

Univerzitet u Beogradu
Hemijski fakultet

Marinela Šokarda Slavić

**„Karakterizacija, racionalni dizajn i primena
visokoefikasne α -amilaze iz *Bacillus licheniformis*
za hidrolizu sirovog skroba“**

Doktorska disertacija

Beograd, 2017

University of Belgrade
Faculty of Chemistry

Marinela Šokarda Slavić

**„Characterization, rational design and application
of highly efficient raw starch degrading α -amylase
from *Bacillus licheniformis*“**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2017

MENTORI:

dr Zoran Vujčić, redovni profesor
Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Nataša Božić, naučni savetnik
Centra za hemiju IHTM-a Univerziteta u Beogradu

ČLAN KOMISIJE

dr Marija Gavrović-Jankulović, redovni profesor
Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane

Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za biohemiju, Hemijskog fakulteta i Centru za hemiju, Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom redovnog profesora dr Zorana Vujčića.

Ovom prilikom želim da se zahvalim mentoru dr Zoranu Vujčiću na izboru teme, koja je bila veoma zanimljiva za rad, na velikoj pomoći, na motivaciji, na poverenju, na mogućnosti da budem naučnik i da se radujem eksperimentima i naravno na neizmernim sugestijama i korisnim idejama koje mi je pružio u svakom trenutku izrade i pisanja ove teze.

Mentoru dr Nataši Božić dugujem svoju najiskreniju zahvalnost na inspirativnim idejama, naučnom znanju i iskustvu koje mi nesebično prenosi, na poverenju koje mi pruža u eksperimentima gde me upoznaje sa primenom naučnih saznanja u praksi i na velikoj pomoći, koje mi je pružila u svakom trenutku izrade i pisanja ove teze.

Dr Mariji Gavrović-Jankulović želim da zahvalim na korisnim sugestijama tokom pisanja disertacije.

Veliku zahvalnost dužujem i kolegi dr Nikoli Lončaru na nesebičnoj pomoći u izradi i pisanju ove teze.

Zahvalnost dugujem i dr Predragu Vuliću sa katedre za kristalografiju Rudarsko geološkog fakulteta u Beogradu koji mi je pomogao u analizi kristalne strukture skroba, kao i Bobanu Anđelkoviću sa Hemijskog fakulteta u Beogradu na pomoći u snimanju NMR spektra.

Zahvalnost dužujem dr Štefanu Janeček iz laboratorije za proteinsku evaluaciju, Instituta za molekularnu biologiju u Bratislavi koji mi je pomogao u bioinformatičkoj analizi strukture BliAmy, kao i dr Henriette Rozeboomsa sa Instituta za biomelekuларne nauke i biotehnologiju u Groningenu na pomoći u određivanju kristalne strukture BliAmy i indentifikaciji SBS mesta.

Zahvaljujem se dragim kolegicama Biljani, Aleksandri, Miri, Marici, Barbari i Sanji na pomoći, druženju i podršci.

Svojoj porodici dugujem zahvalnost za bezrezervnu i neprocenjivu pomoć, podršku i razumevanje.

Posebnu zahvalnost dugujem svojim roditeljima koji su bili uvek uz mene.

„Karakterizacija, racionalni dizajn i primena visokoeфикаsne α -amilaze iz *Bacillus licheniformis* za hidrolizu sirovog skroba“

SAŽETAK

Složeni ugljeni hidrati kao što je skrob, od velikog su industrijskog značaja kako u oblastima bioenergije i bioprosesanja, tako i u ljudskoj ishrani. Enzimi koji mogu direktno da hidrolizuju sirovi (nativni, granularni) skrob na temperaturama nižim od temperature geliranja privlače sve veći interes jer bi njihovom upotrebom mogao da se smanji utrošak velike količine energije u zagrevanju skroba prilikom geliranja, a time i pojeftini proces. Rekombinantna α -amilaza iz *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a (*BliAmy*), ефикасна u hidrolizi granularnog skroba ispod temperature geliranja, proizvedena je ekstracelularno korišćenjem *Escherichia coli* kao domaćina. Razvijeni su ефикасни i reproduktivni procesi fermentacije sa ćelijama *E. coli* BL21 (DE3) i *E. coli* C43 (DE3) kroz dizajn medijuma za rast mikroorganizma i optimizaciju koraka u proizvodnji amilaze. Dobijene su velike količine *BliAmy* i to, u fermentaciji sa ćelijama *E. coli* BL21 (DE3) ukupna amilazna aktivnost od 250,5 IU mL⁻¹ (0,7 g L⁻¹), a sa ćelijama *E. coli* C43 (DE3) 500 IU mL⁻¹ (1,2 g L⁻¹).

Primenjen je eksperimentalni dizajn u optimizaciji hidrolize skroba, prečišćavanju proteina i dobijanja bioetanola. Korišćenjem statističke metode odgovornih površina optimizovan je proces hidrolize koncentrovane suspenzije sirovog kukuruznog skroba. Pokazano je da je *BliAmy* veoma ефикасна jer je hidrolizovala 91 % prilikom hidrolize 30 % -ne suspenzije skroba nakon 24 sata.

Na osnovu promena u kristalnoj strukturi analiziranjem rezidualnog skroba koji zaostaje nakon hidrolize 30%-ne suspenzije nakon 5 i 24 sata pokazano je da kukuruzni skrob ima A-tip i Vh-tip kristaliniteta. Upoređivanjem difrakcionih intenziteta pikova kristalne strukture i SEM mikrografije nativnog i rezidualnog skroba može se zaključiti da se istom brzinom hidrolizuju i kristalni i amorfni regione u granulama skroba, što je u skladu sa načinom hidrolize skrobnih granula tzv. „granula po granula“.

Primenom mešovitog matriksa Nuvia cPrime™ razvijena je efikasna metoda za prečišćavanje rekombinantne *BliAmy* uz istovremeno koncentrovanje, uklanjanje pigmenata i prečišćavanje direktno iz fermentacione tečnosti u jednom koraku. Optimalni uslovi prečišćavanja na Nuvia cPrime™ za maksimalni prinos specifične aktivnosti *BliAmy* od 96% su: pH vezivanja 5,3 + 150 mM NaCl i pH eluiranja 8,0 + 500 mM NaCl.

Određena je kristalna struktura *BliAmy* koja pokazuje da se enzim sastoji iz tri domena: N-terminalni katalitički domen A, domen B i C-terminalni domen. Kristalografskom analizom strukture *BliAmy* u kompleksu sa supstratima i inhibitorima identifikovano je SBS mesto koje je značajno za adsorpciju na skrobne granule, kao i hidrolizu što je potvrđeno eksperimentima adsorpcije i hidrolize rastvornog i sirovog skroba nakon što su racionalnim dizajnom dobijani mutanti, F257A i Y356A.

Optimizovan simultani proces hidrolize i saharifikacije sirovog kukuruznog skroba sa *BliAmy*-Dextrozyme GA i alkoholne fermentacije za proizvodnju bioetanolu u trajanju od samo 36 časova, pokazao se kao veoma efikasan proces dobijanjem 86% od teorijskog prinosa etanola.

Ključne reči: α -amilaza, sirovi skrob, hidroliza, bioetanol, dizajn eksperimenta, mesto vezivanja za supstrat (SBS). racionalni dizajn.

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Biohemija

„Characterization, rational design and application of highly efficient raw starch degrading α -amylase from *Bacillus licheniformis*“

ABSTRACT

Complex carbohydrates such as starch are of great industrial interest, especially in the areas of bioenergy and bioprocessing and increasingly in human nutrition. The importance of enzymes capable of direct hydrolysis of raw (native, granular) starch below the temperature of gelatinization has been well recognized due to the energy savings and the effective utilization of biomass, which reduces the overall cost of starch processing. Recombinant α -amylase from *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a (*BliAmy*), highly efficient in raw starch hydrolysis was produced extracellularly in *Escherichia coli*. An efficient and reproducible fermentation approach was developed with cells *E. coli* BL21 (DE3) and *E. coli* C43 (DE3) through the smart design of defined growth medium and optimization of process steps. Significant overexpression of *BliAmy* was achieved. Using *E. coli* BL21 (DE3) total of 250.5 IU mL⁻¹ (0.7 g L⁻¹) was obtained while using *E. coli* C43 (DE3) total of 500 IU mL⁻¹ (1.2 g L⁻¹) was achieved.

Experimental design was applied to optimize the hydrolysis of starch, protein purification and production of bioethanol. The hydrolysis of concentrated raw starch was optimized using response surface methodology. *BliAmy* was very effective, achieving the final hydrolysis degree of 91 % for the hydrolysis of 30 % starch suspension after 24 h.

Crystalline structure of starch residues analysed by X-ray diffraction on the samples originating from 30 % starch suspensions after 5 and 24 h shown A-type and a Vh-type crystallinity of corn starch. Constant diffracted intensities and scattering background indicated that *BliAmy* most likely degraded both amorphous and crystalline areas at the same rates. This is in agreement with a granule by granule mode of attack and can be concluded from the SEM micrographies.

Application of the mixed mode matrix Nuvia cPrime™ for single step purification of *BliAmy* resulted in simultaneous concentration, pigment removal as well as purification of amylase with yields of 96% directly from the fermentation broth. Optimized conditions were as follows: binding pH 5.3 + 150 mM NaCl and eluting pH 8.0 + 500 mM NaCl.

The determined crystal structure of *BliAmy* shown that the enzyme is consisted of three domains: N-terminal catalytic domain A, domain B, and C-terminal domain. Crystallographic study of *BliAmy* in its native form and in complexes with substrates and inhibitors identified SBS. Further confirmation of the SBS was obtained by joined mutagenesis, bioinformatic and kinetic study, and shown significance of F257 and Y356 for the adsorption and hydrolysis of raw and soluble starch.

Optimized simultaneous process of hydrolysis and saccharification of raw corn starch with *BliAmy*-Dextrozyme GA and alcohol fermentation for bioethanol production lasting only 36 h was very efficient resulting in 86% of theoretical ethanol yield.

Key words: α -amylase, raw starch, hydrolysis, bioethanol, the experimental design, surface binding sites (SBS), rational design.

Science Field: Chemistry

Special topics: Biochemistry

Lista skraćenica korišćenih u tekstu

AA akrilamid

ANOVA (*eng* analysis of variance assay) analiza varijansi

AM amiloza

AP amilopektin

APS amonijum – persulfat

BFP bromfenol plavo

BSA goveđi serum-albumin

BBD Box – Behenken-ov dizajn

CBB comassie brilliant blue

CCD (*eng.* centrl composite design) centralni kompozitni dizajn

CBM (*eng* carbohydrate binding modules) ugljenohidrat-vezujući modul

DOE dizajn eksperimenta

DNS dinitro – salicilna kiselina

FPLC *eng* fast protein liquid chromatography

FFD (*eng.* Full Factorial Design) pun faktorijalni dizajn

GH glukohidrolaze

IPTG Izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid

PAGE poliakrilamid–gel elektroforeza

PUZ pufer za obradu uzoraka

RSM (*eng.* Response Surface Methodology) metodologija odgovornih površina

RSDA (*eng.* raw starch degrading α -amylases) amialze koje hidrolizuju sirovi skrob

RSDE (*eng.* raw starch degrading enzymes) enzimi koji hidrolizuju sirovi skrob

SDS natrijum–dodecilsulfat

SDS-PAGE natrijum–dodecilsulfat poliakrilamid-gel elektroforeza

SEM skenirajuća elektronska mikroskopija

SBD (*eng.* starch binding domain) skrob vezujući domena

SBS (*eng.* surface binding sites) aminokiselinski ostataci na površini enzima

Tris tris(hidroksimetil)–aminometan

SADRŽAJ:

| | |
|--|----|
| 1. Uvod | 1 |
| 2. Opšti deo | 3 |
| 2.1 Nativne (sirove) skrobne granule i podložnost hidrolizi | 4 |
| 2.1.1 Fizička karakterizacija skroba | 4 |
| 2.1.2 Građa skrobne granule | 5 |
| 2.1.3 Hidroliza skroba u industrijskim uslovima | 8 |
| 2.1.4 Hidroliza granularnog skroba | 9 |
| 2.2 Enzimi koji razgrađuju skrob <i>in vitro</i> | 10 |
| 2.2.1 α -Amilaze | 12 |
| 2.2.1.1 Klasifikacija α -amilaza | 12 |
| 2.2.1.2 Mehanizam katalize α -amilazom | 13 |
| 2.2.1.3 Organizacija α -amilaznih domena | 15 |
| 2.3. α -Amilaze koje digestuju sirovi skrob (RSDA) | 16 |
| 2.3.1 Dobijanje RSDA | 22 |
| 2.3.2 Industrijski aspekti primene RSDA u hidrolizi sirovog skroba | 24 |
| 2.3.3 Prehrambeni aspekti primene RSDA u hidrolizi sirovog skroba | 25 |
| 2.4 Dizajn eksperimenta | 26 |
| 2.4.1 Faktorijalni dizajn | 27 |
| 2.4.2 Kvadratni modeli: Centralni kompozitni dizajn i Box – Behenken-ov dizajn | 28 |
| 2.4.3 Statistička analiza modela | 29 |
| 2.4.4. Primena u eksperimentalnom radu | 30 |
| 2.5 Proizvodnja bioetanola iz sirovog skroba | 30 |
| 3. NAŠI RADOVI | 35 |
| 3.1 Produkcija rekombinantne α -amilaze <i>BliAmy</i> u bioreaktoru | 36 |
| 3.2 Prečišćavanje rekombinantne <i>BliAmy</i> | 39 |
| 3.3 Statistička optimizacija promenljivih u procesu hidrolize sirovog skroba korišćenjem <i>BliAmy</i> | 40 |
| 3.3.1 Potpuni faktorijalni dizajn | 40 |
| 3.3.2. Dizajn postepenog uvećanja | 42 |

| | |
|---|----------|
| 3.3.3 Centralni kompozitni dizajn | 44 |
| 3.3.4 Validacija modela hidrolize sirovog kukuruznog skroba korišćenjem <i>BliAmy</i> | 48 |
| 3.4 Poređenje efikasnosti <i>BliAmy</i> i komercijalne α -amilaze u hidrolizi sirovog skroba | 48 49 |
| 3.5 Rastvorljivi oligosaharidi proizvedeni u hidrolizi skroba korišćenjem <i>BliAmy</i> | |
| 3.6 Analiza rezidualnog skroba zaostalog nakon hidrolize sirovog kukuruznog skroba korišćenjem <i>BliAmy</i> | 51 |
| 3.7 Dobijanje i prečišćavanje <i>BliAmy</i> - optimizovano „upstream i downstream” procesovanje | 53 |
| 3.7.1 Proizvodnja rekombinantne <i>BliAmy</i> semikontinualnim gajenjem <i>E. coli</i> C43 (DE3) | 54 55 |
| 3.7.2 Prečišćavanje <i>BliAmy</i> na mešovitom matriksu Nuvia cPrime™ | |
| 3.8 Racionalni dizajn aminokiselinskih ostataka <i>BliAmy</i> potencijalno važnih u vezivanju za skrob van aktivnog mesta | 60 |
| 3.8.1 Identifikacija mogućih SBS kod <i>BliAmy</i> bioinformatički i skraćivanjem gena (<i>truncation</i>) | 61 63 |
| 3.8.2 Karakterizacija mutantnih formi <i>BliAmy</i> | |
| 3.8.2.1. Ispitivanje adsorpcija mutantnih formi <i>BliAmy</i> na skrobne granule | 63 |
| 3.8.2.2 Ispitivanje kinetike hidrolize rastvornog i sirovog skroba mutantnim formama <i>BliAmy</i> | 64 65 |
| 3.8.2.3 Relativna adsorpcija i hidroliza enzimske forme <i>BliAmy</i> -TC | 66 |
| 3.8.3 Kristalografska identifikacija mogućih SBS kod <i>BliAmy</i> | 66 |
| 3.8.3.1 Određivanje kristalne strukture native <i>BliAmy</i> | |
| 3.8.3.2 Određivanje kristalne strukture native <i>BliAmy</i> u kompleksu sa supstratima i inhibitorima | 67 70 |
| 3.8.3.3 Karakterizacija mutantnih varijanti <i>BliAmy</i> F257A i Y358A | |
| 3.8.3.3.1 Adsorpcija mutantnih varijanti <i>BliAmy</i> F257A i Y358A na skrobne granule | 70 |
| 3.8.3.2 Kinetika hidrolize rastvornog i sirovog skroba mutantima <i>BliAmy</i> F257A i Y358A | 72 |

| | |
|--|-----|
| 3.9 Optimizacija dobijanja bioetanola iz sirovog kukuruznog skroba korišćenjem <i>BliAmy</i> | 75 |
| 3.9.1 Box-Behnken-ov dizajn (BBD) za optimizaciju simultanog otečnjavanja i saharifikacije sirovog kukuruznog skroba korišćenjem <i>BliAmy</i> | 76 |
| 3.9.2 Proizvodnja bioetanola iz komercijalne dekstroze | 81 |
| 3.9.3 Proizvodnja bioetanola iz kukuruznog skroba | 82 |
| 3.10. Zaključci | 84 |
| 4. Eksperimentalni deo | 86 |
| 4.1 Semikontinualna fermentacija | 87 |
| 4.1.1. Preinokulum bakterijske kulture | 87 |
| 4.1.2 Definisana podloga za fermentaciju | 87 |
| 4.1.3 Uslovi rasta | 88 |
| 4.1.4 Sirovi enzimski preparat | 89 |
| 4.1.5 Praćenje toka fermentacije | 89 |
| 4.1.5.1 Određivanje mase suvih ćelija | 89 |
| 4.1.5.2 Kvantifikacija glukoze | 89 |
| 4.1.5.3 Amilazna aktivnost | 91 |
| 4.1.5.4 Određivanje koncentracije proteina po Bradford-u | 92 |
| 4.2 Prečišćavanje enzima | 93 |
| 4.2.1 Delimično prečišćavanje <i>BliAmy</i> | 93 |
| 4.2.2. Prečišćavanje <i>BliAmy</i> jonoizmenjivačkom hromatografijom | 93 |
| 4.2.2.1 SDS- PAG elektroforeza | 94 |
| 4.3 Hidroliza sirovog skroba dejstvom <i>BliAmy</i> | 97 |
| 4.4 Analiza hidrolizata tankoslojnom hromatografijom | 97 |
| 4.5 Kvalitativna analiza rezidualnog skroba | 98 |
| 4.5.1 Rengenska difrakcija skroba | 98 |
| 4.5.2 SEM karakterizacija hidrolizovanih granula skroba | 98 |
| 4.6 Prečišćavanje <i>BliAmy</i> mešanom hidrofobno-katjonskom hromatografijom | 99 |
| 4.6.1 CCD za optimizaciju prečišćavanja amilaze iz fermentacione tečnosti | 99 |
| 4.6.2 Optimizovano prečišćavanje na Nuvia™ cPrime™ matriksu | 99 |
| 4.7 Racionalni dizajn aminokiselinskih ostataka <i>BliAmy</i> potencijalnih SBS | 100 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 4.7.1 | Bioinformatička analiza sekvenci | 100 |
| 4.7.1.1 | Adsorpcija <i>BliAmy</i> na skrobne granule | 101 |
| 4.7.1.2 | Katalitički koeficijenti <i>BliAmy</i> prema rastvornom skrobu | 101 |
| 4.7.1.3 | Katalitički koeficijenti <i>BliAmy</i> prema sirovom skrobu | 101 |
| 4.7.1.4 | Relativna adsorpcija i hidroliza sirovog kukuruznog skroba | 101 |
| 4.7.2 | Kristalizacija, prikupljanje podataka i određivanje strukture <i>BliAmy</i> | 102 |
| 4.7.2.1. | Racionalni dizajn za dobijanje mutanata <i>BliAmy</i> nakon kristalizacije | 103 |
| 4.8 | Dobijanje bioetanola | 104 |
| 4.8.1 | Optimizacija procesa simultane hidrolize i saharifikacije skroba | 104 |
| 4.8.2 | Alkoholna fermentacija | 104 |
| 4.8.2.1 | Alkoholna fermentacija komercijalne dekstroze | 104 |
| 4.8.2.2 | Alkoholna fermentacija hidrolizata iz sirovog kukuruznog skroba | 104 |
| 5. | Literatura | 106 |

1. Uvod

Skrob je važan sastojak hrane i supstrat za proizvodnju mnogih industrijskih proizvoda. Različiti industrijski procesi poput konverzije skroba za dobijanje glukoznih, fruktoznih i maltoznih sirupa ili dobijanje bioetanola, podrazumevaju hidrolizu sirovog skroba. Hidroliza sirovog skroba se još naziva i hidroliza skrobnih granula, hladna hidroliza, hidroliza nativnog skroba ili hidroliza skroba na sub-gelirajućoj temperaturi i smatra se velikim probojem u industriji obrade skroba omogućavajući smanjenje ukupnih troškova, uštedu u energiji i efikasno iskorišćavanje bioresursa (1–3).

Enzimi koji mogu direktno da hidrolizuju sirovi (nativni, granularni) skrob na temperaturama nižim od temperature geliranja skroba poznati su kao RSDE (od eng. raw starch degrading enzymes (4)). Upotreba RSDE mogla bi da smanji utrošak velike količine energije u zagrevanju skroba prilikom geliranja, a time i pojeftini proces (1,3,5).

Dobijanje nativnih i rekombinantnih RSDE kao i njihove biokatalitičke mogućnosti u žiži su istraživanja poslednjih par decenija što je prikazano u nekoliko revijalnih radova (1,4,6). Najnoviji sagledava skorašnji napredak u proizvodnji, prečišćavanju, karakterizaciji sekvencija, biohemijskim osobinama i primeni RSDA (od eng. raw starch degrading α -amylases) iz familije GH13 s obzirom na to da većina poznatih RSDE pripada familiji α -amilaza (7). Skoro je objavljen i rad o produkciji bioetanola hladnom hidrolizom iz materijala koji sadrže sirovi skrob (3), kao i pregled novih rezultata o strukturno-funkcionalnim odnosima enzima prirodno uključenih u degradaciju skroba (8).

Adsorpcija RSDA na skrob se često smatra neophodnim uslovom za hidrolizu sirovog skroba. Enzim se adsorbuje na skrob ili preko određenog domena koji vezuje skrob – SBD (eng. starch binding domain) ili preko specifičnih aminokiselinskih ostataka na površini enzima — SBS (eng. surface binding sites) smeštenih van aktivnog mesta (9). α -Amilaza iz *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a (*BliAmy*) pokazala se kao veoma efikasna RSDA u hidrolizi granularnog skroba ispod temperature geliranja. Zanimljivo je da ovaj enzim nema SBD tako da je odgovor na pitanje koja je strukturna karakteristika odgovorna za efikasnu hidrolizu koncentrovanog sirovog skroba verovatno u identifikaciji mogućih SBS-ova.

Radi ispitivanja mogućnosti primene rekombinantno dobijene α -amilaze *BliAmy* u hidrolizi koncentrovanog sirovog kukuruznog skroba, kao i radi doprinošenja novim saznanjima o strukturnim karakteristikama enzima postavljeni su sledeći ciljevi ovog rada:

- Razvoj efikasnog i reproduktivnog procesa za dobijanje velike količine rekombinantnog proteina kroz dizajn medijuma za rast mikroorganizma, optimizaciju koraka u proizvodnji *BliAmy* i izbor pogodnih tehnika fermentacije, s obzirom na to da je to prvi preduslov industrijske primene biotehnološkog proizvoda.
- Optimizacija industrijskog aspekta procesa hidrolize koncentrovane suspenzije sirovog kukuruznog skroba statističkom metodom odgovornih površina.
- Optimizacija novog postupka simultane hidrolize i saharifikacije skroba upotrebom *BliAmy* i komercijalne glukoamilaze za dobijanje bioetanola.
- Razvoj efikasne metode za prečišćavanje rekombinantne *BliAmy* uz istovremeno koncentrovanje, uklanjanje pigmenata i prečišćavanje direktno iz fermentacione tečnosti u jednom koraku, u cilju dobijanja što većeg prinosa proteina neophodnog za kinetičke, mehanističke i kristalografske analize.
- Racionalni dizajn *BliAmy* radi identifikacije mogućih SBS-ova značajnih za adsorpciju na skrobne granule kao i za hidrolizu.

