primena biotehnoloških metoda u održivom iskorišćenju nus-proizvoda agroindustrije" (Tehnološki razvoj, TR 31035, Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije) i "Biološki mehanizmi, nutritivni unos i status polinezasićenih masnih kiselina i folata: Unapređenje ishrane u Srbiji" (III 41030).

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а MIHAJLOVSKI KATARINA

број индекса \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

POLOPRIVREDNI I INDUSTRIJSKI OTPAD KAO SUPSTRAT ZA  
PROIZVODNJU CELULAZA I AMILAZA POMOCU NOVOG BAKTERIJSKOG  
SOJA Paenibacillus celatolyticus CKS1

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

Потпис докторанда

У Београду, 01.04.2016

Mihajlovska Katarina

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске  
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора KATARINA MIHAJLOVSKI

Број индекса \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_

Наслов рада POBOPRIVREDNI INDUSTRIJSKI OTPAD KAO SUBSTRAT ZA PROIZVODNJU  
CELULAZA I AMILAZA POMOCU NOVOG BAKTERIJSKOG SOBA *Trametes ciliatolobus* CBS 1  
Ментор Dr SUZANA DIMITRIJEVIC-BRANKOVIC, VANREDNI PROFESOR TEHNIJSKO-  
METALURSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA  
U BEOGRADU

Потписани/а MIHAJLOVSKI KATARINA

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 01.04.2016

Mihajlovski Katarina

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

POЉOPRIVREDNI I INDUSTRIJSKI OTPAD KAO SUPSTRAT ZA PROIZVODNJU  
CELULAZA I AMILAZA POMOCU NOVOG BAKTERIJSKOG SOJA *Pseudomonas*  
*chlorocyclus* CSK1  
која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 01.04.2016.

Milajlović Katarina