2. Opšti deo

Složeni ugljeni hidrati od velikog su industrijskog značaja kako u oblastima bioenergije i bioprosesanja (10), tako i u ljudskoj ishrani (11). Kako se uglavnom hidrolizuju enzimima iz klase glikozid hidrolaza (GH) otkriven je i klasifikovan značajno veliki broj novih GH sekvencija, a određen je i veliki broj trodimenzionalnih struktura tih enzima, što je sve doprinelo razvoju bogatog izvora podataka za oblast - baze podataka CAZy (od eng. Carbohydrate Active enZyme) (12) (<http://www.cazy.org/>).

Enzimski hidroliza skroba je prvi enzimski izveden industrijski proces ustanovljen nakon što su Paven i Persoz u Francuskoj još 1840-ih godina formulisali osnovne principe enzimskog dejstva (13). Skrob je najzastupljeniji polisaharid mnogih ekonomski važnih biljaka kao što su kukuruz, krompir, pšenica, pirinač i manioka i samim tim značajan je osim kao hrana i kao sirovina za dobijanje bioetanol, nosač lekova, u papirnoj i tekstilnoj industriji (14,15).

Enzimi koji mogu direktno da hidrolizuju sirovi (nativni, granularni) skrob na temperaturama nižim od temperature geliranja poznati su kao RSDE (4). Upotreba RSDE mogla bi da smanji utrošak velike količine energije u zagrevanju skroba prilikom geliranja, a time i pojeftini proces (1,3,5). RSDE su nađene kod predstavnika svih carstava živih bića što takođe ukazuje na njihov značaj, međutim iz industrijske perspektive poželjni proizvođači su mikroorganizmi imajući u vidu lakoću gajenja, prinos željenih enzima kao i transfer tehnologije sa laboratorijske na procesnu skalu.

Industrija skroba je jedan od najvećih korisnika enzima za hidrolizu i modifikaciju ovog korisnog sirovog materijala. Polimer skroba, kao i drugi slični polimeri, zahteva kombinaciju enzima za njegovu potpunu hidrolizu. Amilaze zauzimaju 30% od ukupne svetske potrošnje enzima (16). Poslednjih nekoliko godina značajno je poraslo saznanje o strukturama i osobinama skroba i RSDA. Razumevanje odnosa između strukturnih karakteristika i osobina RSDA je preduslov za efikasnu primenu u različitim oblastima od medicine do industrije kao što je npr. stvaranje efikasnijeg i robusnog biokatalizatora za industrijsku primenu u hidrolizi sirovog skroba (1,4,6).

2.1 Nativne (sirove) skrobne granule i podložnost hidrolizi

Skrob je glavna ugljenohidratna rezerva u biljkama. Nastaje u procesu fotosinteze i nagomilava se u korenu, krtolama, semenu, stablu i plodovima zavisno od biljke. Deponovan je u amiloplastu u vidu granula. Veličina i oblik granule skroba zavisi od biljne vrste (17). Skrob krompira je najkrupniji, a najsitniji je skrob pirinča i prosa. Kukuruzni skrob poseduje zrna u dva oblika u zavisnosti od porekla. Brašnaste sorte kukuruza imaju uglavnom okrugla zrna, dok su kod staklastih sorti poliedarskog oblika. U zavisnosti od vrste biljke veličina zrna skroba varira od 2 do 130 μm . Kod kukuruza veličina zrna skroba je od 5 do 30 μm . Služi kao rezervna hrana u toku rasta biljaka ili kao polazni energetski materijal semena i krtola pri klijanju (18). U novije vreme, veliki izvor skroba predstavljaju i plantaže algi. Ovakav skrob pokazuje kako strukturne tako i razlike u fizičkim osobinama u poređenju sa biljkama što je samo po sebi novi izazov za enzimsku hidrolizu.

2.1.1 Fizička karakterizacija skroba

Rendgenska difrakcija i skenirajuća elektronska mikroskopija - SEM (od eng. scanning electron microscopy) jedne su od najzanačajnijih metoda za karakterizaciju biomaterijala kao što je skrob.

Rendgenska difrakcija se koristi za strukturnu karakterizaciju biomaterijala u kristalnoj formi. Skrob je po strukturi semikristalni materijal, praškaste forme, jer sadrži i amorfne i polikristalne delove. Difrakciona slika (difraktogram) nastaje kada se polikristalni uzorak postavi u snop rendgenskih zraka i dođe do difrakcije na kristalima koji su orijentisani tako da zadovoljavaju Bragov zakon. Difraktogram se sastoji od niza difrakcionih linija, tj. refleksija različitog intenziteta i položaja na osnovu kojih je moguće identifikovati prisutne kristalne faze i odrediti njihovu zastupljenost (19).

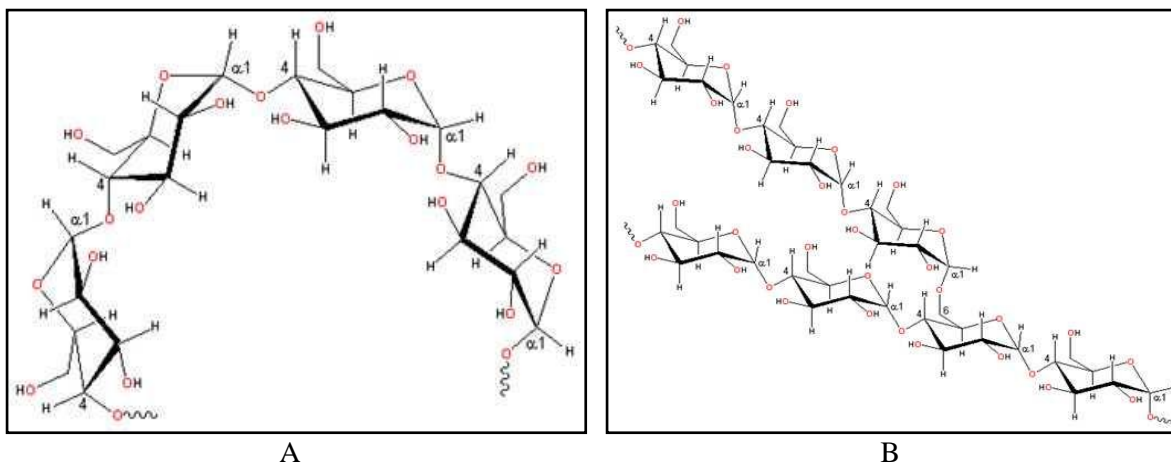
Skenirajuća elektronska mikroskopija se koristi za utvrđivanje morfoloških karakterisrika materijala. Koristi se upadni snop elektrona koji se usmerava na uzorak i

ispituje njegovu površinu. Interakcija upadnog snopa elektrona i površine uzorka proizvodi različite signale koji se beleže na različite načine. SEM može uvećati objekte više od 100 000 puta, a može se dobiti i detaljna 3D slika. Da bi se uzorci, kao što je škrob, ispitali na konvencionalnim SEM uređajima u visokoj rezoluciji, moraju da se „napare“ elektroprovodljivim materijalom, obično ugljenikom, zlatom, nekim drugim metalom ili legurom (19,20).

2.1.2 Građa skrobne granule

Sirovi škrob je kompleksna granula izgrađena od dva polimera: amiloze (AM) linearnog polisaharida sastavljenog od α -1,4-glukoznih jedinica i amilopektina (AP) koji je granati glukozni polimer sastavljen od α -1,4-vezanih glukanskih lanaca koji imaju oko 5% α -1,6-vezanih granajućih lanaca, (Slika 1). Škrob u zavisnosti od biljne vrste sadrži oko 20—30% AM i sa aspekta biofizičkih osobina amorfni je polimer, dok je AP koga u skrobu ima oko 70—80 % zaslužan za semikristalnu arhitekturu granule (18). Verovatno je i amiloza uključena da zajedno sa AP obrazuju sferno-kristalnu strukturu (Slika 2) (21).

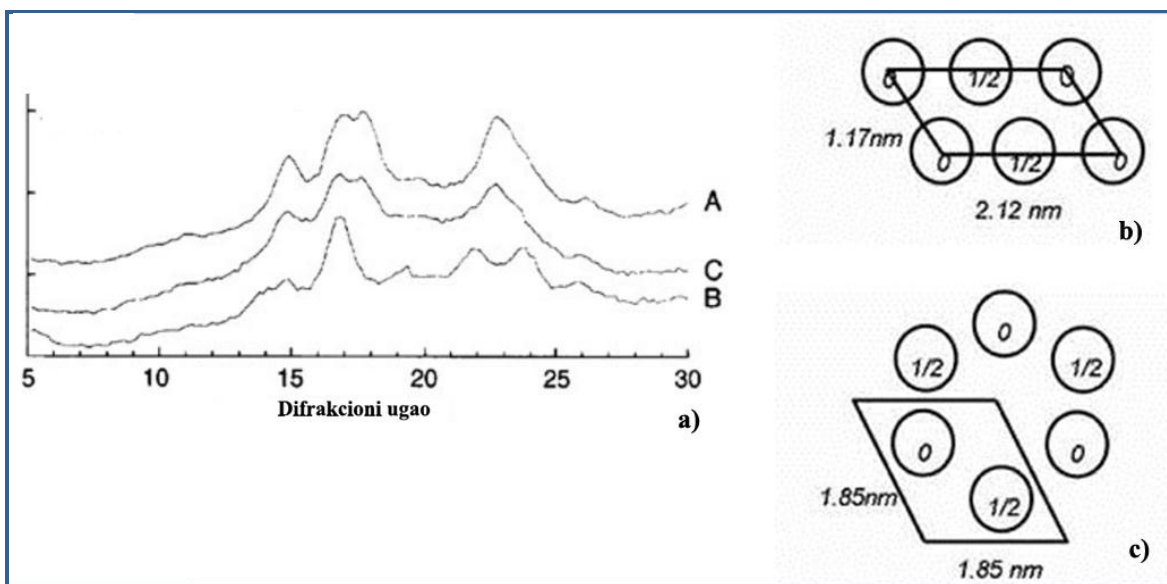
Amiloza u skrobu ima oblik jednostrukog heliksa, pa iako su α -(1 \rightarrow 4) veze sposobne za relativno laku rotaciju oko ϕ i ψ ose, kratka vodonična veza između drugog i trećeg atoma kiseonika izaziva relativno krutu strukturu heliksa (22). Amiloza se ne rastvara u hladnoj vodi. Daje plavu boju sa jodom, a sa alkoholima, ketonima i masnim kiselinama gradi mikrokristalne taloge. Ovakvo ponašanje objašnjava se spiralnom strukturom amiloze u čiju šupljinu mogu da uđu neka druga jedinjenja (inkluziona jedinjenja) (23).



Slika 1. Model strukture (A) amiloze i (B) amilopektina.

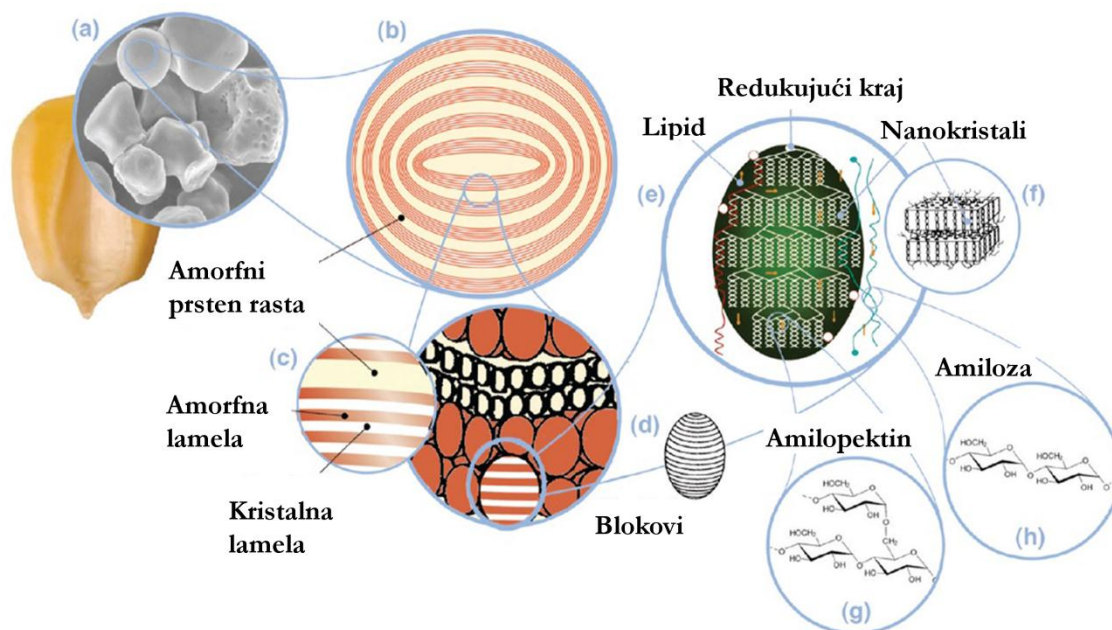
Amilopektin se sastoji iz kratkih razgranatih lanaca, ima stepen polimerizacije (SP) iznad 10 000 i sa jodom daje crvenu boju. Za razliku od amiloze, amilopektin sadrži oko 0,3% estarski vezane fosforne kiseline. Dejstvom β -amilaze na amilopektin dolazi do parcijalne hidrolize pri čemu finalno kao glavni proizvodi nastaju maltoza i granični dekstrini koji predstavljaju delove molekula u kojima se nalaze mesta grananja odnosno α -(1 \rightarrow 6) glikozidne veze (24). U skrobu je u obliku dvostrukog heliksa koji dalje grade klastere. Celokupan amilopektinski molekul sadrži prosečno oko 2×10^6 glukoza jedinica, što ga čini jednim od najvećih molekula u prirodi.

Kristalografskom analizom difrakcijom X-zracima semikristalne strukture granule skroba primećena su tri tipa skrobnih granula A, B i C, Slika 2. Amilopektinski lanci organizovani u dvostruke helikse mogu ili da formiraju više otvoreni hidratizirani B-tip šestougaoanog kristala ili gušći kristal A-tipa, sa postepenim monokliničkim pakovanjem, u zavisnosti od izvora biljnih granula skroba (25). Tip A skrobnih granula sadrži uglavnom kraće amilopektinske grane od oko 23—29 glukoza jedinica i on se uglavnom nalazi u većini žitarica. Tip B, sa nešto dužim amilopektinskim lancima od oko 30—44 glukoza jedinica se nalazi u banani, nekim krtolama (kao što je krompir) i u skrobovima žitarica sa visokim sadržajem amiloze. Tip C skrobnih granula je kombinacija tipova A i B, a najviše je zastupljen u grašku i pasulju (26).



Slika 2. (a) Kristalografska analiza difrakcijom X-zracima skrobnih granula. Amilopektinski lanci organizovani u dvostruke helikse (b) kristala A-tipa ili (c) kristala B-tipa.

Uprkos velikim naporima da se postavi univerzalni model strukture skroba, do danas ne postoji takav dogovor zbog različite prirode i velike zavisnosti od biološkog porekla skroba (17). Međutim, može se reći da postoji jedan model koji je trenutno dominantan. To je model višeskalne strukture, prikazan na Slici 3, prema kojem se granula skroba (a) sastoji iz rastućih prstenova (b) koji se sastoje od blokova (d) izgrađenih od amorfni i kristalnih lamela (c) koje sadrže amilopektinske (g) i amilozne (h) lance (27). Većina skrobnih granula se sastoji iz naizmeničnih lamela amorfni i semikristalnih regiona, a struktura je posledica organizacije amilopektina čiji lanci i grane prolaze kroz lamele. Molekulska struktura raste od jedne kičme odnosno jednog lanca (C) čiji se redukujući kraj nalazi u blizini centra granule do radijalnog klastera paralelnih lanaca (A i B) koji su povezani α -1,6 granama, Slika 3 (e). A lanci su povezani jednom, a B lanci sa dva ili više drugih lanaca. Na slici je ilustrovan jednostruki heliks amilozne i dvostruki heliks i klaster amilopektina.



Slika 3. Struktura skroba: (a) granule kukuruznog skroba (30 μm), (b) amorfni i semikristalni regioni tj. prstenovi (120-5000 nm), (c) amorfne i kristalne lamele (9nm), uveličani detalji semikristalnih regiona, (d) blokovi (20-50nm) konstitutivna jedinica prstena, (e) dvostruki heliksi amilopektina koji formiraju kristalne lamele blokova, (f) nanokristali: drugi oblik kristalne lamele nazvan nanokristal kada se izoluje kiselom hidrolizom, (g) molekulska struktura amilopektina, (h) molekulska struktura amiloze (0,1-1 nm) (27) (preuzeto i modificovano iz (7)).

2.1.3 Hidroliza skroba u industrijskim uslovima

Skrob je važan sastojak hrane i polazni supstrat za proizvodnju mnogih industrijskih proizvoda. Različiti biološki procesi, kao što su varenje kod ljudi i životinja ili metabolizam skroba u biljkama, kao i industrijski procesi poput konverzije skroba za dobijanje glukoznih, fruktoznih i maltoznih sirupa ili dobijanje bioetanol, podrazumevaju hidrolizu sirovog skroba. Skrob je jedna od najisplativijih sirovina za industrijsku proizvodnju alkohola.

Konvencionalna enzimaska hidroliza skroba podrazumeva proces koji se sastoji od nekoliko koraka. U prvom koraku skrobne granule se geliraju u vodi pri temperaturi većoj od 100°C , formirajući viskoznu suspenziju (geliranje), zatim sledi parcijalna enzimaska hidroliza α -amilazama koja dovodi do gubitka viskoznosti (likvefakcija odnosno otečnjavanje), da bi na kraju daljom enzimskom hidrolizom npr. gluoamilazama ili β -

amilazama nastale glukoza i/ili maltoza (saharifikacija). Međutim, uzimajući u obzir cene energenata, efikasniju upotrebu prirodnih resursa i probleme viskoznosti, danas se sve više pažnje posvećuje nalaženju mogućnosti direktne hidrolize sirovog skroba dok je on u obliku sirovih granula bez izlaganja visokim temperaturama (1,4,28,29).

2.1.4 Hidroliza granularnog skroba

Reakcija u heterogenoj sredini hidrolize između enzima u rastvoru i čvrstog supstrata (sirovi skrob) obuhvata nekoliko faza: difuziju enzima na čvrstu površinu, adsorpciju enzima na granule i hidrolitičko dejstvo enzima (30). U kom pravcu se dalje nastavlja enzimska aktivnost zavisi i od porekla enzima i od tipa skroba (1). Kada enzim prevaziđe spoljašnju barijeru sačinjenu od površinske strukture granule, proces hidrolize se nastavlja brže u radijalnom pravcu (31). Trodimenzionalna vizuelizacija difuzije enzima na sirovom skrobu u toku hidrolize jedne granule skroba pomoću sinhrotronske D(duboke)UV fluorescencije pokazala je da proces ne napreduje na svim granulama istovremeno, tako da su neke granule u velikoj meri hidrolizovane, a druge ostaju netaknute u isto vreme hidrolize. Dokazano je i da se ista vrsta skrobnih granula hidrolizuje različito u zavisnosti od porekla α -amilaze (32). Hidroliza sirovog skroba je ograničena morfološkim svojstvima supstrata, odnosno njegovih glavnih strukturnih blokova, nivoa kristaliniteta i prisustvom amilozno-lipidnih kompleksa (33,34).

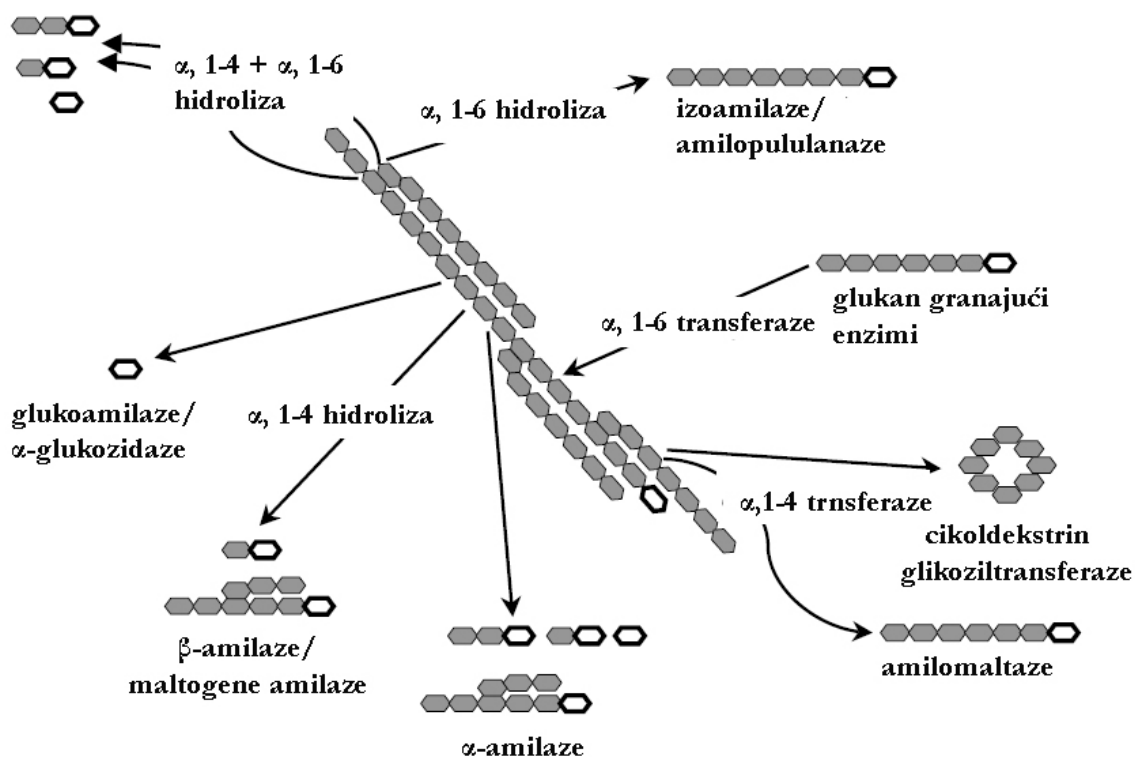
Hidroliza skrobnih granula u velikoj meri zavisi od strukture skroba, strukture i izvora amilaze (35,36). Hidroliza sirovog skroba podrazumeva upotrebu amilaza koje su u stanju da hidrolizuju granularni skrob bez prethodnog kuvanja na visokim temperaturama i otečnjavanja (6,37). Zbog strukturne složenosti skrobne granule obično je potrebno više različitih enzima za efikasnu hidrolizu.

Ograničenja prenosa mase ukazuju na to da su za heterogeni sistem sastavljen iz enzima i čvrstog skroba potrebne veće doze enzima nego za hidrolizu rastvornog skroba. Na osnovu toga se razlikuju i brzine ovih reakcija odnosno hidroliza sirovog skroba znatno je sporija od brzine hidrolize geliranog skroba. Prinos reakcije hidrolize zavisi od vrste skroba, količine enzima i temperature (1).

2.2 Enzimi koji razgrađuju skrob *in vitro*

Zbog kompleksne građe skroba, za potpunu razgradnju do glukoze i maltoze neophodna je odgovarajuća kombinacija enzima. Do sada je identifikovan veliki broj različitih enzima koji mogu da razgrade skrob ali se oni mogu podeliti u četiri osnovne grupe amilolitičkih enzima (38):

- Endoamilaze
- Egzoamilaze
- Degranajući enzimi
- Transferaze



Slika 4. Enzimi koji razgrađuju skrob. Molekul glukoze je prikazan kao obojeni šestougao, a redukujući kraj poliglukoznog molekula je obeležen praznim šestugaom.

Endoamilaze hidrolizuju α -1,4 glikozidne veze između unutrašnjih (endo-) delova amiloze i amilopektina. **α -Amilaze** (E.C 3.2.1.1) su endo-amilaze koje su nađene u skoro svim organizmima. Klasifikovane su kao 1,4- α -D-glukan glukohidrolaze na osnovu toga što imaju osobinu endo-enzima da hidrolizuju α -1,4 glikozidnu vezu sa unutrašnje (endo-) strane amiloznog ili amilopektinskog lanca. Krajnji proizvodi reakcija α -amilaza su oligosaharidi različitih dužina koji se nalaze u α -anomernoj konfiguraciji i α -granični dekstrini, koji grade granajuće oligosaharide (38).

Egzoamilaze mogu da hidrolizuju α -1,4 glikozidne veze kao npr. **β -amilaze** (3.2.1.2), ili i α ,1-4 i α ,1-6 glikozidne veze kao npr. glukoamilaze (EC 3.2.1.3) i **α -glukozidaze** (EC 3.2.1.20), delujući na spoljašnje glukozne ostatke amiloze ili amilopektina pri čemu se kao proizvodi dobijaju glukoza (glukoamilaze i α -glukozidaze), ili maltoza i β -granični dekstrini (β -amilaze). β -Amilaze i glukoamilaze takođe konvertuju oslobođenu maltozu iz α - u β - anomernu konfiguraciju. Glukoamilaze i α -glukozidaze imaju različite afinitete prema supstratima, α -glukozidaze bolje deluju na kraće maltooligosaharide i oslobađaju glukozu u α -anomernoj konfiguraciji, dok glukoamilaze bolje hidrolizuju duge lance polisaharida (39).

Degranajući enzimi koji isključivo hidrolizuju α ,1-6 glikozidne veze su npr. **izoamilaze** (EC 3.2.1.68) i **pululanaze** tipa I (EC 3.2.1.41). Glavna razlika između njih je mogućnost hidrolize pululana, polisaharida sa ponavljajućim jedinicama maltotrioze vezanih α ,1-6 vezom (40,41). Pululanaze hidrolizuju pululan i amilopektin, dok izoamilaze mogu samo da hidrolizuju α ,1-6 vezu u amilopektinu. Pululanaze tipa II hidrolizuju i α ,1-4 i α ,1-6 glikozidnu vezu, a glavni produkti hidrolaze su maltoza i maltotrioza. U ovu grupu spadaju i neopululanaze koje mogu da transglikoziluju formirajući novu α ,1-4 ili α ,1-6 glikozidnu vezu.

Transferaze hidrolizuju α ,1-4 glikozidnu vezu u molekulu donora a zatim prebacuju deo donora na glikozidni akceptor uz formiranje nove glikozidne veze. Enzimi kao što su **amilomaltaze** (EC 2.4.1.25) i **ciklodekstrin glikoziltransferaze** (EC 2.4.1.19) formiraju novu α ,1-4 glikozidnu vezu dok, **granajući enzimi** (EC 2.4.1.18) formiraju novu α ,1-6 glikozidnu vezu.

Amilolitički enzimi su prisutni u mikroorganizmima, biljkama, životinjama, čoveku i do danas je poznat veliki broj enzima koji su u stanju da hidrolizuju sirovi granularni škrob (1,4). Prema Henrissat-ovoj klasifikaciji glukozyd hidrolaza iz 1991 godine (42) baziranoj na homologiji primarnih sekvencija, RSDE spadaju u nekoliko klasa i familija. Većina njih pripada GH klasi i najviše ih je u familiji GH13, sa mnogim primerima α -amilaza (EC 3.2.1.1), α -glukozydaza (EC 3.2.1.20), izoamilaza (EC 3.2.1.68), maltogenih α -amilaza (EC 3.2.1.133) i ciklomaltodekstrin glukanotferaza (CGTaza) (EC 2.4.1.19), kao i u familijama GH14 - β -amilaze, (EC 3.2.1.2) i GH15 - glukoamilaze (EC 3.2.1.3) (1,4) Novootkrivena klasa oksidoreduktaza – litičke polisaharidne monooksigenaze (LPMO) takođe razlažu nerastvorne polisaharide delujući na njihove kristalne regione i omogućavajući tako efikasniju hidrolizu naknadnom delovanju GH. Za LPMO aktivnu prema škrobu klasifikovanu u familiju AA13 u CAZy, a čija je kristalna struktura skoro određena (43), pokazana je oksidacija C1 atoma na mestu cepanja skroba.

2.2.1 α -Amilaze

Većina poznatih RSDE pripada familiji α -amilaza. α -Amilaze su najviše ispitivani amilolitički enzimi koji se proizvodi u svim živim organizmima i imaju ključnu ulogu u varenju skroba, koji je najčešći izvor ugljenika i energije (44). S druge strane, primenjuju se u industrijskoj biotehnologiji u procesovanju skroba za poboljšanje hrane, u farmaceutskoj, tekstilnoj, papirnoj i industriji detergenata (38,45,46). Komisija za klasifikaciju enzima svrstala je α -amilaze (1,4- α -D-glukan glukohidrolaze) prema hemijskoj reakciji koju katalizuju kao EC 3.2.1.1. Ovi enzimi katalizuju nasumičnu hidrolizu α -1,4-glukozydnih veza u škrobu, glikogenu i srodnim polisaharidima i oligosaharidima, pri čemu oslobađaju redukujuću grupu u α -konfiguraciji.

2.2.1.1 Klasifikacija α -amilaza

Klasifikacija enzima specifičnih za ugljene hidrate danas se zasniva na amino-kiselinskim sekvencijama i strukturnim sličnostima pre nego na supstratnoj specifičnosti

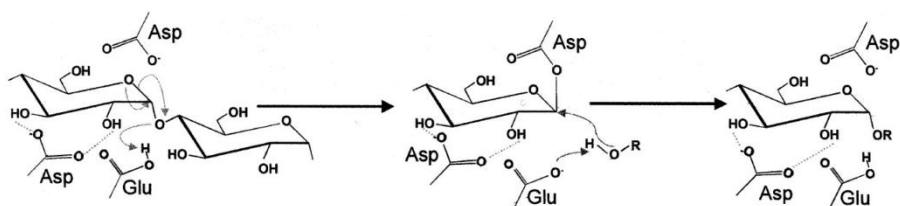
kao što je to klasifikovala Enzimska Komisija (EC). Ova klasifikacija koja je dostupna u bazi podataka CAZy (12) koja veoma bogat izvor informacija o glukohidrolazama i pomoćnim enzimima i omogućava kako otkrivanje evolutivnih veza među različitim GH familija tako i dobijanje mehanističkih informacija o enzimima. CAZy klasifikuje α -amilaze u nekoliko α -amilaznih familija od koji je glavna GH13 (koja zajedno sa familijama GH70 i GH77, formira klan GH-H), a zatim u familije GH57, GH119 i GH126 (u kojoj α -amilazna aktivnost nije u potpunosti potvrđena) (12,47). Familija GH13 trenutno sadrži više od 41 000 sekvencija i 40 subfamilija (12). Familija GH13 pored amilaza sadrži i druge brojne enzime koji imaju aktivnost hidroliza, transglikozidaza i izomeraza (47), tako da je predmet istraživanja mnogih studija čiji je cilj utvrđivanje jasne veze između enzimske sekvencije i osobina.

α -Amilaze su nađene u više od dvadeset subfamilija u okviru familije GH13 (47). Tipični primeri su: GH13_1 (α -amilaze iz gljiva), GH13_5 (otečnjavajuće α -amilaze iz bakterija), GH13_6 (α -amilaze iz biljaka), GH13_7 (α -amilaze iz araheja), GH13_15 (α -amilaze iz insekata), GH13_24 (α -amilaze iz životinja), GH13_27 (α -amilaze iz proteobakterija), GH13_28 (saharifikujuće α -amilaze iz bakterija), GH13_32 (α -amilaze iz bakterija), GH13_36 (intermedijarne α -amilaze koje se evolutivno nalaze između oligo-1,6-glukozidaza i neopululanaza), GH13_37 (α -amilaze iz morskih bakterija) i GH13_41 (α -amilaze sa α -amilaznim i pululanaznim domenom) (8,47,48). Od toga je određena struktura dvadeset tri različite α -amilaze (49).

2.2.1.2 Mehanizam katalize α -amilazom

α -Glikozidna veza sa brzinom spontane hidrolize od $2 \times 10^{-15} \text{ s}^{-1}$ na sobnoj temperaturi predstavlja jednu veoma stabilnu hemijsku vezu (50). Enzimi α -amilazne familije ubrzavaju ovu reakciju u toj meri da se mogu smatrati najefikasnijim enzimima.

Opšte prihvaćeni mehanizam katalize enzima α -amilazne familije jeste dvostruka izmena uz zadržavanje α -konfiguracije. Mehanizam uključuje dva katalitička ostatka u aktivnom mestu, glutaminsku kiselinu kao kiselo / bazni katalizator i jedan aspartat kao nukleofil (Slika 5).



Slika 5. Katalitički mehanizam familije α -amilaza uz zadržavanje α -konfiguracije.

Mehanizam se može opisati u pet koraka: (1) nakon vezivanja supstrata u aktivnom mestu, glutaminska kiselina u kiselom obliku donira proton kiseoniku iz glikozidne veze (kiseonik između dva molekula glukoze na poziciji -1 i $+1$ u aktivnom mestu), a nukleofini aspartat zatim napada C1 iz glukoze na poziciji -1 ; (2) formira se prelazno stanje slično oksokarbonijumovom jonu, a zatim i kovalentni intermedijer; (3) protonovani molekul glukoze na poziciji $+1$ napušta aktivno mesto, a u aktivno mesto ulazi molekul vode ili novi molekul glukoze koji napada kovalentnu vezu između molekula glukoze na poziciji -1 i aspartata; (4) ponovo se formira prelazno stanje slično oksokarbonijumovom jonu; (5) glutamat kao bazni katalizator prihvata vodonik iz novopridošlog molekula vode ili glukoze na mestu $+1$, dok kiseonik iz ovih novih molekula zamenjuje oksokarbonijum vezu između molekula glukoze na mestu -1 i aspartata formirajući novu hidroksilnu grupu na C1 u glukozi na poziciji -1 (hidroliza) ili novu glikozidnu vezu između glukoza na poziciji -1 i $+1$ (transglikovanje) (38,51). Kako je za katalizu neophodan glutamat i jedan aspartat, drugi aspartat iz katalitičke trijade najverovatnije učestvuje u distorziji supstrata i stabilizaciji prelaznog stanja (51).

Pored ove dve navedene konzervirane aminokiseline u katalitičkom mestu nalaze se i još neke značajne aminokiseline kao što su drugi aspartat, histidin, arginin i tirozin, koje su takođe konzervirane i igraju značajnu ulogu u pravilnom pozicioniranju supstrata u aktivnom mestu, ispravnoj orijentaciji nukleofila, stabilizaciji prelaznog stanja, i polarizaciji elektronske strukture supstrata (51–54). α -Amilaze sadrže 7 konzerviranih sekvencijskih regiona (47).

Za većinu α -amilaza prisustvo Ca^{2+} neophodno je za aktivnost, strukturni integritet ili stabilnost (55,56). U većini α -amilaznih struktura postoji Ca^{2+} vezujuće mesto locirano

između A i B domena u blizini aktivnog mesta (57). Ovi joni Ca^{2+} stabilizuju terciarnu strukturu uspostavljajući jonske mostove između A i B domena i na taj način štite enzim od denaturacije, inaktivacije toplotom ili proteolize (58,59).

2.2.1.3 Organizacija α -amilaznih domena

Karakteristično za enzime iz familije α -amilaza je što iako svi imaju isti mehanizam katalize međusobno se veoma razlikuju po supstratnoj specifičnosti i proizvodima koji nastaju. To se delimično objašnjava i njihovom terciarnom strukturom. Kod α -amilaza u najužem smislu ona se sastoji od tri različita domena (Slika 6). Glavni katalitički, visoko konzervirani, domen A ($(\beta/\alpha)_8$ TIM-burence) ima aktivno mesto u centru domena sa katalitičkom trijadom sastavljenom od dva aspartata i jednog glutamata. B domen viri iz burenceta kao duža petlja između β_3 niza i α_3 heliksa i nastavlja se u domen C, formiranjem antiparalelnog β -sendviča (38,47). Domen C predstavlja domen sa najmanjim stepenom konzerviranosti sekvencije u familiji GH13, formira strukturu antiparalelne β -cevi i sadrži C-terminus amilaze (47). Funkcija C domena nije poznata, iako se u mnogim studijama pokazuje da je neophodan kako za katalitičku aktivnost, tako i za vezivanje supstrata (60–62).

Fizička adsorpcija amilaza se često smatra neophodnim uslovom za hidrolizu sirovog skroba. Skrob se vezuje za enzim ili preko određenog domena za vezivanje skroba – SBD (eng. starch binding domain) na amilazama ili preko specifičnih aminokiselinskih ostataka na površini enzima — SBS (eng. surface binding sites) smeštenih van aktivnog mesta. U oba slučaja hidrofobni aminokiselinski ostaci interaguju s jednim ili više ostataka glukoze prisutnih u amilozi ili amilopektinu (9). Na Slici 6 prikazani su ilustrativni primeri različitih terciarnih struktura predstavnika familije GH13 α -amilaza uključujući i one koje imaju SBD i SBS identifikovane na osnovu kristalne strukture proteina sa vezanim oligosaharidima.

Enzimi koji imaju SBD pripadaju familiji modula koji vezuju ugljene hidrate (eng. carbohydrate binding modules — CBMs). CBM je definisana kao kontinualna aminokiselinska sekvencija, odnosno poseban domen koji nema katalitičku aktivnost već

se vezuje za ugljene hidrate, čime posledično poboljšava hidrolizu (12). Trenutno su SBD identifikovani u porodicama CBM 20, 21, 25, 26, 34, 41, 45, 48, 53, 58, 68, 69 i 74. Aminokiselinski ostaci, posebno aromatičnih aminokiselina kao što su triptofan i tirozin (ili fenilalanin) imaju eksperimentalno potvrđenu ulogu u vezivanju za različite ugljene hidrate (63). SBD pored svoje uloge u vezivanju za skrob ima ulogu i u izmeni strukture supstrata (64) omogućujući efikasniju hidrolizu tako što polimer više izlaže katalitičkom domenu. Iako su sličnosti u sekvenciji SBD-ova veoma male, na osnovu kristalnih struktura se ipak može zaključiti da SBD poseduje strukturu β -sendviča, što ukazuje na zajedničko evolutivno poreklo ka prepoznavanju skroba (65).

SBS mesta su opisana kao mesta na enzimu koja imaju nekoliko uloga, posebno kod enzimskih reakcija sa biološkim makromolekulima i supramolekulskim strukturama kao što su, npr. biljni ćelijski zid, hitin i skrobne granule (9). Funkcije SBS-ova su različite, kao što su navođenje amilaze na supstrat, usmeravanje skrobnih lanaca u aktivno mesto, poboljšanje procesivnosti, alosterna regulacija, oslobađanje oligosaharida, interakcije sa ćelijskim zidom i druge (66). SBS i CBM imaju slične funkcije i često kod enzima SBS nije zamena za CBM već funkcionišu zajedno (67). Skoro polovina do danas identifikovanih SBS pripadaju α -amilazama iz familije GH13 (9). Rezultati ukazuju na to da određeno SBS najčešće nije konzervirano kako među srodnim subfamilijama tako i unutar jedne subfamilije GH13, ali pitanje konzerviranosti funkcije među različitim SBS-ovima zahteva dodatna istraživanja (9).

2.3 α -Amilaze koje digestuju sirovi skrob (RSDA)

α -Amilaze kao RSDA su glavni enzimi hidrolize $\alpha(1,4)$ - glikozidne veze (9). Spadaju u najvažniju grupu RSDE, iako samo mali broj α -amilaza može da hidrolizuje sirovi skrob (1,4). Imajući u vidu da je često neophodna 1000 puta veća količina α -amilaza za efikasnu hidrolizu sirovog u odnosu na rastvorni skrob, kao što je pokazano na primeru α -amilaze iz ječma pri hidrolizi pšeničnog skroba (68) pronalaženje novih efikasnijih enzima i enzimskih varijanti je neophodno za industriju. Potencijalna industrijska primena kao i nova saznanja o ovim enzimima i njihovom pozitivnom dejstvu na ljudsko zdravlje

koje ostvaruju hidrolizom rezistentnog skroba u debelom crevu ljudi, doprinelo je otkriću i karakterizaciji velikog broja ovih enzima poslednjih decenija.

U Tabeli 1 prikazani su primeri različitih RSDA (oni koje su SBD, SBS, oba ili još uvek nije određeno) kao i uslovi ispitanih efiksanosti u hidrolizi različitih sirovih skrobova. Kvantitativno međusobno poređenje RSDA efiksanosti je veoma teško. Informacija o količinama enzima primenjenih u hidrolizi nije uporediva, zato što su enzimske aktivnosti određene različitim analizama. Samo oko 10% amilolitičkih enzima sadrži SBD (69) i iz Tabele 1 se vidi da α -amilaze bez SBD mogu da hidrolizuju skrob u koncentrovanim suspenzijama pa se prisustvo SBD ne može smatrati neophodnim uslovom za hidrolizu sirovog skroba.

U literaturi je 1945. godine opisana prva RSDA i to je α -amilaza iz svinjskog pankreasa (PPA) koja se u radovima kasnije koristila kao enzim za poređenje efiksanosti drugih RSDA i ona ima definisan SBS (70). 4D α -amilaza iz *Anoxybacillus contaminans* sadrži SBD i veoma efikasno hidrolizuje sirovi skrob na temperaturama nižim od temperature geliranja skroba. U kombinaciji sa glukoamilazom iz *Aspergillus niger* na temperaturi od 60°C postižu 99% hidrolize pšeničnog skroba u 33% suspenziji nakon 96 časova (71).

RSDA izolovana iz kvasca *Cryptococcus* sp. S2 (AMY-CS2) hidrolizuje sirovi skrob, adsorbuje se na skrobne granule i termostabilan je. Mutant AMY-CS2 bez SBD domena ne hidrolizuje sirovi skrob i nije termostabilan. SBD možda ima ulogu u termostabilnosti (72).

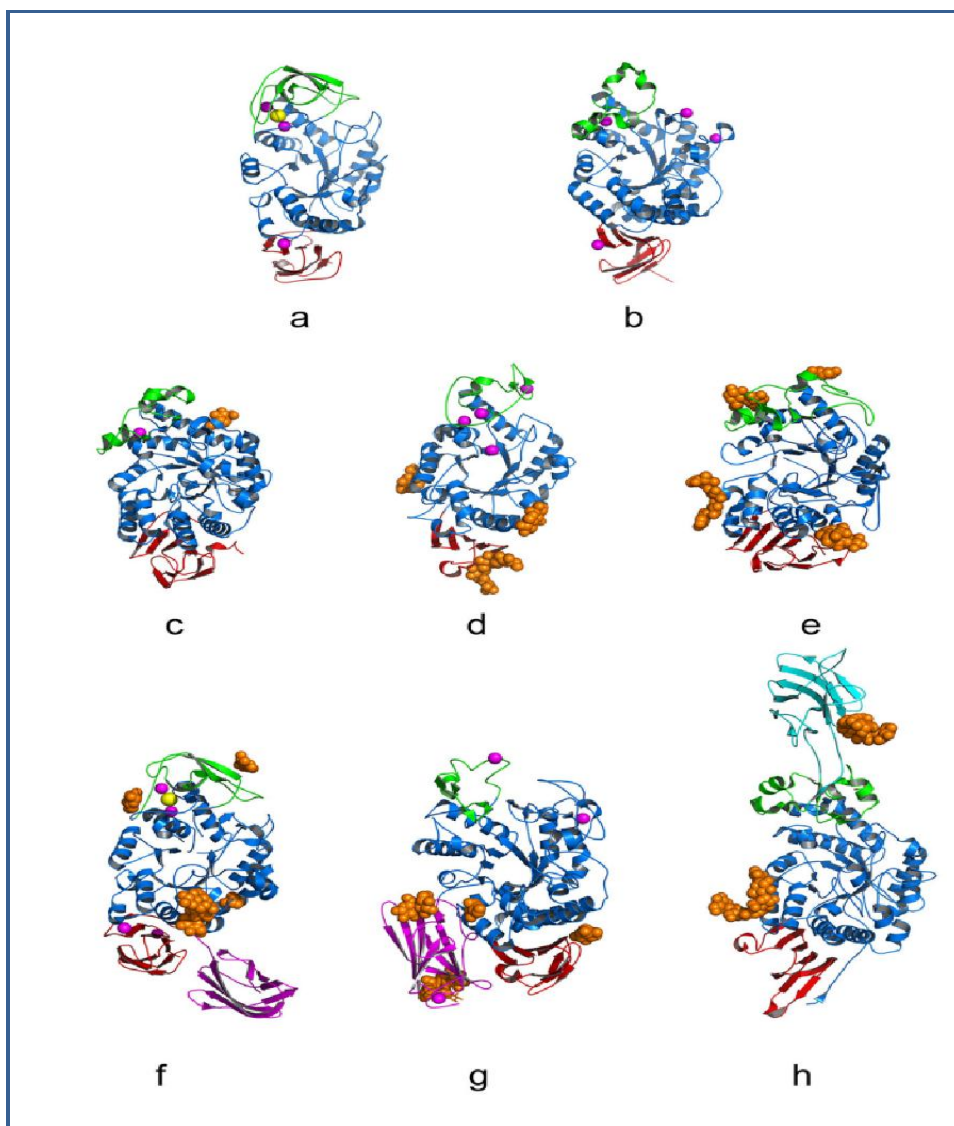
α -Amilaze iz *Bacillus* sp. IMD 435 (73), *Bacillus* sp. IMD 434 (74) i *Bacillus subtilis* 65 (75) mogu da hidrolizuje sirovi skrob, iako se ne adsorbuju na skrobne granule, što ukazuje na to da adsorpcija na skrobnim granuloma nije neophodna da RSDA hidrolizuju sirovi skrob. Za razliku od njih α -amilaza *Bacillus* sp. I-3, koja je visokoefikasna u hidrolizi sirovog skroba iz krompira u potpunosti se adsorbuje na skrobne granule (76).

Interesantne su α -amilaze za koje je pokazano da mogu da hidrolizuju koncentrovanu suspenziju sirovog skroba kao što su npr. amilaza iz *A. flavothermus* (AFA) koja sadrži SBD klasifikovan u CBM20 familiju (34) i modifikovana gljivična

rekombinantna amilaza iz *Rhizomucor sp.* fuzionisana sa CBM20 iz glukoamilaze *A. niger* (RA) (36). U toku četrdesetosmočasovne hidrolize RA se u značajnoj meri adsorbuje na skrob, a isto je pokazano i u kontrolnom eksperimentu za svinjsku pankreasnu α -amilazu (PPA). Iako PPA nema SBD, ima nekoliko SBS-ova (77), što bi moglo biti objašnjenje zašto se vezuje za skrob u istom odnosu kao enzim koji sadrži SBD. Međutim, RA je efikasnija u hidrolizi sirovog skroba u poređenju sa PPA, tako da se pretpostavlja da u ovom slučaju SBD utiče više na kinetiku hidrolize nego na adsorpciju (36). Ilustrativni primeri različitih GH13 RSDA prikazani su na Slici 6.

Jedan od najpoznatijih primera SBS u α -amilazama je mesto koje sadrži dva triptofana (Trp276 i Trp277) u AMY2 izoforni α -amilaze ječma (78). Ova dva triptofana se nalaze i kod α -amilaze *Geobacillus thermoleovorans* GTA (79) i GtamyII (80) kao Trp204 i Trp205.

Sve je veći broj objavljenih podataka o RSDA kodirajućim genima i RSDA enzimima iz ekstremofilnih mikroorganizama. Kisela i termostabilna rekombinantna α -amilaza (Gtamy) je prečišćena iz ekstremnotermofilnog soja *G. thermoleovorans*, predstavlja veoma retku kiselu α -amilazu sa velikom aktivnošću prema sirovom skrobu i istovremeno predstavlja izuzetak među kiselim amilazama tako što je inhibirana sa Ca^{2+} jonima (81), (Tabela 1).



Slika 6. Ilustrativni primeri različitih tercijskih struktura predstavnika familije GH13 α -amilaza uključujući i one koje imaju SBD i SBS indentifikovane na osnovu kristalne strukture proteina sa vezanim oligosaharidima. (a) GH13_5 α -amilaza iz *Bacillus licheniformis* (PDB: 1BLI), (b) neklasifikovana α -amilaza SK3-4 iz *Anoxybacillus* sp. (PDB: 5A2A), (c) GH13_1 α -amilaza iz *Aspergillus niger* (PDB: 2GVY), (d) GH13_6 α -amilaza izoforma 1 (AMY1) iz *Hordeum vulgare* (ječam) (PDB: 1P6W) u kompleksu sa supstratnim analogom, metil 4I,4II,4III-tri-tiomaltotetraozid (tio-DP4). (e) GH13_24 α -amilaza iz pljuvačke čoveka (PDB: 3DHP), (f) GH13_5 α -amilaza iz *Halothermothrix orenii* (PDB: 3BC9), (g) GH13_21 α -amilaza R-47 iz *Thermoactinomyces vulgaris* (PDB: 2D0G), (h) neklasifikovana α -amilaza SusG iz *Bacteroides thetaiotaomicron* (PDB: 3K8L). Pojedinačni domeni: katalitičko (β/α)8-burence, odnosno domen A - plavo, domen B - zeleno, domen C - crveno, N-terminalni CBM34 - purpurnocrveno i CBM58 - tirkizno. Joni Ca^{2+} su prikazani kao ljubičaste, a joni Na^{+} kao žute sfere. Oligosaharidi su prikazani kao narandžaste sfere da bi se jasnije videlo mesto vezivanja.

Tabela1. Pregled literature o hidrolizi sirovog skroba upotrebom RSDA.

| Poreklo | RSDA | Sirovi skrob | T (°C) | pH | Vreme (h) | Hidroliza (%) | |
|---|--|---|-----------|------|---------------|------------------|-------|
| Svinjski pankreas | α –amilaza | 2% pšenični skrob | 45 | 5,2 | 5 | 64 | (70) |
| <i>Anoxybacillus contaminans</i> | 4D α –amilaza | 33 % pšenični skrob | 60 | 4,5 | 96* | 90* | (71) |
| <i>Cryptococcus</i> sp | AMY-CS2 | 1% skrob iz krompira | 30 | 6,0 | 48 | 12 | (72). |
| <i>Bacillus</i> sp. IMD 435 | α –amilaza | 1% kukuruzni skrob 1% pirinčani skrob | 40 | 6,0 | 24 | 32 28 | (73) |
| <i>Bacillus</i> sp. IMD 434 | α -amilaza | 1% kukuruzni skrob 1% skrob iz krompira | 40 | 6,0 | 24 | 38 10 | (82) |
| <i>Bacillus subtilis</i> 65 | α -amilaza | 0.5% pšenični skrob 0.5% kukuruzni skrob 0.5% skrob iz krompira | 30 | 6,0 | 48 | 32 36 35 | (75) |
| <i>Bacillus</i> sp. YX-1 | α -amilaza | 20% kukuruzni skrob | 50 | 5,0 | 12 | 50 | (83) |
| <i>Bacillus</i> sp. I-3 | α -amilaza | 12,5% skrob iz krompira 15% skrob iz krompira | 70 | 7,0 | 12 | 80 64 | (76) |
| <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Spizizenii</i> | α -amilaza | 5% skrob iz krompira 15% skrob iz krompira | 60 | 7,0 | 6 | 47 35 | (84) |
| <i>Bacillus licheniformis</i> strain AS08E | rekombinantna α - amilaza (Blamy-I) bez SBD | 2% skrob semena kruške | 30 | 10,0 | 6 | 52 | (85) |
| <i>Anoxybacillus flavothermus</i> | rekombinantna α - amilaza (AFA), CBM 20 | 31% kukuruzni skrob | 61 | 4,5 | 2 48 96 | 60 77 77 | (34) |
| <i>Bacillus acidicola</i> i <i>Geobacillus thermoleovorans</i> | himerna α -amilaza (Ba-Gt-amy) | 25% pšenični skrob 25% kukuruzni skrob | 60 | 4,0 | 5 | 29 32 | (86) |
| <i>Bacillus aquimaris</i> | rekombinantna α - | 10% kukuruzni skrob | 37 | 6,5 | 24 | 1 | (87) |

| | | | | | | | |
|---|---|---|----|-----|----|-------------|------|
| MKSC 6.2 | amilaza (BaqA) | 10% casavin skrob | | | | 2 | |
| <i>Bacillus subtilis</i> S8-18 | α -amilaza | 5% kukuruzni skrob 5% skrob iz krompira 5% pšenični skrob | 60 | 6,0 | 24 | 3 3 7 | (88) |
| <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 9945a | rekombinantna α -amilaza (<i>BliAmy</i>) bez SBD, GH13_5 | 30% kukuruzni skrob | 60 | 6,5 | 24 | 91 | (89) |
| <i>Geobacillus Thermoleovorans</i> | rekombinantna α -amilaza (<i>Gt-amy</i>) | 30% kukuruzni skrob 30% pšenični skrob | 60 | 5,0 | 3 | 24 26 | (81) |
| <i>Geobacillus thermol.</i> | rekombinantna α -amilaza (<i>Gt-amyII</i>) | 30% kukuruzni skrob | 60 | 7,0 | 3 | 40 | (90) |
| <i>Geobacillus thermoleovorans</i> | α -amilaza | 15% kukuruzni skrob 20% kukuruzni skrob | 70 | 5,6 | 12 | 78 50 | (91) |
| <i>Rhizomucor</i> sp. | rekombinantna α -amilaza (RA) sa CBM20 iz glukoamil. <i>A. niger</i> | 31% kukuruzni skrob | 32 | 4,5 | 96 | 75 | (36) |
| <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> KZ | rekombinanta α -amilaza (<i>Sfamy KZ</i>), bez SBD, GH13_1 | 5% kukuruzni skrob | 30 | 5,6 | 48 | 3 | (92) |
| <i>Alicyclobacillus</i> sp. A4. | α -amylase (<i>AmyA4</i>) | 15% skrob iz krompira | 60 | 4,2 | 6 | 52 | (93) |

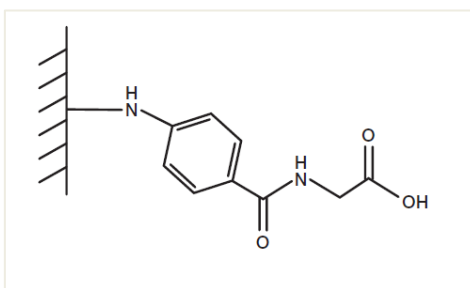
2.3.1 Dobijanje RSDA

Problemi koje bi trebalo rešiti pre nego što bi RSDA mogla da postane enzim izbora za industrijsku primenu su nizak prinos i visoka cena proizvodnje. Ovi problemi su značajno prevaziđeni u poslednjih nekoliko godina razvojem novih sojeva, pametnim dizajniranjem podloga za rast i optimizacijom koraka proizvodnje, kao i izborom odgovarajućih fermentacionih tehnika i tehnika za prečišćavanje proteina. Primer toga je i SSF (od eng. solid state fermentation) koja se tradicionalno koristi za fermentaciju gljiva, ali postoji rastuća tendencija korišćenja za bakterijske fermentacije zbog nekoliko prednosti, kao što su: veća produktivnost enzima, jednostavnost i sveukupno niži troškovi (84). Različiti poljoprivredni ostaci, bez ikakvih dopunskih hranljivih sastojaka, mogu se koristiti za dobijanje značajnih RSDA (94–96). Jedan od primera je i gajenje na celim i lomljenim zrnima tritikalea, pšenice i kukuruza gde je pokazano da se izoforme RSDA ne indukuju u svim testiranim uslovima (96) čime je pokazan značaj u izboru odgovarajuće čvrste podloge, ukoliko je cilj proizvodnja RSDA. Ovi i slični problemi u gajenju prirodnih izolata mikroorganizama mogu se prevazići produkcijom rekombinantnih enzima.

Rekombinantni enzimi se mogu proizvesti kao ekstracelularni ili intracelularni. Produkcija proteina na visokoj skali predstavlja jedan od glavnih izazova fermentacione biotehnologije. Ekstracelularna proizvodnja rekombinantnih proteina ima značajne prednosti naspram intracelularne proizvodnje: jednostavnije prečišćavanje proteina, povećana biološka aktivnost i stabilnost proteina. Efikasna ekstracelularna ekspresija u *E. coli* je danas moguća zbog primene različitih strategija sa različitim sekvencijama signalnih peptida. Nekoliko rekombinantnih RSDA je proizvedeno na ovaj način, na primer pomoću signalnog peptida OmpA (97) ili nativnog signalnog peptida (85). Na sličan način je proizvedena i ekstracelularna rekombinantna α -amilaza iz *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a (*BliAmy*) (98). Novi pristup zasnovan je na fuziji rekombinantnog prekursora za signalni peptid DsbA i usmeravanje na kotranslacioni SRP (eng. signal recognition-particle) zavisni put, pri čemu je ostvarena sekrecija potpuno aktivnog enzima (99).

Imobilizovana metal afinitetna hromatografija (IMAC) i druge afinitete hromatografije sa npr. skrobom ili β -ciklodekstrinom kao ligandima ili korišćenje samo skrobnih granula kao matriksa za vezivanje često pojednostavljaju proces prečišćavanja (100,101). S druge strane, čak i RSDA koje imaju SBD ne mogu uvek u potpunosti da se desorbuju, tj. prečiste ako se granule skroba koriste kao afinitetni matriks (102). Treba imati u vidu da je za kristalografske studije poželjno dobiti čist rekombinantni protein bez taga.

Jedna od mogućnosti u ovom slučaju je upotreba mešovitih matriksa. Takozvana „Mixed-mode“ hromatografija je veoma značajna za razvijanje procesa prečišćavanja rekombinantnih proteina, uz istovremeno koncentrovanje, uklanjanje pigmenata i prečišćavanje iz fermentacione tečnosti. Matriks koji se koristiti u ovom tipu hromatografija je dizajniran za višestruke interakcije pri prečišćavanju proteina. Pod određenim uslovima između proteina u rastvoru i stacionarne faze dolazi do većeg broja različitih interakcija, na primer i jonoizmenjivačkih i hidrofobnih. Jedan od matriksa ovog tipa je Nuvia cPrimeTM, hidrofobni katjonski jonoizmenjivač (Slika 7).



Slika 7. „Mixed-mode“ ligand za Nuvia cPrime matriks.

Nuvia cPrimeTM je mešoviti, hidrofobni-katjonsko izmenjivački matriks koji sadrži fenolni prsten koji učestvuje u hidrofobnim interakcijama i karboksilnu grupu koja izmenjuje katjone, Slika 7. Ovaj matriks u vezivanju proteina dakle kombinuje hidrofobne interakcije sa izmenom katjonskih grupa pri čemu prisustvo soli olakšava hidrofobne interakcije dok jonoizmenjivačke grupe omogućavaju pravilnu selektivnost. Ligandi ovog matriksa imaju tri glavne osobine: slabu karboksilnu grupu, aromatičan hidrofobni prsten, i amidnu vezu koja

služi kao potencijalni donor/akceptor vodonika. Kombinovani efekat ovih strukturalnih elemenata omogućava jedinstvenu selektivnost i dobru podnošljivost visokog konduktiviteta, omogućavajući efikasno prečišćavanje proteina pod blagim uslovima. Nuvia cPrime matriks je sačinjen od rigidnog, mehanički i hemijski stabilnog makroporoznog osnovnog nosača čija je veličina čestica optimizovana za izuzetan protok, uz brz transfer mase i visoku stabilnost (103,104).

2.3.2 Industrijski aspekti primene RSDA u hidrolizi sirovog skroba

Kako se u industriji prerade skroba obično koriste suspenzije koje sadrže oko 25—33% suve mase skroba, neophodno je pronaći amilaze efikasne u hidrolizi ovako koncentrovanih suspenzija. Postoji veoma malo objavljenih radova o amilazama koje imaju sposobnost da efikasno hidrolizuju koncentrovane suspenzije sirovog skroba, kako zbog inhibitornih efekata supstrata ili proizvoda na aktivnost enzima (83), tako i zbog potrebe za primenom većih doza enzima, koje se u laboratorijskim uslovima mogu dobiti tek nakon optimizacije soja i prečišćavanja. U Tabeli 1 je dat prikaz nekih amilaza efikasnih u hidrolizi koncentrovanih suspenzija skroba.

Pored potrage za novim prirodnim sojevima i pretrage sekvenciranih genoma i metagenomskih biblioteka, za napredak u oblasti važne su i brojne tehnike proteinskog inženjeringa kojima se poboljšavaju RSDA u smislu stabilnosti, aktivnosti ili dobijanja fuzija sa različitim CBM-ovima koje mogu uticati na karakteristike enzima. Fuzija može da poboljša katalitičku efikasnost, stabilnost, aktivnost, ekspresiju, sekreciju i rastvorljivost enzima (105). U jednom takvom istraživanju dobijen je himerni protein sastavljen iz dela gena za kiselu α -amilazu iz *Bacillus acidicola* (Ba-Amy) i parcijalnim N- i C-terminalnim regionima gena za termostabilnu α -amilazu iz *G. thermoleovorans* (GT-amy) (86). Ovaj himerni enzim Ba-Gt-amy je eksprimiran u *E. coli*, testiran na 25% sirovom pšeničnom i kukuruznom skrobu i dobijene su vrednosti hidrolize od 29,5% odnosno 32,3%, Tabela 1. Nativna α -amilaza Ba-Amy pri istim uslovima postigla je hidrolizu od 12% odnosno 8% (86).

Stabilizacija RSDA imobilizacijom i hemijskim modifikacijama se često koristi (106). Primera radi RSDA iz *Aspergillus carbonarius* je adsorbovana na Sepa® kuglicama

i umrežena glutaraldehydom što je dovelo do povećanja vrednosti K_M za sirovi skrob iz krompira i smanjenja V_{max} vrednosti. Isti enzim je kovalentno vezan za poliglutaraldehydom aktivirane Sepa kuglice, pri čemu je vrednost K_M neznatno opala, dok je vrednost maksimalne brzine porasla za 23%, čineći ovaj pristup veoma interesantnim za imobilizaciju enzima (107). Kovalentnom imobilizacijom na poliglutaraldehydom aktivirane hitozanske kuglice ista RSDA pokazala je poboljšanu temperaturnu stabilnost, kao i stabilnost pri skladištenju (108). S druge strane, RSDA iz kvasca *Saccharomycopsis fibuligera* R64 hemijski je modifikovana različitim modifikatorima, čime su poboljšane karakteristike enzima, a i dobijeno je mnogo korisnih informacija za enzimске strukturne studije (109).

2.3.3 Prehrambeni aspekti primene RSDA u hidrolizi sirovog skroba

Termička obrada hrane podrazumeva da ljudska ishrana uglavnom sadrži rastvorni skrob. Međutim pankreasna α -amilaza čoveka koja hidrolizuje skrob do oligosaharida u crevima, evoluirala je tako da degradira sirovi skrob. Iako je pankreasna α -amilaza detaljno izučena strukturno i kinetički na rastvornom skrobu, tek je nedavno okarakterisana prema sirovom skrobu (110). Autori su identifikovali pozicije i doprinose ključnih SBS-ova na površini enzima i pokazali da je vezivanje za granule skroba posredovano prvenstveno preko SBS7 koje sadrži hidrofobni džep sastavljen od Y276 i W284 (110). Isti strukturni region nalazi se i kod SBS α -amilaze iz ječma (Trp278 i Trp279) (111) Konzerviranost Trp284 izgleda da je važna jer je takođe identifikovana kao deo SBS kod pankreasne α -amilaze svinje (77).

Nedavno je okarakterisana neobična α -amilaza iz *Microbacterium aurum* B8.A (MaAmyA), koja formira pore u granulama skroba (112) je izolovana iz soja iz mulja fabrike za obradu skroba iz krompira (100). MaAmyA ima složenu strukturu sastavljenu od jednog katalitičkog domena, ali osim toga sadrži i dva CBM25 domena, četiri fibronektin domena tipa III (FNIII) i veliki C-terminalni domen. Funkcija svakog od ovih domena u hidrolizi sirovog skroba je ispitana nakon ekspresije mutanata dobijenih višestrukim delecijama strukture MaAmyA. Pokazano je da je formiranje pora na

granulama skroba kao i aktivnost na sirovi skrob posledica prisustva CBM25 domena. C-terminalni domen od 300 aminokiselina izgleda takođe ima funkcionalnu ulogu, jer njegovo prisustvo značajno utiče na veličinu pora, dok odsustvo prikazuje jasno smanjenje veličine pora na granulama skroba (112). Ovaj novi SBD je prvi predstavnik nove porodice CBM74 koji nesumnjivo pomaže MaAmyA u hidrolizi sirovog skroba (110).

2.4 Dizajn eksperimenta

Klasičan pristup izvođenja eksperimenata podrazumeva ispitivanje uticaja jedne promenljive na ponašanje sistema, dok se ostale promenljive ne menjaju. Na ovaj način, međutim, nije moguće utvrditi eventualno postojanje interakcija između promenljivih. Dizajn eksperimenta - DOE (od eng. Design Of Experiment), sa druge strane, omogućava istovremenu procenu većeg broja faktora koji mogu uticati na sistem korišćenjem minimalnog broja eksperimenata, uz istovremeno dobijanje dovoljne količine informacija o njihovom značaju i međusobnim interakcijama (113).

DOE je proces optimizacije koji ima potencijalno široku primenu u nauci, ali je još uvek nedovoljno primenjen. U literaturi najveći broj radova opisuje eksperimentalni dizajn primenjen u optimizaciji sastava podloge ili uslova rasta za postizanje optimalne fermentacije (114–118), dok mali broj radova primenjuju ovaj metod za optimizaciju posupka efikasne hidrolize različitih supstrata (119,120). Generalno DOE omogućava simultano variranje svih faktora i dobijanje velikog broja informacija o ispitivanom eksperimentu, uz relativno mali broj eksperimentalnih pokušaja. Na osnovu dobijenih podataka formira se odgovarajući matematički model za ispitivani proces. Model se može koristiti za razumevanje uticaja eksperimentalnih parametara na rezultat i može predvideti optimalne uslove procesa. Za razumevanje eksperimenta koji zavisi od niza faktora neophodno je ispitati uzajamne veze između faktora i rezultata eksperimenta (121).

Eksperimenti koji pripadaju grupi faktorijalnog dizajna, centralnog kompozitnog dizajna, kao i Box-Behnken dizajna, pripadaju grupi dizajna odgovornih (responsivnih) površina - RSM (od eng. Response Surface Methodology). U pitanju su tipovi eksperimentalnog dizajna koji omogućavaju uspostavljanje funkcionalne zavisnosti između

faktora i odgovora. Površine odgovora predstavljaju grafički prikaz odgovora sistema u funkciji ispitivanih faktora. Najčešće se uticaj dva faktora prikazuje kao površina u trodimenzionalnom prostoru. Ovo omogućava sagledavanje njihovog uticaja na odgovor sistema i pronalaženje optimalnih uslova.

2.4.1 Faktorijalni dizajn

Najvažniji eksperimentalni faktori i mogući opseg svake eksperimentalne promjenjive, kao polazna osnova procedure modelovanja, zasnovani su na literaturnom pregledu i prethodnim eksperimentima. Uz upotrebu faktorijalnog eksperimentalnog dizajna, moguće je dizajnirati eksperimentalnu postavku uz optimalne uslove procesa koji mogu dovesti do maksimalnog prinosa u procesu. U proceduri eksperimentalnog dizajna tri značajna koraka su:

- a) statistički dizajn optimalnih uslova istraživanog procesa,
- b) procena koeficijenata modela uz predviđanje odziva i
- c) statistička analiza.

Postoji niz metoda planiranja tj. dizajniranja eksperimenata, ali najčešće korišćen je 2k faktorijalni dizajn (Full Factorial Design ili pun faktorijalni dizajn).

Pun faktorijalni dizajn daje najpotpuniju sliku o uticaju faktora, s obzirom na to da se na ovaj način ispituju sve kombinacije faktora. Prvo se odrede faktori koji pokazuju statistički značajan uticaj na posmatrani odgovor. Promena odgovora se posmatra tako da se ispitani faktori nalaze na dva različita nivoa (2k označava k broj faktora na dva nivoa). Nivoi na kojima se ispituju faktori se označavaju kao njihovi domen. Mogu biti predstavljeni vrednostima sa mernim jedinicama (prave vrednosti) ili kao +1 i -1 (kodirane vrednosti). Svaki faktor se ispituje na dva nivoa: -1 i +1. Kombinacija svih faktora sa nivoima na kojima se nalaze u toku jednog eksperimenta se naziva kombinacija nivoa faktora.

Jednačina koja opisuje mode prvog reda za FFD ima oblik:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i \cdot X_i \quad (1)$$

gde je Y predviđeni odgovor, β_0 konstanta koeficijenta, β_i linearni koeficijent i X_i vrednost nezavisne promenljive.

Povećanjem broja ispitivanih faktora broj eksperimenata povećava se eksponencijalno. U eksperiment se uvode i centralne tačke (0 kodirana vrednost) i to zbog bolje procene greške i uočavanja eventualno prisutnog nelinearnog ponašanja modela u sredini ispitivanog intervala (113,122–124).

2.4.2 Kvadratni modeli: Centralni kompozitni dizajn i Box – Behenken-ov dizajn

Kvadratni model je najpogodniji za uspostavljanje veze između faktora i ispitivanog odgovora u toku optimizacije u većini slučajeva. Kada se ispituje uticaj promene dva faktora na odgovor sistema uspostavljanjem kvadratne zavisnosti dobija se odgovorna površina (eng. response surface). Izgled odgovornih površina odgovora može poslužiti za identifikovanje optimalnih regiona odgovora u zavisnosti od cilja koji je postavljen u toku optimizacije. Dizajni odgovornih površina su vrste eksperimentalnih dizajna koje omogućavaju uspostavljanje kvadratne funkcionalne zavisnosti između faktora i odgovora, kao što su centralni kompozicioni dizajn (CKD) i Box – Behenken-ov dizajn (BBD).

CKD ispituje faktore na 5 nivoa: $-\alpha$, -1 , 0 , $+1$ i $+\alpha$. Vrednost α za dizajn obično se bira tako da dizajn bude rotirajući tj. da sve ispitivane tačke budu jednako udaljene od centralne tačke. BBD predstavlja značajnu alternativu CKD-u jer zahteva manji broj eksperimenata i približno je rotirajući. Tačke se nalaze na sredini vrednosti „eksperimentalnog prostora”. Svi faktori se ispituju na tri nivoa. Nema tačaka u krajnjim vrednostima i zato je posebno koristan kada su ekstremne kombinacije nemoguće za eksperimentalno izvođenje ili nisu logične, npr. kod denaturacije enzima.

Iz dobijenih vrednosti rezultata za date kombinacije promenljivih moguće je uspostaviti kvadratnu zavisnost ispitivanog odgovora od promenljivih, jer su i CKD i BBD površine odgovora koji omogućavaju dobijanje ovakve zavisnosti. Za analizu modela koristi se jednačina drugog reda:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i \cdot X_i + \sum_{j=i+1}^2 \sum_{i=1}^2 \beta_{ji} \cdot X_i \cdot X_j + \sum_{i=1}^2 \beta_{ii} \cdot X_i^2 \quad (2)$$

gde je Y predviđeni odgovor, β_0 konstanta koeficijenta, β_i linearni koeficijent, β_{ij} interakcioni koeficijent, β_{ii} kvadratni koeficijent i X_i vrednost nezavisne promenljive.

Ovakva jednačina omogućava za svaku odabranu vrednost promenljivih izračunavanje faktora rezolucije između ispitivanih supstanci bez izvođenja eksperimenata. Konstruisanjem površine odgovora, moguće je uočavanje regiona gde je faktor rezolucije maksimalan i u toj oblasti grafički se očitava vrednost datih promenljivih.

Na osnovu koeficijenata polinoma može se proceniti uticaj koji faktori i interakcije imaju na odgovor: predznak + ukazuje da se povećanjem vrednosti faktora povećava i odgovor dok predznak - ukazuje da se smanjenjem vrednosti faktora smanjuje i odgovor. Što je veća apsolutna vrednost koeficijenta, to je veći uticaj datog faktora ili interakcije. Značaj tog uticaja može se proceniti statistički Studentovim t testom. Softverski paketi automatski računaju statističku značajnost koeficijenata i ukazuju na značajne faktore i interakcije (113,121,125,126).

2.4.3 Statistička analiza modela

Optimizacija je moguća samo ako dobijeni matematički model zaista tačno opisuje ispitivani sistem. Pouzdanost modela mora se prvo potvrditi statističkim parametrima. Izračunava se vrednost R^2 koji pokazuje koji deo ukupnog variranja odgovora može da se opiše matematičkim modelom. Ako se dobije velika vrednost R^2 (oko 0,90) to znači da je matematički model zaista dobro opisao ispitivani odgovor, tj. da je odgovor pod velikim uticajem variranja ispitivanih faktora. Ako se dobije mala vrednost R^2 (oko 0,2) to znači da odgovor varira relativno nezavisno od ispitivanih faktora. Mala vrednost R^2 pokazuje da model ne opisuje sistem adekvatno i da se ne može koristiti. Međutim, variranja koja model ne može da objasni mogu poticati i od eksperimentalne greške koja je neizostavna, a ne samo od neadekvatnosti modela.

Za procenu eksperimentalne greške neophodne su replikacije i one se najčešće rade u centralnoj tački. Lack of Fit test procenjuje koji deo variranja odgovora ne zavisi od

modela već potiče od eksperimentalne greške. Može se ispostaviti da su sa faktorskim promenama neobjašnjiva variranja odgovora zapravo posledice čiste eksperimentalne greške, tako da će model u tom slučaju biti dobar. Da bi se smatrao pouzdanim, matematički model mora pokazati velike vrednosti R^2 i Lack of Fit vrednost koja statistički nije značajna. Takođe, zaključke možemo doneti i na osnovu P-vrednosti, koja predstavlja verovatnoću, uz pretpostavku da je nulta hipoteza tačna. Ako je P-vrednost testa mala (u odnosu na odabrani nivo značajnosti α), nulta hipoteza se odbacuje. Nulta hipoteza je zapravo hipoteza o nepostojanju razlike, a nivo značajnosti (α nivo) je maksimalno dozvoljena verovatnoća greške pod direktnom kontrolom istraživača (113,121).

2.4.4. Primena u eksperimentalnom radu

Prednost ove metodologije je u tome što je jeftinija i jednostavnija za rad od klasičnih metoda i uspešno se primenjuje u optimizaciji mnogih biohemijskih procesa kao što su enzimске hidrolize različitih supstrata (89,119,120,127,128) i prečišćavanje proteina (125,129). Komercijalno dostupni softveri kao što je Design-Expert, koriste se za kreiranje eksperimentalnog dizajna, za dobijanje modela i za prikaz dobijenih podataka.

2.5 Proizvodnja bioetanola iz sirovog skroba

Proizvodnja bioetanola iz sirovog skroba podrazumeva optimizaciju multifaktornog eksperimenta u kojem svi faktori, poput koncentracije supstrata, količine enzima, pH, temperature i vremena inkubiranja mogu imati značajnu ulogu. DOE je odličan način za identifikaciju faktora koji su najvažniji i za pronalaženje optimalnih uslova za dobijanje maksimalne hidrolize za što kraće vreme uz upotrebu minimalne količine enzima (95,135).

Upotreba etanola kao tečnog biogoriva predstavlja jedan od najznačajnijih alternativnih rešanja za zamenu fosilnih goriva. Bioetanol je alternativno gorivo koje se dobija fermentacijom iz obnovljivih sirovina, fermentacijom šećera prisutnih u biomasi ili šećera dobijenih prethodnom konverzijom sastojaka biomase. Obnovljive sirovine koje se koriste za dobijanje bioetanola mogu biti šećer, skrob, lignoceluloza i alge. Etanol dobijen

iz šećera i skroba je bioetanol prve generacije, dobijen iz lignoceluloze bioetanol druge, a onaj iz algi bioetanol treće generacije. Produkcija bioetanola treće generacije još uvek je u fazi razvoja na laboratorijskom nivou, dok su bioetanol prve i druge generacije dostigli komercijalnu skalu (130). Sirovine koje se najčešće koriste u proizvodnji etanola su kukuruz, šećerna trska i šećerna repa. S obzirom na to da se bioetanol koristi kao zamena za fosilno gorivo ili kao dodatak motornom benzinu, ovo gorivo predstavlja jednu od strateški važnih sirovina. (131). Bioetanol predstavlja odličan, netoksičan dodatak kojim se može povećati oktanski broj fosilnih goriva. Oktanski broj je merilo kvaliteta goriva i bazira se na sposobnosti goriva da sagoreva ravnomerno. S obzirom na to da etanol u molekulu sadrži kiseonik, sagorevanje komponenata benzina je potpunije, smanjena je emisija ugljen-monoksida, toksičnih supstancija kao što su aromatična organska jedinjenja i nivoa ugljovodonika koji ne sagorevaju (132)

Za proizvodnju bioetanola se mogu koristiti svi polisaharidi (skrob, dekstrini, inulin, hemiceluloza, celuloza) koji se mogu razgraditi do šećera koje kvasac može da fermentiše, a to su glukoza, fruktoza, saharoza i maltoza. Najznačajnija sirovina za industrijsku proizvodnju bioetanola je skrob (131). Obrada skroba predstavlja energetski skup proces zbog utroška velike količine energije u zagrevanju skroba prilikom geliranja. Robertson i koautori (1) su izračunali da energetski utrošak zagrevanja do visokih temperatura neophodnih za konvencionalni proces iznosi 10–20% finalne cene bioetanola. Zato je danas sve veći broj istraživanja posvećen pojeftinjenju procesa obrade skroba. Upotreba enzima koji mogu da hidrolizuju skrob na nižim temperaturama, tj. dok je on u obliku sirovih granula, jedan je od načina da se sačuva utrošak energije i pojeftini proces (3).

Hidroliza sirovog skroba se još naziva i hidroliza skrobnih granula, hladna hidroliza, hidroliza nativnog skroba ili hidroliza skroba na sub-gelirajućoj temperaturi i smatra se velikim probojem u industriji obrade skroba omogućavajući smanjenje ukupnih troškova, uštedu u energiji i efikasno iskorišćavanje bioresursa (1–3). Prvi put je publikovana još četrdesetih godina prošlog veka (133), ali je tek sedam decenija kasnije primenjena na velikoj skali (3), što je omogućeno razvojem enzimskog koktela za hidrolizu sirovog skroba zbog čega su kao rezultat kapitalni troškovi smanjeni za oko 41%, a

operativni troškovi za oko 51%, dok je ukupan prinos uvećan zbog odsustva neželjenih reakcija (npr. Maillard-ove reakcije) (3). Glavna grupa enzima u procesu hladne hidrolize podrazumeva amilolitičke enzime (endo- i egzo-amilaze, degranajući enzimi) koje deluju sinergistički u razgradnji skroba. Važno je napomenuti da i druge, u ovom slučaju takozvane pomoćne hidrolaze, takođe imaju važnu ulogu u ovom procesu u kojem se obično kreće od celog crna žitarica pa je dodatak celulaza, ksilanaza i proteza neophodan za obezbeđivanje bolje izloženosti skroba amilazama.

Poslednje decenije, produkcija bioetanola hladnom hidrolizom skroba privukla je pažnju vodećih kompanija u Americi koje su zajedno sa proizvođačima enzima razvile specifičnu produkciju etanola na nižim temperaturama, i to su Genecor International Inc. (danas DuPont) sa svojim proizvodom Stargen™ i Novozymes sa svojom tehnologijom licenciranom sa Poet LLC proizvodima kao brend BPX™ (Broin Project X) (134).

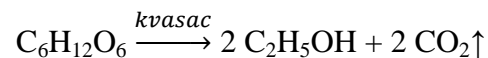
U literaturi postoji veliki broj radova koji opisuju postupke optimizacije dobijanja bioetanola hladnom hidrolizom granularnog skroba. Optimizacije postupaka se veoma razlikuju u zavisnosti od toga da li se koriste procesi u kojima je hidroliza definisanim amilazama i glukomilazama ili enzimskim ekstraktom (kompleks hidrolaza), odvojena od fermentacije (eng. separate hydrolysis and fermentation – SHF) ili je proces simultana saharifikacija i fermentacija (eng. simultaneous saccharification and fermentation – SSF) (3).

Višestruke su prednosti produkcije bioetanola naročito ako se dobija simultanom saharifikacijom i fermentacijom na 30°C što je temperatura koja odgovara fermentaciji kvasaca. Glavne prednosti su niži kapitalni i operativni troškovi investicija; manipulacija sa tečnostima manjeg viskoziteta nego kad je u pitanju gelirani skrob što poboljšava mešanje, pumpanje i omogućava proširenje kapaciteta opreme, i izostanak neželjenih Maillard-ovih reakcija koje se dešavaju na visokim temperaturama.

Najveća mana hladne hidrolize je cena enzima koji se dodaju nekoliko redova veličine puta više nego u konvencionalnom procesu, kao i mogućnost mikrobiološke kontaminacije jer su žitarice prirodno kontaminirane, a u konvencionalnom postupku visoka temperatura je ujedno i sterilizacija. Takođe kinetika procesa je manje favorizovana jer enzimi rade na temperaturama ispod svojih optimalnih.

Da bi se proces hladne hidrolize u budućnosti primenjivao sa većom efikasnošću neophodno je nastaviti sa pobljšanjima svih koraka (3) u šta spada i razvoj enzima; razvoj novih sojeva žitarica koje će eksprimovati amilaze za proces; potapanje zrna u rastvor proteaza pre frakcioniranja tzv enzimsko mlevenje; vakuum fermentacija u kojoj se etanol kontinualno uklanjanja iz fermentora radi eliminacije inhibicije kvasaca proizvodom; dinamička kontrola koncentracije glukoze tako da se obezbedi optimalna, jer prevelika izaziva osmotski stres, a premala trošenje na metabolizam kvasca.

Alkoholna fermentacija u kojoj dolazi do biohemijske transformacije ugljenih hidrata, prvenstveno monosaharida glukoze, u etanol i ugljen-dioksid, pod anaerobnim uslovima:



To znači da se od 1 kg glukoze teorijski može dobiti 0,51 kg etanola i 0,49 kg ugljen-dioksida. U realnom slučaju prinos alkohola i ugljen-dioksida je nešto manji i zavisi od više faktora kao što su: vrsta šećera koji se fermentiše, korišćeni proizvodni mikroorganizam i primenjeni procesni uslovi. U dobro koncipiranim postupcima stvarni prinos se kreće oko 90—95% od teorijskog prinosa (135,136).

Na odvijanje i efikasnost procesa fermentacije utiču brojni faktori kao što su: temperatura, pH, sastav supstrata, mešanje, koncentracija nutrijenata potrebnih za metabolizam proizvodnog mikroorganizma, prisustvo inhibitora u podlozi, kontaminacija hranljive podloge drugim mikroorganizmima kao i karakteristike samog proizvodnog mikroorganizma (137).

Sastav supstrata direktno utiče na fiziološka svojstva kvasca od kojih zavisi dinamika procesa fermentacije i kvalitet gotovog proizvoda. Optimalna koncentracija fermentabilnih šećera za odvijanje alkoholne fermentacije kreće se od 15 do 18%, a fermentacija se nesmetano može odvijati sve dok je koncentracija ovih šećera niža od 25% (138,139).

Radi racionalnije proizvodnje etanola, potrebno je da u hidrolizatu kukuruznog skroba bude što veća koncentracija fermentabilnih šećera. Međutim, koncentrovani

hidrolizati se sporije fermentišu zbog delovanja nepovoljnih faktora, kao što su: povećana gustina, povećana koncentracija alkohola koja deluje inhibitorno, veći pritisak i veća koncentracija ugljen-dioksida. Da bi se navedeni problemi ublažili, povećava se količina starter kulture, revitalizuje se kvasac pre zasejavanja i dodaju se zaštitnici od osmoze. Za očuvanje vitalnosti kvasca preporučuje se da se kvasac recirkuliše ili da se pre zasejavanja revitalizuje. Da bi se umanjilo nepovoljno delovanje visokog osmotskog pritiska i povećane koncentracije alkohola, vršena su ispitivanja mogućnosti zaštite vitalnosti kvasca dodatkom pojedinih zaštitnih supstanci. Utvrđeno je da glicin, prolin i glicin-betain značajno umanjuju osmotski šok kod kvasca i ubrzavaju asimilaciju glukoze (137).

3. NAŠI RADOVI

Skrob je glavni polisaharid mnogih industrijski važnih biljaka (kukuruz, pšenica, ovas, pirinač i krompir). Različiti industrijski procesi poput konverzije skroba za dobijanje glukoznih, fruktoznih i maltoznih sirupa ili dobijanje bioetanola podrazumevaju hidrolizu sirovog skroba. Oni obično koriste koncentrovane suspenzije skroba od 25 do 33%, pa je u tom smislu važno istraživanja bazirati na ispitivanju RSDA koje su u stanju da efikasno hidrolizuju ovako koncentrovan sirovi skrob. Efikasan proces hidrolize podrazumeva maksimalan procenat hidrolizovanog skroba, uz minimalnu cenu. Drugim rečima, potrebno je postići maksimalno efikasnu hidrolizu za što kraće vreme uz upotrebu minimalne doze enzima.

α -Amilaza iz *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a (*BliAmy*) pokazala se kao veoma efikasna RSDA u hidrolizi granularnog skroba ispod temperature geliranja. *BliAmy* nema SBD tako da je potrebno razjasniti koje aminokiseline na površini enzima, a van aktivnog mesta čine SBS i doprinose efikasnoj hidrolizu koncentrovanog sirovog skroba. Detekcija eventualnih SBS mogla bi da utiče na inženjering novih, efikasnijih varijanti enzima efikasnih u hidrolizi sirovog skroba, bez potrebe da se mutiraju amino kiseline u aktivnom mestu.

Radi ispitivanja mogućnosti primene rekombinantno dobijene α -amilaze *BliAmy* u hidrolizi koncentrovanog sirovog kukuruznog skroba, kao i radi doprinosa novim saznanjima o strukturnim karakteristikama enzima postavljeni su sledeći ciljevi ovog rada:

- Razvoj efikasnog i reproduktivnog procesa za dobijanje potrebne količine rekombinantnog proteina kroz dizajn medijuma za rast mikroorganizma, optimizaciju koraka u proizvodnji *BliAmy* i izbor pogodnih tehnika fermentacije, s obzirom na to da je to prvi preduslov industrijske primene biotehnološkog proizvoda.
- Optimizacija industrijskog aspekta procesa hidrolize koncentrovane suspenzije sirovog kukuruznog skroba statističkom metodom odgovornih površina.

- Optimizacija novog postupka simulatane hidrolize i saharifikacije skroba α -amilazom *BliAmy* i komercijalnom glukoamilazom za dobijanje bioetanola.
- Razvoj efikasne metode za prečišćavanje rekombinantne *BliAmy* direktno iz fermentacione tečnosti u jednom koraku.
- Racionalni dizajn *BliAmy* radi identifikacije mogućih SBS-ova značajnih za adsorpciju na skrobne granule kao i za hidrolizu.

3.1 Produkcija rekombinantne α -amilaze *BliAmy* u bioreaktoru

Rekombinantna amilaza *BliAmy* dobijena je ranijim radovima ove laboratorije. Gena za α -amilazu soja *Bacillus licheniformis* ATCC9945a je kloniran u ekspresioni vektor pDAss (konstruisan iz pTRC99 (140)), u kojem je rekombinantni prekursor fuzionisan sa signalnim peptidom proteina DsbA, dobro okarakterisanog periplazmatskog proteina *E. coli* čime je omogućena sekrecija rekombinantnog proizvoda. Dobijenim vektorom pDA-amy transformisane su *E. coli* BL21 (DE3) ćelije (99).

Preinokulum ćelija *E. coli* BL21 pDA-amy dobijen je gajenjem kulture iz glicerolskog štoka u LB (Luria-Bertani) podlozi. Prebacivanjem preinokuluma u definisani medijum dobijen je inokulum ćelija koji je zatim prebačen u bioreaktor sa definisanim medijumom. Nakon 16 sati koliko je trajala šaržna fermentacije (“batch”) ćelije su gajene u semikontinualnom modu dodavanjem svežeg definisanog medijuma (“fed-batch”).

Glavni uslovi fermentacije za dobijanje ćelija visoke gustine su kontrolisano konstantno snabdevanje izvorom ugljenika u eksponencijalnoj fazi rasta i dovoljna koncentracija kiseonika. Na ovaj način moguće je dobiti veći prinos rekombinantnog enzima. Tokom fermentacije u bioreaktoru specifična stopa rasta je održavana na konstantnoj vrednosti uz pomoć eksponencijalnog dodatka hranljivog medijuma koji je izračunat prema jednačini kinetike bilansa mase i potrošnje supstrata (141):

$$V_{ad}(t) = \frac{1}{S_0} \cdot \left(\frac{m_{sx}}{\mu_{fix}} + \frac{1}{Y_{xs}} \right) \cdot X(t) \cdot V(t) \cdot (\exp(\mu_{fix} \cdot \Delta t) - 1) \quad (3)$$

gde su: V_{ad} - zapremina rastvora supstrata koja se dodaje u fermentoru u određenom vremenskom intervalu (dm^3),

S_0 – koncentracija supstrata u rastvoru koji se dodaje u fermentoru,

m_{sx} – koeficijent održavanja supstrata ($\text{g substrate g DCW}^{-1} \text{ h}^{-1}$),

μ_{fix} – specifična brzina rasta u datom vremenu (h^{-1}),

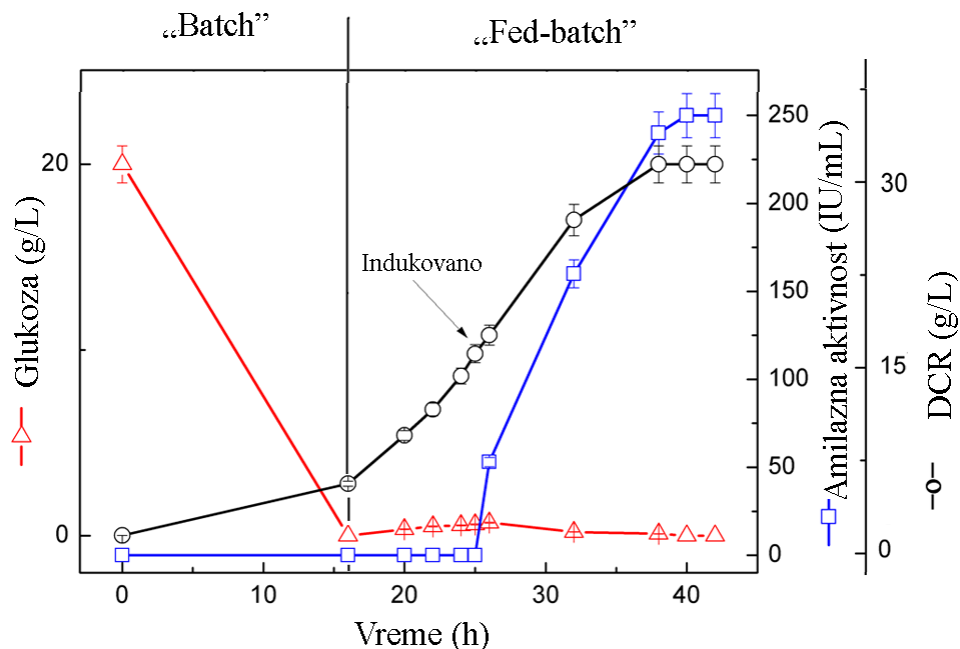
Y_{xs} – prinos supstrata ($\text{g DCW g supstrat}^{-1}$),

$X(t)$ – koncentracija biomase u datom vremenu (g DCW dm^{-3}),

$V(t)$ – zapremina kulture u bioreaktoru u datom vremenu (dm^3),

Δt – vremenski interval (h).

Za postizanje ćelija *E. coli* visoke gustine urađena je semikontinualna („fed-batch”) fermentacija uz dvostepeno dodavanje supstrata. U prvom koraku, tokom preindukcione faze, brzina dodavanja supstrata (glukoze) je eksponencijalna povećavana, prema ranije opisanom modelu (142), a rast ćelija je kontrolisan konstantnom specifičnom brzinom rasta ($\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$). Kada je suva masa ćelija dostigla 15 g L^{-1} (što je srednja vrednost eksponencijalne faze rasta ćelija), ćelije su indukovane dodatkom inducera izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozida (IPTG) u finalnoj koncentraciji od $0,2 \text{ mM}$. U drugom koraku, post-indukcionoj fazi, brzina dodavanja glukoze je održavana konstantnom (15 mL x h^{-1}). Niža konstantna brzina dodatka supstrata primenjena je zbog sprečavanja nagomilavanja hranjivih materija u medijumu usled promene fiziologije i metabolizma u ćeliji domaćina nakon indukcije (89). Dodavanjem supstrata i nakon indukovanja, omogućen je dalji rast ćelija tako da je na kraju procesa suva masa ćelija iznosila 58 g (Slika8).



Slika 8. Semikontinualna fermentacija *E. coli* BL21(DE3)/pDA-amy. (-○-) – suva masa ćelija, (-□-) – enzimska aktivnost, (-△-) – koncentracija glukoze. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost tri merenja (standardna greška je bila manja od 5 %). Strelicom je prikazano vreme indukcije.

Temperatura indukcije je važan parametar za proizvodnju rekombinantnog proteina u *E. coli* (143,144). Indukcija pri 25 °C je pokazala najveći ukupan prinos amilaze u našem prethodnom radu (99). Ovo sugerise da niža temperatura olakšava uvijanje u pravilnu konformaciju i funkcionalnost proteina, a time se poboljšava produktivnost amilaze.

Amilazna aktivnost se izražava u internacionalnim jedinicama, IU. Jedna internacionalna jedinica amilaze je ona količina enzima koja oslobodi 1 μmol redukujućeg šećera (obračunato na maltozu) u jednom minutu na datoj temperaturi. Jednačina za izračunavanje amilazne aktivnosti (IU/mL) je:

$$C_e = \frac{C_{r\check{s}} \times V_{rs}}{t_{min} \times V_e} \times R \quad (4)$$

gde su: C_e – enzimska aktivnost u IU,

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

V_{rs} – zapremina reakcione smeše,

t_{\min} – vreme trajanja eseja,

V_e – zapremina enzima,

R – razbalaženje.

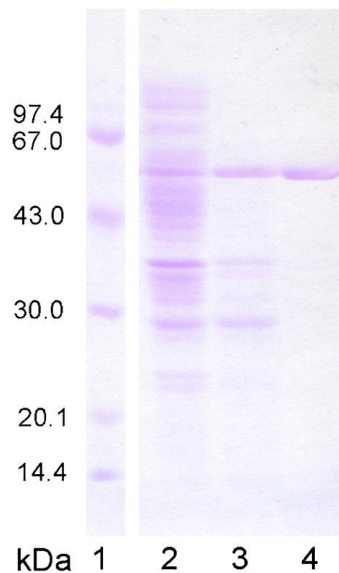
Ovim postupkom gajenja postignuta je ukupna amilazna aktivnost od 250,5 IU mL⁻¹, koja je 7 puta veća nego u „batch” fermentaciji. Ukupni prinos enzima je bio 0,7 g L⁻¹ što je omogućilo dovoljnu količinu enzima za optimizaciju procesa hidrolize visoko koncentrovane suspenzije skroba.

3.2 Prečišćavanje rekombinantne *BliAmy*

U industriji skroba nije neophodno koristiti amilaze visoke čistoće. Najčešće se koriste preparati sirovih ili delimično prečišćenih enzima. Međutim za utvrđivanje eventualnih razlika u efikasnosti u adsorpciji i hidrolizi koncentrovanog sirovog skroba između delimično prečišćenog i čistog enzimskog preparata, bilo je potrebno prečistiti enzim.

S obzirom na to da je za razliku od proteina *E. coli BliAmy* izrazito termostabilan (98,99), bilo je moguće delimično prečistiti enzim vrlo brzo i jednostavno termostatiranjem fermentacione tečnosti na 60°C tokom jednog časa, a zatim centrifugiranjem da bi se uklonili istaloženi balastni proteini (Slika 9). Potpuno čist *BliAmy* je dobijen jonoizmenjivačkom hromatografijom na koloni Q Sepharose na FPLC sistemu (Pharmacia, Uppsala). Čistoća dobijenih enzimskih frakcija upoređena je sa polaznim sirovim uzorkom SDS PAG elektroforezom (Slika 9).

Poređenjem čistog i delimično prečišćenog enzima u efikasnosti hidrolize i adsorpciji na sirove granule skroba pokazano je da je čistoća preparata *BliAmy* bila bez efekta, pa je u daljem eksperimentalnom radu korišćen delimično prečišćen *BliAmy*. Činjenica da amilaza može lako da se izoluje kao obogaćena frakcija jednostavnim grejanjem fermentacione tečnosti mogla bi da olakša masovnijiu proizvodnju ovog biokatalizatora smanjujući troškove proizvodnje kojima značajno doprinose hromatografske kolone i matriksi na velikoj skali (145).



Slika 9. SDS PAGE analiza, (1) molekularni markeri (2) fermentaciona tečnost, (3) *BliAmy* delimično prečišćen toplotom i (4) *BliAmy* prečišćen na Q-Sepharose.

3.3 Statistička optimizacija promenljivih u procesu hidrolize sirovog skroba korišćenjem *BliAmy*

Optimizacija hidrolize sirovog kukuruznog skroba metodom odgovornih površina (RSM) podrazumeva pronalaženje vrednosti promenljivih (X) kojima se poboljšava proces pri čemu je obim poboljšanja određen prema unapred definisanim kvantitativnim kriterijumima. U cilju pronalaženja optimalnih promenljivih, urađena je statistička optimizacija svih značajnih promenljivih koje utiču na proces: količina enzima (X_1), količina skroba (X_2) i vreme inkubacije (X_3).

3.3.1 Potpuni faktorijalni dizajn

FFD sa analizom svih promenljivih na dva nivoa je najčešće korišćeni eksperimentalni dizajn kada je broj promenljivih manji od pet. FFD procenjuje istovremeno glavne efekte promenljivih i njihove interakcije (113,146). U ovom radu FFD

je korišćen u prvoj fazi optimizacije u cilju pronalaženja optimalne okvirne vrednosti svih promenljivih u hidrolizi (Tabela 2).

Tabela 2. Prikaz eksperimenata za FFD sa datim promenljivima u kodirajućim i realnim vrednostima sa dobijenim i predviđenim rezultatima.

| Redosled eksperimenata | X ₁ Količina enzima (IU/mg) | X ₂ Količina supstrata (%) | X ₃ Vreme inkubacije (h) | Y Procenat hidrolize (%) | |
|------------------------|---|--|--|-----------------------------|---------------------|
| | | | | Dobijena vrednost | Predviđena vrednost |
| 1 | -1 (0,18) | -1 (18) | -1 (3) | 20,0 | 20,0 |
| 2 | 1 (3,78) | -1 (18) | -1 (3) | 42,7 | 42,5 |
| 3 | -1 (0,18) | 1 (34) | -1 (3) | 16,0 | 9,8 |
| 4 | 1 (3,78) | 1 (34) | -1 (3) | 30,0 | 32,2 |
| 5 | -1 (0,18) | -1 (18) | 1 (23) | 46,6 | 44,3 |
| 6 | 1 (3,78) | -1 (18) | 1 (23) | 68,6 | 66,7 |
| 7 | -1 (0,18) | 1 (34) | 1 (23) | 29,8 | 34,1 |
| 8 | 1 (3,78) | 1 (34) | 1 (23) | 60,9 | 56,5 |
| 9 | 0 (1,98) | 0 (26) | 0 (13) | 34,0 | 38,3 |
| 10 | 0 (1,98) | 0 (26) | 0 (13) | 35,0 | 38,3 |
| 11 | 0 (1,98) | 0 (26) | 0 (13) | 39,0 | 38,3 |
| 12 | 0 (1,98) | 0 (26) | 0 (13) | 36,0 | 38,3 |
| 13 | 0 (1,98) | 0 (26) | 0 (13) | 37,0 | 38,3 |
| 14 | 0 (1,98) | 0 (26) | 0 (13) | 40,0 | 38,3 |

Početne vrednosti promenljivih su određene na osnovu preliminarnih eksperimenata u kojima je pokazao da se može postići 100% hidrolize ukoliko se koriste niže koncentracije skroba (npr. 1 %). Poređenja radi, novije opisane i okarakterisane RSDA nisu dostizale 100%-nu hidrolizu 1%-nog skroba u testiranim uslovima (87,147) a samo je α -amilaza iz *Geobacillus thermoleovorans* (soj PizzoT) hidrolizovala 99 % 1 %-nog sirovog skroba nakon 3 sata (91). Za visoke koncentracije skroba (> 20%) nije bilo izvesno da li je potpuna hidroliza uopšte moguća, te su iz tog razloga količina enzima i vreme inkubacije u FFD predviđeni na osnovu preliminarnih eksperimenata sa 1% skrobom.

Na osnovu dobijenih rezultata postavljen je model prvog reda koji se može prikazati sledećom jednačinom:

$$\text{Procent hidrolize } (Y) = 26,80 + 6,23 X_1 - 0,64 X_2 + 1,22 X_3 \quad (5)$$

Za ispitivanje uticaja promenljivih na procenat hidrolize primenjen je ANOVA (od eng. Analysis Of Variance) test. Pokazano je da najznačajni efekat ($P < 0,001$) na procenat hidrolize imaju količina enzima i vreme inkubacije, Tabela 3. Numeričke vrednosti ovih varijansi upoređene su primenom F-testa koji se zove lack-of-fit test i koji služi za procenu validnosti modela. Visoka P vrednost od 0,084 (što je veće od 0,05) i niska F vrednost od 3,82 ukazuju na to da je linearni model dobar, što znači da model dobro opisuje eksperimentalne podatke.

Tabela 3. ANOVA potpunog faktorijalnog dizajna

| | Suma kvadrata | Stepeni slobode | Srednji kvadrat | F vrednost | P vrednost |
|---------------|---------------|-----------------|-----------------|------------|------------|
| Model | 2400,2 | 3 | 800,07 | 61,92 | < 0,0001 |
| X_1 | 1005,99 | 1 | 1005,99 | 77,86 | < 0,0001 |
| X_2 | 211,05 | 1 | 211,05 | 16,33 | 0,0024 |
| X_3 | 1183,17 | 1 | 1183,17 | 91,57 | < 0,0001 |
| Ostatak | 129,21 | 10 | 12,92 | | |
| “Lack of Fit” | 102,38 | 5 | 20,48 | 3,82 | 0,084 |

ANOVA test daje procenu i drugih indikatora performansi modela, kvadrata koeficijenta korelacije R^2 (0,8657) i kvadrata koeficijenta korelacije prilagođenog ukupnom broju eksperimenata, R^2_{adj} (0,9336) koji ukazuju na to da je model dobar, jer ima visoke vrednosti R^2 , koje se približavaju jedinici.

3.3.2. Dizajn postepenog uvećanja

Na osnovu dobijene jednačine prvog reda (jednačina 5) može se zaključiti da će povećanjem količine enzima (X_1) i vremena inkubacije (X_3), a smanjenjem sadržaja skroba

(X_2) doći do povećanja procenta hidrolize (Y). Međutim, evidentno je i da se maksimalni procenat hidrolize nalazi izvan opsega ispitanih vrednosti zadatih promenljivih. Da bi se izbeglo da se eksperimenti uvećanja rade za svaku promenljivu pojedinačno, urađen je dizajn postepenog uvećanja, gde se istovremeno u svakom koraku sve promenljive uvećavaju za određeni korak. Na osnovu pozitivnih koeficijenta količine enzima (X_1) i vremena inkubacije (X_3) određen je dizajn postepenog uvećanja ovih promenljivih kako bi se našla njihova okvirna vrednost za dobijanje maksimalne hidrolize. Centralne tačke faktorialnog dizajna korišćene su kao početne vrednosti u nizu postepenog uvećanja nezavisnih promenljivi (Tabela 4). Vrednost uvećanja svake promenljive je bila proporcionalna regresionim koeficijentima iz dobijenog linearnog modela u FFD. Promenljive X_1 i X_3 su u svakom postepenom koraku uvećane za kodirajuću vrednost od 0,92 i 1, redom

Tabela 4. Prikaz eksperimenata za dizajn postepenog uvećanja sa datim promenljivima u kodirajućim i realnim vrednostima sa dobijenim i predviđenim rezultatima na 18% skrobu.

| Korak | X_1 Količina enzima (IU/mg) | X_3 Vreme inkubacije (h) | Y Procenat hidrolize (%) | |
|--------------------|--|-------------------------------------|-----------------------------|------------------------|
| | | | Dobijena vrednost | Predviđena vrednost |
| Origin | 0 (1,98) | 0 (13) | | |
| Δ | 0,92 (1,66) | 1 (10) | | |
| Origin + Δ | 0,92 (3,64) | 1 (23) | 89,9 | 65,8 |
| Origin + 2Δ | 1,84 (5,29) | 2 (33) | 92,4 | 88,4 |
| Origin + 3Δ | 2,76 (6,95) | 3 (43) | 98,0 | 110,8 |

Na osnovu dobijenih rezultata može se jasno videti da ukoliko se koristi količina enzima od 6,95 IU/mg skroba, nakon 43 sata inkubacije, procenat hidrolize dostiže maksimum. Dobijeni rezultati pokazuju da je moguće dobiti maksimum hidrolize, ali nakon dužeg vremena inkubacije. Na osnovu ovoga može se pretpostaviti da bi se sa povećanjem količine enzima takođe dobio maksimum hidrolize skroba za kraće vreme. Ova pretpostavka je u

daljem procesu optimizacije hidrolize skroba poslužila kao osnov za postavljanje modela drugog reda u centralom kompozitnom dizajnu (CCD).

3.3.3 Centralni kompozitni dizajn

Za finalnu optimizaciju hidrolize suspenzije sirovog kukuruznog skroba visoke koncentracije odabran je centralni kompozitni dizajn. Tri najznačajnije promenljive X_1 , X_2 i X_3 su testirane na pet različitih nivoa: ± 1 (faktorijalne tačke), $\pm\alpha$ (aksijalne tačke) i 0 (centralne tačke). Faktorijalne tačke korišćene su za fitovanje linearnih i interakcionih vrednosti. Aksijalne tačke obezbeđuju dodatni nivo faktora za bolju procenu kvadratne zavisnosti modela. Izborom aksijalnih vrednosti dizajn postaje rotirajući, tako da vrednost α zavisi od broja faktorijalnih tačaka i može se odrediti kao $\alpha = [2^k]^{1/4}$. Za rotirajući CCD sa tri faktorijalne tačke, $\alpha = 1,7$. Ponavljanje centralnih tačaka je veoma važno zbog procene eksperimentalne greške. Urađeno je ukupno 19 eksperimenata za CCD. Vrednosti svih promenljivi su prikazane u Tabeli 5:

Dobijeni eksperimentalni rezultati su analizirani multiplom regresionom analizom iz koje se dobija jednačina drugog reda:

$$\text{Procenat hidrolize (Y)} = 159,13 + 0,02 X_1 - 7,61 X_2 + 2,02 X_3 + 0,08 X_1 X_2 + 0,02 X_1 X_3 + 0,01 X_2 X_3 - 0,02 X_1^2 + 0,10 X_2^2 - 0,03 X_3^2 \quad (6)$$

Za ispitivanje uticaja promenljivih na procenat hidrolize primenjen je ANOVA test, Tabela 6. P vrednosti manje od 0,05 ukazuju na to da su sve tri promenljive veoma značajne za optimizaciju modela hidrolize. Interakcioni koeficijenti promenljivih kao i njihovi kvadrati uključeni su u opis modela, jer svi imaju značajne koeficijente udela. Visoka P vrednost od 0,145 (što je veće od 0,05) i niska F vrednost od 3,14 ukazuju na to da je linearni model dobar, što znači da model dobro opisuje eksperimentalne podatke i za takav model kažemo da nema lack-of-fit.

Tabela 5. Prikaz eksperimenata za CCD sa datim promenljivima u kodirajućim i realnim vrednostima sa dobijenim i predviđenim rezultatima.

| Redosled eksperimenata | X ₁ | X ₂ | X ₃ | Y | |
|------------------------|-------------------------|------------------------|----------------------|-------------------|---------------------|
| | Količina enzima (IU/mg) | Količina supstrata (%) | Vreme inkubacije (h) | Dobijena vrednost | Predviđena vrednost |
| 1 | 1 (11,52) | 1 (30) | -1 (7,0) | 61,9 | 61,7 |
| 2 | 0 (7,65) | 0 (25) | 0 (15,5) | 76,4 | 76,1 |
| 3 | -1 (3,78) | -1 (20) | 1 (24,0) | 92,7 | 90,5 |
| 4 | -1 (3,78) | 1 (30) | 1 (24,0) | 70,0 | 70,3 |
| 5 | 0 (7,65) | 0 (25) | 1,7 (29,8) | 93,5 | 91,0 |
| 6 | 1,7 (14,15) | 0 (25) | 0 (15,5) | 90,0 | 88,1 |
| 7 | -1,7 (1,15) | 0 (25) | 0 (15,5) | 57,2 | 62,5 |
| 8 | 0 (7,65) | 0 (25) | 0 (15,5) | 78,0 | 76,1 |
| 9 | 0 (7,65) | 1,7 (33,4) | 0 (15,5) | 63,9 | 67,8 |
| 10 | 1 (11,52) | -1 (20) | 1 (24,0) | 99,1 | 104,3 |
| 11 | 0 (7,65) | 0 (25) | 0 (15,5) | 72,8 | 76,1 |
| 12 | 0 (7,65) | 0 (25) | 0 (15,5) | 81,0 | 76,1 |
| 13 | 0 (7,65) | -1,7 (16,6) | 0 (15,5) | 99,0 | 98,6 |
| 14 | -1 (3,78) | 1 (30) | -1 (7,0) | 52,7 | 45,2 |
| 15 | -1 (3,78) | -1 (20) | -1 (7,0) | 68,9 | 67,5 |
| 16 | 1 (11,52) | -1 (20) | -1 (7,0) | 80,9 | 78,2 |
| 17 | 0 (7,65) | 0 (25) | -1,7 (1,2) | 41,9 | 47,8 |
| 18 | 1 (11,52) | 1 (30) | 1 (24,0) | 91,0 | 90,0 |
| 19 | 0 (7,65) | 0 (25) | 0 (15,5) | 73,0 | 76,1 |

ANOVA testom su procenjeni i drugi indikatori performansi modela, kvadrata koeficijenta korelacije R^2 (0,9488) i kvadrata koeficijenta korelacije prilagođenog ukupnom broju eksperimenata, R^2_{adj} (0,8975) koji ukazuje na to da se samo 5,12% od ukupnih varijacija ne mogu objasniti datim modelom. Na osnovu statističke evaluacije kvadratnog modela ANOVA analizom je pokazano da je model dobar i da se može primeniti u proceni optimalnih uslova hidrolize suspenzije skroba visoke koncentracije.

Tabela 6. ANOVA centralnog kompozitnog dizajna

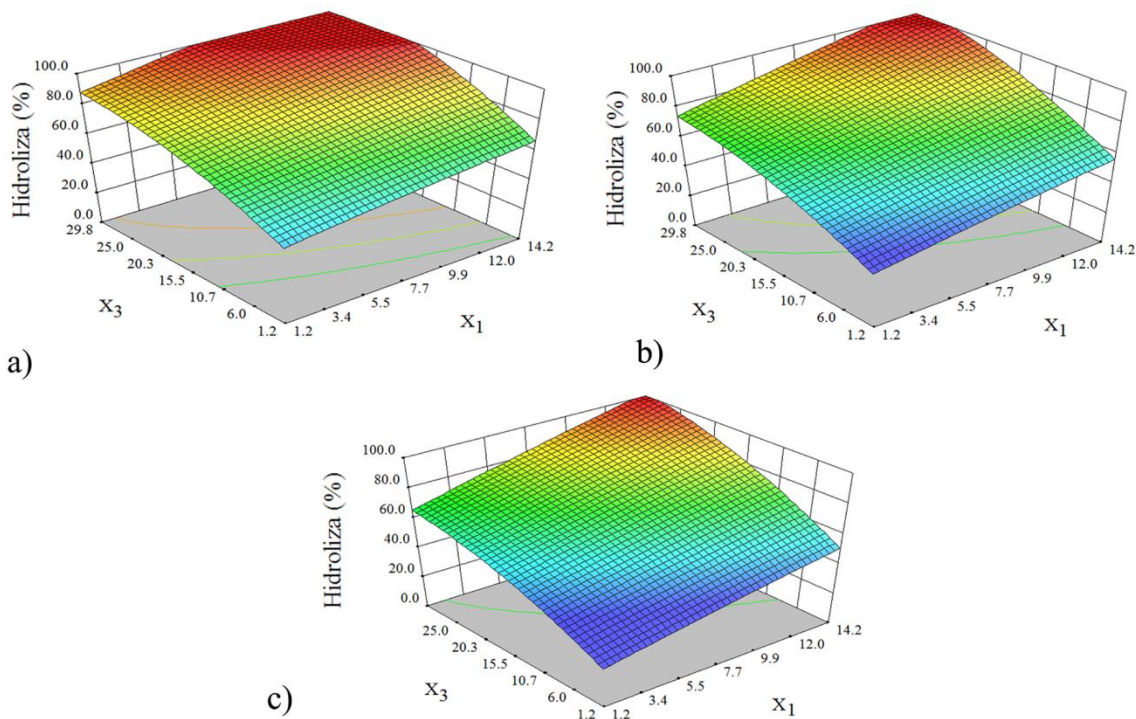
| | Suma kvadrata | Stepeni slobode | Srednji kvadrat | F vrednost | P vrednost |
|-------------------------------|---------------|-----------------|-----------------|------------|------------|
| Model | 4396,75 | 9 | 488,53 | 18,52 | < 0,0001 |
| X ₁ | 789,63 | 1 | 789,63 | 29,93 | 0,0004 |
| X ₂ | 1144,59 | 1 | 1144,59 | 43,39 | 0,0001 |
| X ₃ | 2247,02 | 1 | 2247,02 | 85,17 | < 0,0001 |
| X ₁ X ₂ | 16,96 | 1 | 16,96 | 0,64 | 0,4434 |
| X ₁ X ₃ | 4,91 | 1 | 4,91 | 0,19 | 0,6762 |
| X ₂ X ₃ | 2,39 | 1 | 2,39 | 0,091 | 0,7701 |
| X ₁ ² | 1,19 | 1 | 1,19 | 0,045 | 0,8364 |
| X ₂ ² | 85,33 | 1 | 85,33 | 3,23 | 0,1057 |
| X ₃ ² | 76,69 | 1 | 76,69 | 2,91 | 0,1224 |
| Ostatak | 237,43 | 9 | 26,38 | | |
| “Lack of Fit” | 189,25 | 5 | 37,85 | 3,14 | 0,145 |

Na 3D graficima odgovornih površina (Slika 10) vidi se da procenat hidrolize 20, 25 i 30 % suspenzije skroba varira u zavisnosti od količine dodatog enzima i vremena inkubiranja. Procenat hidrolize raste sa povećanjem količine enzima i vremena inkubiranja i dostiže plato (maksimum) odnosno 100% hidrolize. Na osnovu grafika može se jasno zaključiti da se optimalna hidroliza može postići različitim kombinacijama količine dodatog enzima i vremena inkubacije.

BliAmy se pokazala kao veoma efikasna u hidrolizi suspenzije sirovog kukuruznog skroba visoke koncentracije jer je za samo 5 sati količina enzima od 11,5 IU/mg skroba hidrolizovala 73, 63 i 56% skroba u 20, 25 i 30% suspenziji skroba, redom. Nakon 24 časa dobijen je maksimum hidrolize i to 99% za 20%-ni skrob, 95% za 25%-ni skrob i 91% za 30%-ni skrob.

BliAmy može u potpunosti da hidrolizuje sirovi kukuruzni skrob nakon produženog vremena inkubacije, za razliku od drugih visokoefikasnih bakterijskih RSDA, kao što su α -amilaza iz *Anoxybacillus flavothermus* (148). Mali broj radova u literaturi opisuje bakterijske α -amilaze koje mogu da hidrolizuju sirovi skrob pri visokim koncentracijama (34,36,71,81), od kojih nijedna nije α -amilaza iz *B. licheniformis*. Razlog može biti i taj što su one poznate

kao termostabilni enzimi koji se koriste u klasičnoj hidrolizi na visokim temperaturama, pa se u svrhe hidrolize na nižim temperaturama nisu testirale. Međutim baš to što su termostabilne je njihova prednost prilikom primene na sub-gelirajućim temperaturama pri produženom vremenu inkubiranja.



Slika 10. Grafički prikaz odgovornih površina za korelaciju između optimizovanih uslova hidrolize, količina enzima (X₁, IU/mg skroba) i vreme inkubiranja (X₃, h) pri hidrolizi a) 20%, b) 25% i c) 30% suspenzije sirovog kukuruznog skroba.

Kvantitativno poređenje efikasnosti različitih amilaza nije jednostavno imajući u vidu da su u literaturi jedinice enzimske aktivnosti različito određivane, a najčešće i nedostaje podatak o tome koliko je zaista enzima dodato za hidrolizu. Pa ipak, *BliAmy* se pokazala efikasnijom od α -amilaze iz *A. flavothermus* koja je postigla 77% hidrolize 31%-ne suspenzije sirovog skroba nakon 96 časova na 61°C (34), kao i od α -amilaze iz *Geobacillus thermoleovorans* koja je hidrolizovala 40% sirovog kukuruznog skroba (30%-ne suspenzije) na 60°C (46).

3.3.4 Validacija modela hidrolize sirovog kukuruznog skroba korišćenjem *BliAmy*

Optimalni uslovi za hidrolizu visoko koncentrovane suspenzije sirovog kukuruznog skroba, dobijeni metodom odgovornih površina, provereni su eksperimentalno da bi se potvrdila primenljivost modela. Urađeno je pet različitih eksperimenata hidrolize 30%-ne suspenzije skroba u triplikatu pri čemu je količina enzima bila ista (11,5 IU/mg), a varirano je vreme inkubiranja.

Dobijene vrednosti procenata hidrolize upoređene su sa predviđenim vrednostima iz dobijenog modela. Eksperimentalno je dobijena 55,7% hidrolize 30%-ne suspenzije sirovog kukuruznog skroba nakon 5 sati, odnosno 91% hidrolize nakon 24 sata (Slika 11

). Kada se dobijene vrednosti uporede sa predviđenima (57,1% hidrolize nakon 5 sati i 90% hidrolize nakon 24 sata) vidi se da su vrednosti veoma slične i da je dobijen dobar model hidrolize sirovog skroba. Drugim rečima pokazano je da se RSM može uspešno primeniti za optimizaciju hidrolize visoko koncentrovane suspenzije sirovog skroba kao ekonomičan način dobijanja maksimalne količine informacija u kratkom vremenskom periodu i sa što je manje eksperimenata moguće.

3.4 Poređenje efikasnosti *BliAmy* i komercijalne α -amilaze u hidrolizi sirovog skroba

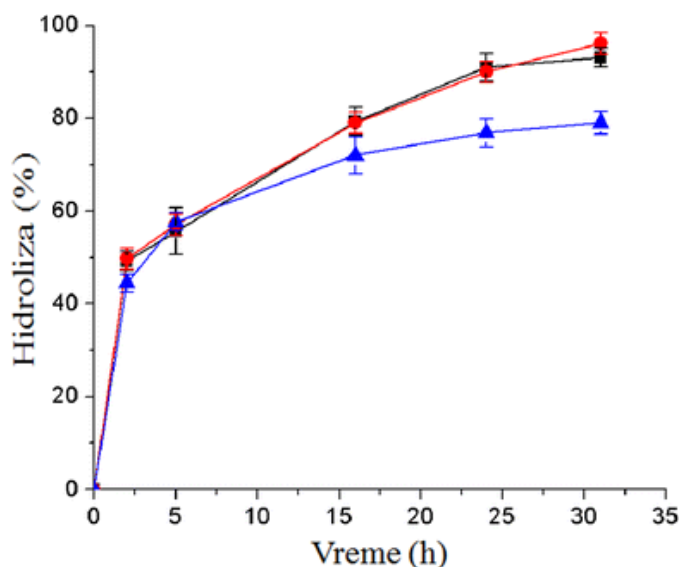
Paralelno sa validacijom modela efikasnost *BliAmy* upoređena je sa komercijalnom α -amilazom iz *B. licheniformis* (Termamyl[®] 120L) pri optimizovanim uslovima reakcije određenih RSM-om.

Urađeno je pet različitih eksperimenata hidrolize 30%-ne suspenzije skroba u triplikatu pri čemu je količina oba enzima bila ista (11,5 IU/mg), a varirano je vreme inkubacije, (Slika 11). Nakon 5 sati inkubacije Termamyl[®] 120L je hidrolizovala 57,7% skroba, a nakon 24 sata postigla je maksimalnu hidrolizu od 76,9%.

Nakon produženog vremena hidrolize (do 31 sat) nije postigut značajan porast hidrolize komercijalnim enzimom. S obzirom na procenat hidrolize postignut sa *BliAmy* koji za ista vremena iznosi 55,7% odnosno 91% može se zaključiti da pri optimizovanim uslovima *BliAmy* postiže 13% veći finalni procenat hidrolize u odnosu na komercijalni enzim. Osim

ove značajno veće efikasnosti značajna prednost je i to što *BliAmy* ne zahteva dodatak Ca^{2+} ili nekog drugog metalnog jona za aktivnost i stabilnost.

Primarna struktura *BliAmy* (99) pokazuje 96% identičnosti sa komercijalno korišćenom *B. licheniformis* α -amilazom Termamyl® 120 L (WO/2001/096537). Dva kritična mesta za termostabilnost visoko termostabilne α -amilaze iz *B. licheniformis* su locirana na pozicijama His133 i Ala209 što je potvrđeno mutacijama (148), a iste ove amino-kiseline prisutne su i u Termamyl® 120 L amilazi. Međutim, kod *BliAmy* na tim pozicijama nalaze se Gln133 i Thr209, što može biti objašnjenje za visoku termostabilnost ovog enzima a samim tim i veću efikasnost u hidrolizi sirovog skroba nakon dužeg vremena inkubacije na 60°C.



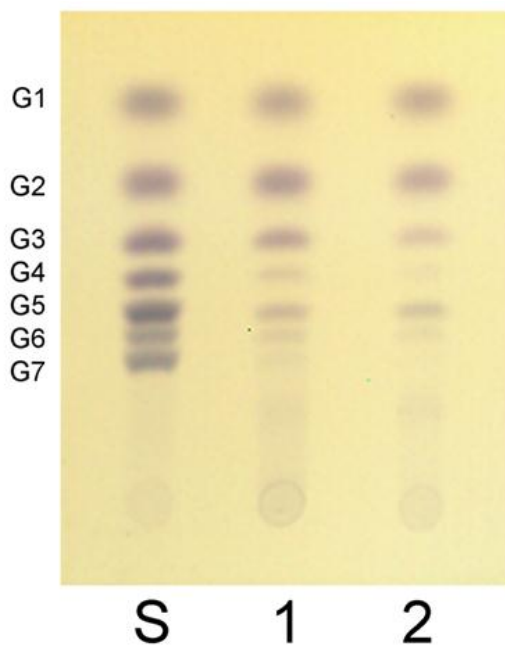
Slika 11. Hidroliza sirovog kukuruznog skroba. (-●-) - *BliAmy* – eksperimentalno dobijene vrednosti, (-●-) - *BliAmy* predviđene vrednosti, (-▲-) Termamyl® 120L

3.5 Rastvorljivi oligosaharidi proizvedeni u hidrolizi skroba sa *BliAmy*

Amilaze prilikom hidrolize skroba oslobađaju manje oligosaharide kao što su npr. maltoza, maltotrioza, maltotetroza, maltopentoza kao i veće oligosaharide. Analizom distribucije oligosaharidnih proizvoda nakon hidrolize sirovog skroba se mogu analizirati razlike u načinu delovanja različitih amilaza (149) kao i utvrditi o kom tipu amilaza se radi. Amilaze mogu da budu otečnjavajuće, odnosno da prilikom hidrolize produkuju širi

spektar dužih oligosaharida ili saharifikujuće koje prilikom hidrolize proizvode prvenstveno glukozu, maltozu i maltotriozu (150). Jedna od često primenljivih tehnika za ovu analizu je tankoslojna hromatografija (TLC) jer je potrebna mala količina uzorka, a analiza kratko traje, visoko je osetljiva, jeftina i jednostavna, a poređenje sa standardima je direktno vizuelno (151).

Rastvorljivi oligosaharidi proizvedeni u hidrolizi 30% suspenzije skroba sa *BliAmy* nakon 5 i 22 sata analizirani su TLC-om (Slika 12). Primarni proizvodi nakon 5 časa hidroliza su G1 (glukoza), G2 (maltoza), G3 (maltotriaza) i G5 (maltopentoza), dok su nakon 22 časa hidrolize u većoj količini prisutni samo G1, G2 i G3, verovatno zbog sekundarne hidrolize primarnih proizvoda kao što su G5 i oligosaharidi većih masa. Raspodela rastvorljivih oligosaharida proizvedenih u hidrolizi 30% suspenzije skroba sa *BliAmy* je slična uobičajnoj distribuciji oligosaharida koja se dobija u hidrolizi sirovog skroba klasičnim otečnjavajućim α -amilazama (45).

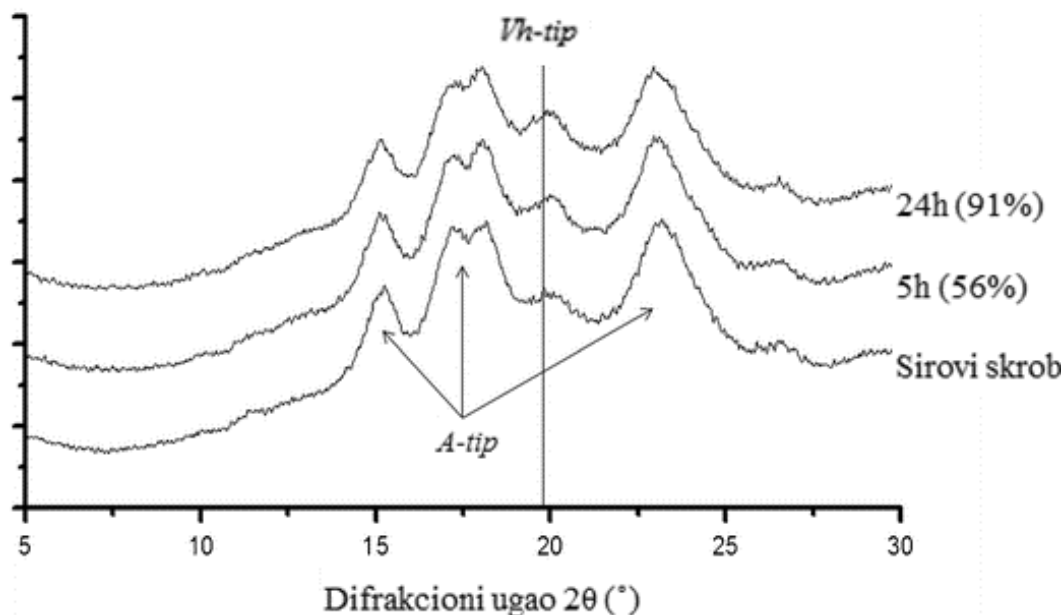


Slika 12. TLC analiza rastvornih oligosaharida proizvedenih u hidrolizi sirovog kukuruznog skroba sa *BliAmy* na 60 °C. 1: nakon 5 h, 2: nakon 22 h. G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7 predstavljaju standarde.

3.6 Analiza rezidualnog skroba zaostalog nakon hidrolize sirovog kukuruznog skroba korišćenjem *BliAmy*

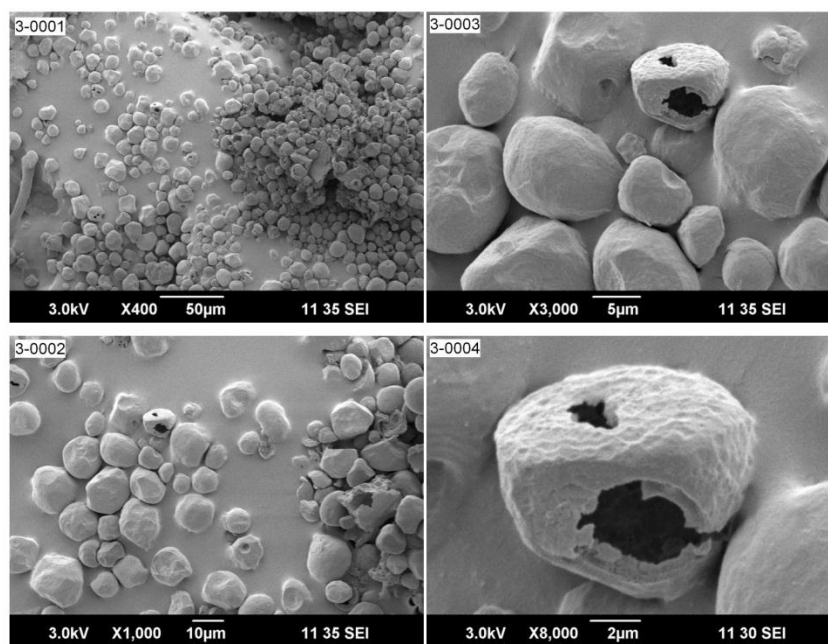
Hidroliza sirovog skroba je heterogeni tip reakcije, koji podrazumeva reakciju između enzima u rastvoru i čvrstog supstrata - skroba. Kompleksna semikristalna struktura skroba ograničava difuziju enzima, kao i dostupnost veza koje bi mogle da se hidrolizuju. Morfologija i površina supstrata, sadržaj amiloze, kristalna struktura ili prisustvo amilozno-lipidnih kompleksa predstavljaju glavne limitirajuće faktore hidrolize skrobnih granula (33,148).

Za analizu rezidualnog tj. neizhidrolizovanog skroba u reakciji hidrolize rekombinantnim enzimom *BliAmy*, uzet je ostatak nakon maksimalne hidrolize od 91%, koji je zatim izmeren, osušen i određena mu je masa koja je iznosila 10% u odnosu na masu polaznog skroba. Rezidualni skrob je analiziran rendgenskom difrakcijom za određivanje kristalne strukture i skenirajućom elektronskom mikroskopijom za određivanje morfologije granula. Dobijene kristalne i morfološke strukture rezidualnog skroba poređene su sa nativnim granulama skroba.



Slika 13. Analiza sirovog i rezidualnog kukuruznog skroba prikazana kao promena kristalne strukture u funkciji vremena i procenta hidrolize (u zagradi).

Rendgenska difrakcija na polikristalnom materijalu je korišćena za identifikaciju kristalnih faza sirovog skroba i rezidualnog skroba nakon različitih vremenskih intervala hidrolize. Za određivanje promena u kristalnoj strukturi analizirani su uzorci skroba koji zaostaju nakon hidrolize 30%-ne suspenzije nakon 5 i 24 sata. Kao što se može videti na Slici 13, korišćeni kukuruzni skrob ima A-tip kristaliniteta sa karakterističnim pikovima na Bragg-ovom uglu (2θ) = 15, 17, 18 i 23° i Vh-tip kristaliniteta sa karakterističnim pikom na 2θ oko 20°. Vh-tip kristaliniteta potiče od amilozno-lipidnih kompleksa, koji se formiraju između amiloze i endogenih masnih kiselina prisutnih u kukuruznom skrobu. Upoređivanjem difrakcionih intenziteta pikova kristalne strukture nativnog i rezidualnog skroba nakon oba testirana vremena hidrolize može se zaključiti da nema povećanja kristaliniteta u rezidualnom skrobu. Ovo ukazuje na to da *BliAmy* najverovatnije istom brzinom hidrolizuje i kristalne i amorfne regione u granulama skroba, što je u skladu sa načinom hidrolize skrobnih granula tzv. „granula po granula”, a što se može zaključiti na osnovu SEM mikrofotografije (Slika 14). Vh-tip kristalne strukture je izuzetno stabilan i više je izražen nakon dvadesetčetvoročasovne hidrolize što ukazuje na to da je on rezistentniji na hidrolizu u odnosu na kristalnu strukturu A-tipa, kao što je i ranije primećeno (152).



Slika 14. Skenirajuća elektronska mikroskopija granula kukuruznog skroba nakon hidrolize sa *BliAmy*.

Skenirajućom elektronskom mikroskopijom je pokazano da pri hidrolizi kukuruznih skrobnih granula unutar istog eksperimenta nisu sve granule podjednako podložne enzimskoj hidrolizi što je verovatno posledica načina na koji se amilaza adsorbuje na granule skroba. Hidroliza se odvija granulu po granulu pri čemu se granula kompletno hidrolizuje. Slično je primećeno i pri hidrolizi pšeničnog i drugih skrobova u čvrstom stanju (35,153). Na mikroskopijama se takođe može uočiti napredak molekula *BliAmy* od površine granule ka centru (centripetalna hidroliza), a zatim jezgro granule biva potpuno hidrolizovano erozijom perifernih regiona (centrifugalna hidroliza). Ovakav način je i ranije primećen za α -amilazu iz *B. licheniformis* (154).

3.7 Dobijanje i prečišćavanje *BliAmy* - optimizovano „upstream” i „downstream” procesovanje

U proteklim decenijama razvoj metoda molekularne biologije i fermentacione tehnologije omogućio je dobijanje industrijskih važnih proteina u veoma visokim prinosima. Paralelno sa tim došlo je i do suočavanja s novim izazovima u prečišćavanju ovih proteina koje je rezultovalo time da su mnoge tradicionalne tehnike prečišćavanja morale biti napuštene prvenstveno zbog veoma viskoznih proteinskih rastvora koji se kao takvi ne mogu nanositi direktno na hromatografske kolone. Takođe, termostabilnost proteina koji potiču iz termofilnih i ekstremofilnih organizama može da se iskoristi za prečišćavanje toplotom kao što je opisano u odeljku 3.2 imajući u vidu da se proteini ekspresionog domaćina ovom procedurom uglavnom denaturišu (145).

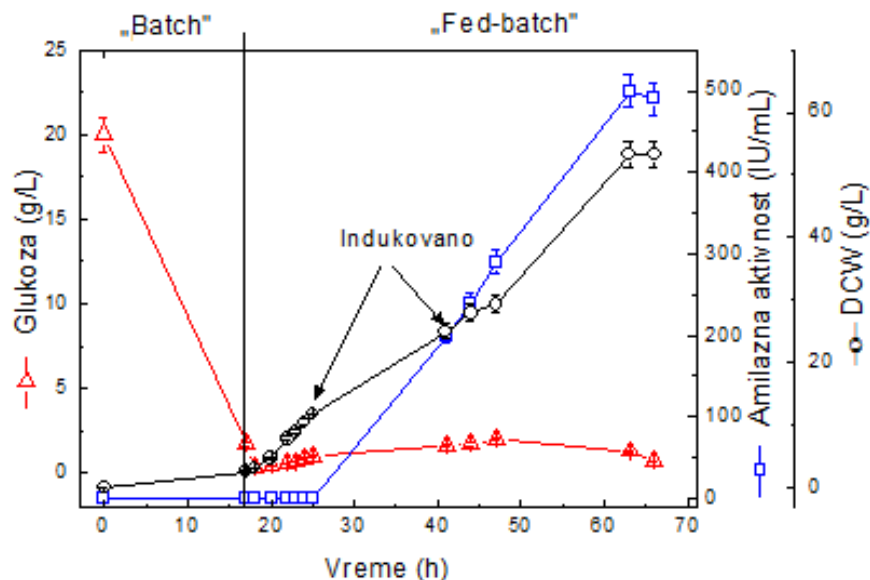
Ekstracelularna produkcija proteina jeste poželjna zbog manje količine kontaminirajućih proteina u odnosu na unutrašnjost ćelije, ali nedostatak je taj što se u tom slučaju rukuje sa većim zapreminama što je problem ukoliko uzorak treba da se koncentruje i rasoli za jonoizmenjivačku (IEX) kolonu. U ovakvim slučajevima obično se primenjuje ultrafiltracija za koncentrovanje i izmenu pufera da bi se dobio uzorak malog konduktiviteta i željene pH vrednosti za određenu IEX hromatografiju. Uprkos tome što postoje brojne i detaljne studije o strukturi, termalnim osobinama, molekulskom

mehanizmu i ireverzibilnoj termoinaktivaciji amilaze iz *B. licheniformis* veoma malo literaturnih podataka postoji o enzimskoj karakterizaciji (155). Podaci o arhitekturi mesta vezivanja šećera u aktivnom mestu su retki (155,156), a studije o kinetici i načinu delovanja ovog industrijski važnog enzima praktično se ne mogu naći u literaturi naročito kada se sirovi skrob koristi kao supstrat. Takođe ne postoje podaci o mogućim SBS mestima. Za takve mehanističke i kristalografske studije neophodna je dovoljna količina veoma čistog enzima za šta je veoma značajno unaprediti DSP.

3.7.1 Proizvodnja rekombinantne *BliAmy* semikontinualnim gajenjem *E. coli* C43 (DE3)

E. coli C43 (DE3) ćelije predstavljaju derivate BL21 (DE3) ćelija efikasnih u ekspresiji toksičnih i membranskih proteina i mogu teoretski eksprimirati bilo koji gen kloniran u bilo koji T7 vektor. Za dobijanje ćelija *E. coli* C43 (DE3) visoke gustine za proizvodnju ekstracelularne rekombinantnu α -amilaze, *BliAmy* urađena je dvostepena semikontinualna („fed-batch”) fermentacija na način opisan u odjeljku 3.1.2 Razlika u odnosu na prethodno opisanu fermentaciju jeste u drugom koraku, post-indukcionoj fazi u kojoj je ekspresija *BliAmy* dva puta indukovana. Nakon prve indukcije (25-ti sat) brzina dodavanja glukoze je bila konstantna (15 mL h^{-1}) sve do druge indukcije (41 sat) kada je smanjena sa 15 mL h^{-1} na 5 mL h^{-1} .

Sa krive rasta prikazane na Slici 15, vidi se da je na kraju fermentacije suva masa ćelija dostigla $52,3 \text{ g L}^{-1}$, dok je aktivnost amilaze iznosila 500 IU mL^{-1} što je dva puta više nego u fermentaciji sa ćelijama *E. coli* BL21 (DE3). Ukupni sadržaj *BliAmy* na kraju fermentacije takođe je bio veći i iznosio je $1,2 \text{ g L}^{-1}$.



Slika 15. Semikontinualna fermentacija *E. coli* C43/pDA-amy. Krugovi prikazuju DCW, kvadrati enzimsku aktivnost a trouglovi sadržaj glukoze. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost tri merenja (standardna greška je bila manja od 5 %). Strelicom je prikazano vreme indukcije.

3.7.2 Prečišćavanje *BliAmy* na mešovitom matriksu Nuvia cPrime™

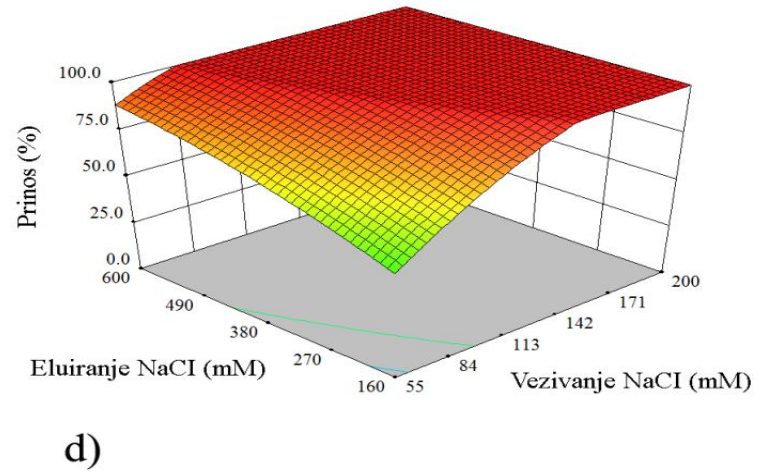
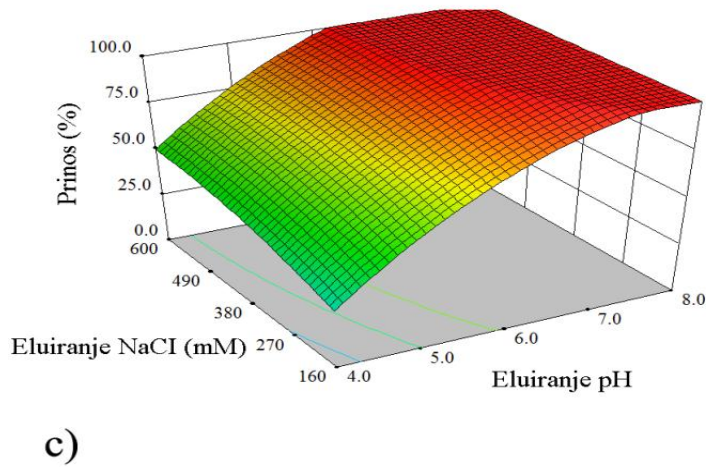
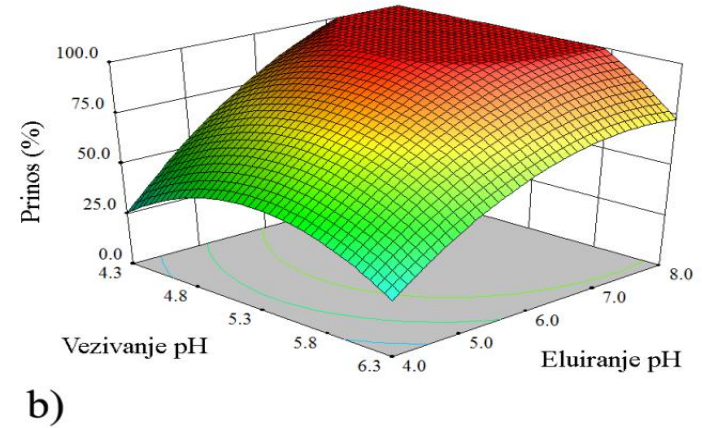
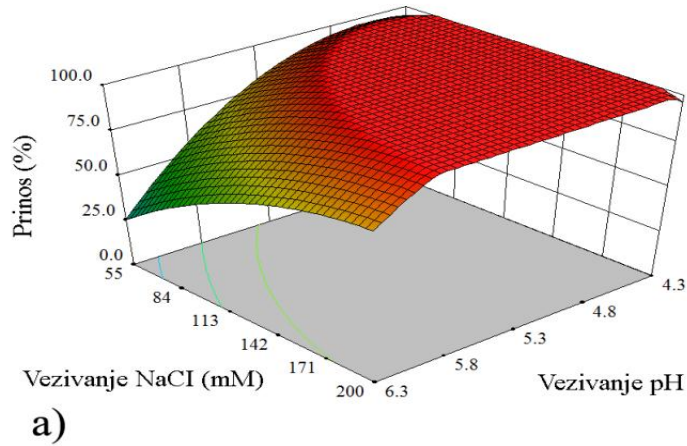
Jedna od glavnih prepreka višestruke upotrebe jonoizmenjivača je mogućnost efikasnog čišćenja matriksa posle upotrebe u koloni (CIP - od eng. cleaning in place) (157,158). Anjonski jonoizmenjivači su podložniji snažnom vezivanju pigmenata i drugih obojenih supstancija (159,160), tako da se u tom pogledu katjonski izmenjivači lakše održavaju. Ovo je važno imajući u vidu da se ovi pigmenti adsorbuju i na ultrafiltracione membrane i na jonoizmenjivače gde je nosač Sepharose (160,161).

Katjonski tip izmenjivača ima i mešovita smola Nuvia cPrime™ (BioRad) koju smo testirali kao mogućnost poboljšanja procesa prečišćavanja *BliAmy* na velikoj skali. Nuvia cPrime™ je mešoviti, hidrofobni-katjonsko izmenjivački matriks koji u vezivanju proteina kombinuje hidrofobne interakcije sa izmenom katjonskih grupa pri čemu prisustvo soli olakšava hidrofobne interakcije dok jonoizmenjivačke grupe omogućavaju pravilnu selektivnost. Ovakav dizajn je obećavajući za inicijalni korak zarobljavanja u DSP (162,163).

Uslove za vezivanje i eluiranje željenog enzima (jonska sila i pH vrednost) korišćenjem ovog matriksa nije moguće lako predvideti u poređenju sa tradicionalnim IEX matriksima te je nekoliko preliminarnih eksperimenata neophodno. Oni su veoma jednostavno i brzo izvedeni u kolonicama od 200 μ L. Testiran je širok opseg pH i jonske sile pufera koji se koriste za vezivanje i eluiranje. Na osnovu dobijenih podataka metodom odgovornih površina određene su granice opsega pH i jonske sile za finalnu optimizaciju prečišćavanja *BliAmy* direktno iz fermentacione tečnosti. Urađen je centralni kompozitni dizajn sa četiri najznačajnije promenljive koje su testirane na pet različitih nivoa: ± 1 (faktorijalne tačke), $\pm\alpha$ (aksijalne tačke) i 0 (centralne tačke). Dobijeni eksperimentalni rezultati su analizirani multiplom regresionom analizom iz koje se dobija sledeća jednačina drugog reda:

$$\begin{aligned} \text{Prinos} = & -749,73 + 217,16 A - 0,27 B + 83,60 C + 0,04 D + 0,19 AB - 4,16 AC + 0,03 \\ & AD + 0,04 BC - 0,001 BD + 0,01 CD - 23,12 A^2 - 0,002 B^2 - 4,06 C^2 + 0,0001 D^2 \end{aligned} \quad (7)$$

Pokazano je da su optimalni uslovi prečišćavanja za maksimalni prinos specifične aktivnosti *BliAmy*: pH vezivanja 5,3 + 150 mM NaCl i pH eluiranja 8,0 + 500 mM NaCl (Slika 16). Adekvatnost dobijenih rezultata i njihovo uklapanje u analizirani model prikazani su analizom varijansi u Tabeli 7. Regresiona analiza je pokazala da je model značajan, što se može i videti na osnovu vrednosti $F = 25,59$ i $P = 0,0003$.

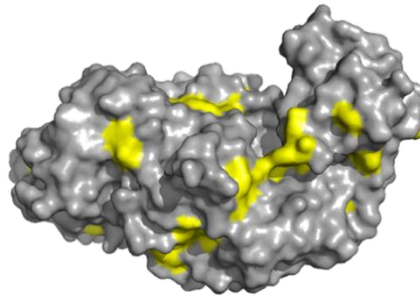


Slika 16. Efekti interakcija između dve promenljive, dok su druge dve promenljive podešene na optimalnoj vrednosti (a) eluiranje pH=8,0, eluiranje NaCl=500 mM, (b) vezivanje NaCl=150 mM, eluiranje NaCl=500 mM, (c) vezivanje pH=5,3, vezivanje NaCl=150 mM i (d) vezivanje pH=5,3, eluiranje pH=8,0

Tabela 7. ANOVA centralnog kompozitnog dizajna za optimizaciju prečišćavanja *BliAmy* na Nuvia cPrime™

| | Suma kvadrata | Stepeni slobode | Srednji kvadrat | F vrednost | P vrednost |
|---------------------|---------------|-----------------|-----------------|------------|------------|
| Model | 30720,74 | 14 | 2194,34 | 25,59 | 0,0003 |
| A- pH vezivanja | 1512,50 | 1 | 1512,50 | 17,64 | 0,0057 |
| B-mM NaCl vezivanja | 1012,50 | 1 | 1012,50 | 11,81 | 0,0139 |
| C- pH eluiranja | 13410,34 | 1 | 13410,34 | 156,37 | < 0,0001 |
| D-mM NaCl eluiranja | 612,50 | 1 | 612,50 | 7,14 | 0,0369 |
| AB | 601,07 | 1 | 601,07 | 7,01 | 0,0382 |
| AC | 552,78 | 1 | 552,78 | 6,45 | 0,0441 |
| AD | 183,48 | 1 | 183,48 | 2,14 | 0,1939 |
| BC | 270,28 | 1 | 270,28 | 3,15 | 0,1262 |
| BD | 263,31 | 1 | 263,31 | 3,07 | 0,1303 |
| CD | 57,78 | 1 | 57,78 | 0,67 | 0,4431 |
| A ² | 7990,87 | 1 | 7990,87 | 93,18 | < 0,0001 |
| B ² | 1961,50 | 1 | 1961,50 | 22,87 | 0,0031 |
| C ² | 3936,31 | 1 | 3936,31 | 45,90 | 0,0005 |
| D ² | 287,43 | 1 | 287,43 | 3,35 | 0,1169 |
| Ostatak | 514,55 | 6 | 85,76 | | |
| “Lack of Fit” | 177,75 | 2 | 88,88 | 1,06 | 0,4284 |

Sposobnost nekih amilaza da hidrolizuju sirovi skrob zasniva se na njihovoj mogućnosti da se vezuju za skrobne granule preko hidrofobnih aminokiselinskih ostataka koji se nalaze na njihovoj površini (9). To su najčešće ostaci triptofana i tirozina Slika 17 i ove hidrofobne površine iskorišćene su u ovom slučaju za potencijalnu interakciju sa fenolnim prstenovima funkcionalnih grupa na matriksu. Međutim u slučaju RSDA hidrofobne interakcije su prirodna osobina vezivanja za supstrat pa se mogu očekivati veliki prinosi aktivnog enzima nakon prečišćavanja.

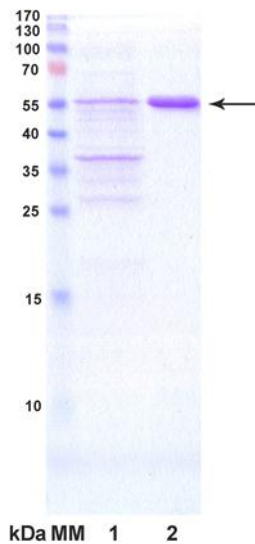


Slika 17. Model strukture *BliAmy*: Izloženi ostaci Y i W prikazani su žutom bojom. Model je konstruisan korišćenjem SWISS MODEL alata dostupnom na ExpASy serveru (<http://swissmodel.expasy.org/>) (164,165).

Na osnovu optimizovanog modela urađeno je prečišćavanje *BliAmy* direktno iz fermentacione tečnosti. Prilikom nanošenja uzorka na kolonu u nevezanim frakcijama je bilo ukupno 239 IU što odgovara 2,6% od nanetih enzimskih jedinica i to pokazuje visok kapacitet vezivanja za Nuvia cPrime ($\sim 60 \text{ mg mL}^{-1}$).

Eliranje amilaze povećanim pH i koncentracijom soli omogućava dobijanje frakcija visoke čistoće na SDS PAGE gelu (Slika 18). Eluirani enzim je imao aktivnost od 8800 IU što odgovara $\sim 96\%$ prinosa. Ovakvo prečišćavanje u jednom koraku omogućilo je simultano koncentrovanje, uklanjanje pigmenta i prečišćavanje *BliAmy* sa prinosom od 96% direktno iz fermentacione tečnosti.

Ovaj način prečišćavanja nije zamišljen kao zamena za tag tehnologiju prečišćavanja rekombinantnih proteina iako i u odnosu na nju može imati neke prednosti. Postoje mnogi primeri proteina u kojima N- ili C- terminus nije izložen rastvaraču, te je u tom slučaju dodatak taga nesvrshodan. Afinitetni nosači imaju generalno nizak kapacitet vezivanja za tagovane proteine, sa izuzetkom IMAC nosača kao što je npr. Ni-Sepharose. Takođe, za kristalografske studije najčešće je poželjno imati protein bez taga. S druge strane, vrlo visoki prinosi i simultana koncentracija i prečišćavanje mogu biti eksploatisani i u suprotnom smeru – „scaling down” – što je često neophodno za testiranje različitih mutantnih varijanti enzima.



Slika 18. SDS PAGE analiza frakcija prečišćavanja *BliAmy*. 1) fermentaciona tečnost na pH 5,3; 2) *BliAmy* eluiran sa Nuvia cPrime

3.8 Racionalni dizajn aminokiselinskih ostataka *BliAmy* potencijalno važnih u vezivanju za skrob van aktivnog mesta

Fizička adsorpcija amilaza na skrobnim granulama omogućena ili prisustvom SBD ili SBS na površini enzima često se smatra preduslovom za mogućnost hidrolize sirovog skroba. Kako svega oko 10% amilolitičkih enzima sadrži SBD domen u svojoj strukturi (69), a iz Tabele 1 evidentno je da i α -amilaze bez SBD, kao što je *BliAmy* mogu biti podjednako ako ne i efikasnije u hidrolizi sirovog skroba, postaje jasno da prisustvo SBD nije glavni zahtev za degradaciju skrobnih granula. I dalje ostaje zagonetka dakle zašto neke α -amilaze sadrže SBD a druge ne, i koja je to zapravo glavna strukturna karakteristika enzima koja je zaslužna za efikasnu hidrolizu sirovog skroba. Potencijalni SBS-ovi mogu se detektovati indirektno delecijom nekih domena enzima ili bioinformatički. Ovaj pristup je teži jer do sada nije zabeležena konzerviranost određenog SBS-a unutar subfamilije ili među srodnim subfamilijama iz familije GH13 (9).

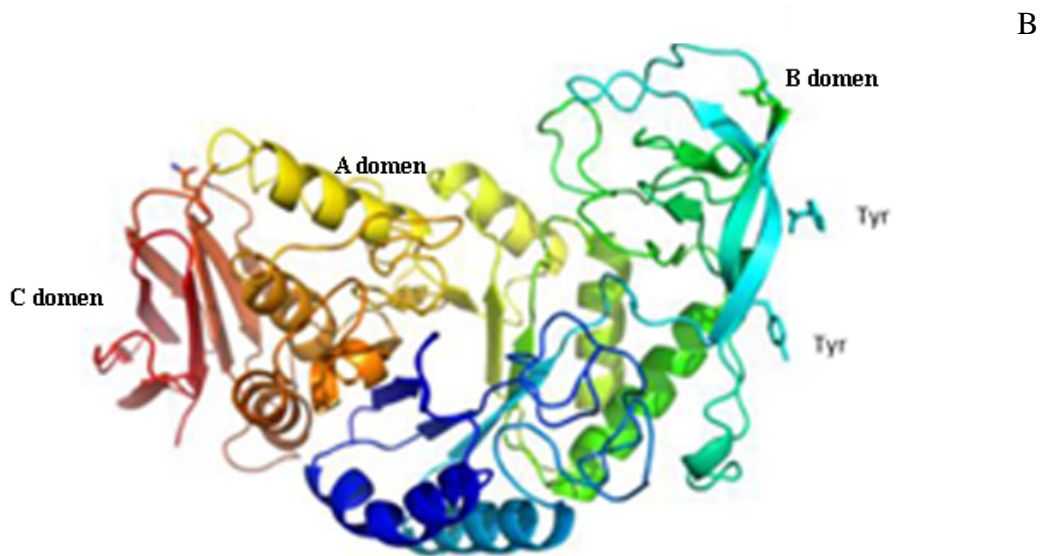
3.8.1 Identifikacija mogućih SBS kod *BliAmy* bioinformatički i skraćivanjem gena (*truncation*)

Kako je pokazano da se *BliAmy* adsorbuje na skrobne granule, a enzim ne poseduje SBD postavlja se pitanje prisustva SBS. Iako konzerviranost SBS unutar amilazne familije nije poznata niti se očekuje, može se očekivati da unutar iste subfamilije postoje isti ili slični aminokiselinski ostaci koji učestvuju u vezivanju za skrob. Na ovome je zasnovana bioinformatička analiza koja je u obzir uzela i razlike između tih aminokiselina unutar α -amilaza subfamilije GH13_5. Potencijalna mesta su kod *BliAmy* identifikovana homologim modelovanjem i *in silico* analizom, Slika 19. Analizom je tako detektovan Tyr114 samo kod *BliAmy* dok se drugi tirozin Tyr156 nalazi i kod nekih drugih amilaza predstavnika subfamilije GH13_5. Kada se pogleda model strukture *BliAmy* vidi se da su ova dva tirozina izložena ka spoljašnjoj sredini na sličan način kao SBS amilaze iz ječma (166). Za ispitivanje uticaja ovih amino-kiselina na adsorpciju i hidrolizu sirovog skroba racionalnim dizajnom napravljeni su mutanti, tako što su tirozini mutirani u alanin, Y114A i Y156A, kao i dvostruki mutant Y114A/Y156A. Mutanti su proizvedeni optimizovanom fermentacijom na isti način kao i *BliAmy* (3.1.1) i prečišćeni na Nuvia cPrime™ koloni (3.7.2).

Domen C predstavlja domen sa najmanjim stepenom konzerviranosti sekvencije u familiji GH13, prisutan je skoro kod svih članova, ali njegova funkcionalna uloga još nije u potpunosti razjašnjena. U mnogim studijama pokazuje se da je neophodan kako za katalitičku aktivnost, tako i za vezivanje supstrata (60–62).

Uloga domena C u adsorpciji na sirovi skrob i hidrolizu kod Gt-amyII iz *G. thermoleovorans* je pokazana na formi enzima dobijenom skraćivanjem dela gena koji kodira C domen (90). Uticaj domena C na adsorpciju i hidrolizu sirovog skroba kod *BliAmy* ispitana je na isti način dobijanjem forme enzima kojoj je skraćen deo gena (*truncation*) koji kodira C domen. Dobijena enzimska forma (*BliAmy*-TC) proizvedena je optimizovanom fermentacijom na isti način kao i *BliAmy* (odeljak). *BliAmy*-TC kao defektan protein, veoma se teško produkuje u rekombinantnim ćelijama i dobija se u jako malim količinama koje su omogućile samo relativno poređenje sa nativnim enzimom u smislu adsorpcije i hidrolize sirovog skroba.

| | 114 | 156 |
|---------------------|----------------------|----------------------------------|
| <i>BliAmy</i> 9945a | ADATEYVTAVEVDPADRNRV | GRGSTYSDFKWYHWYHFDG ^A |
| ABL75259.1 | ADATEDVTAVEVDPADRNRV | GRGSTYSDFKWYHWYHFDG |
| ACT63870.1 | ADATEDVTAVGVDPADRNRV | GRGSTYSDFKWYHWYHFDG |
| WP_026578957.1 | ADATEDVTAVEVDPADRNRV | GRGSTYSDFKWYHWYHFDG |
| 2GJP | ADATENVLAVEVNPNNRNQE | GRGNTYSDFKWYHWYHFDG |
| AAA22191.1 | ADATEDVTAVEVNPANRNQE | GRGNTYSDFKWHWYHFDG |
| ADE44086.1 | ADAAEDVTAVEVNPANRNQE | RRGNTYSDFKWHWYHFDG |
| ABY86223.1 | ADYTETVTAVEVDPSNRNIE | GRGDPYSNFKWRWYHFDG |
| CAD26699.1 | ADATENVLAVEVNPNNRNQE | GRGNTYSDFKWRWYHFDG |
| AGR34077.1 | ADATEDVTAVEVDPADRNRV | GRGSTYSDFKWHWYHFDG |
| AAA22226.1 | ADATEDVTAVEVDPADRNRV | GRGSTYSDFKWHWYHFDG |
| ABD66592.1 | ADATEDVTAVEVDPADRNRV | GRGSTYSDFKWHWYHFDG |
| ACN88150.1 | ADATEDVTAVEVDPADRNRV | GRGSTYSDFKWHWYHFDG |
| AAU39594.1 | ADATEDVTAVEVDPADRNRV | GRGSTYSDFKWHWYHFDG |
| CAH10338.1 | ADATEDVTAVEVDPADRNRV | GRGSTYSDFKWHWYHFDG |
| AAB18785.1 | ADGTEWVDAVEVNPDRNQE | GRGNTYSSFKWRWYHFDG |
| ABW87262.1 | ADATEDVTAVEVNPANRNQE | GRGNTYSDFKWHWYHFDG |
| AAA22235.2 | ADGTEWVDAVEVNPDRNQE | GRGNTYSSFKWRWYHFDG |
| AAU10478.1 | ADGTEWVDAVEVNPDRNQE | GRGNTYSSFKWRWYHFDG |
| ABX83871.1 | ADGTEWVLQISWVDAVNQE | GRGNTYSSFKWRWYHFDG |
| AFC87833.1 | ADGTEWVDAVEVNPDRNQE | GRGNTYSSFKWRWYHFDG |
| AEW07376.1 | ADGTEWVDAVEVNPDRNQE | GRGNTYSSFKWRWYHFDG |
| CAC39917.1 | ADFTEAVQAVQVNPTNRWQD | GRNNAYSDFKWRWFHFNQ |
| AAA63900.1 | ADGTEFVDAVEVNPDRNQE | GRGNTYSSFKWRWYHFDG |
| AAB86961.1 | ADGTEWVDAVEVNPDRNQE | GRGNTYSSFKWRWYHFDG |
| | ** : * * : | * - ** - *** * : * * : |



Slika 19. (A) Slaganje reprezentativnih sekvencija α -amilaza (EC 3.2.1.1) iz subfamilije GH13_5. Tirozini 114 i 156 izloženi rastvaraču su označeni crvenom bojom, a žutom je prikazan njihov nedostatak kod drugih amilaza. (B) Tirozini Y114 i Y156 locirani su na površini domena B kod *BliAmy*.

3.8.2 Karakterizacija mutantnih varijanti *BliAmy*

3.8.2.1. Ispitivanje adsorpcija mutantnih varijanti *BliAmy* na skrobne granule

Poređenje mutantnih i nativnog enzima u adsorpciji na sirove granule kukuruznog skroba urađeno određivanjem konstanta disocijacije K_d osnovu Langmuir-ove adsorpcione izoterme prema frakciji vezanog enzima GraphPad Prism 5.0 programom. Korišćena je jednačina:

$$B = \frac{B_{\max} [S]}{K_d + [S]} \quad (8)$$

B je frakcija vezanog enzima, $[S]$ koncentracija sirovog skroba i B_{\max} maksimalni kapacitet vezivanja enzima.

Vrednosti za K_d (konstante disocijacije) dobijene fitovanjem Langmuir-ove adsorpcione izoterme pokazuju veće vrednosti za Y114A i Y114A/Y156A u odnosu na nativni enzim, Tabela 8, ali su istog reda veličine što ukazuje na to da su veoma slične za sve enzimске varijante. Isto tako i vrednosti B_{\max} (količima maksimalno adsorbovanog enzima). Tabela 9, veoma su slične što znači da se sve enzimске varijante u istoj meri adsorbuju na skrobne granule kao nativni enzim. Ovi rezultati ukazuju da nema mnogo razlika između nativnog i mutantnih varijanti enzima u adsorpciji na sirove skrobne granule.

Tabela 8. Adsorpcija *BliAmy* i mutanata na kukuruzne skrobne granule

| <i>BliAmy</i> | K_d (mg/mL) | B_{\max} (%) |
|---------------|---------------|----------------|
| Nativni | 3,22±0,23 | 99,67±1,57 |
| Y114A | 5,42±0,56 | 96,26±2,47 |
| Y156A | 3,65±0,20 | 94,77±1,20 |
| Y114A/Y156A | 6,98±0,57 | 101,10±2,13 |

3.8.2.2 Ispitivanje kinetike hidrolize rastvornog i sirovog skroba mutantnim varijantama *BliAmy*

Poređenje mutantnih i native varijanti enzima u hidrolizi rastvornog i sirovog skroba urađeno je prećenjem kinetike hidrolize rastvornog i sirovog skroba, odnosno određivanjem kinetičkih parametara k_{cat} (turnover number, molekulska aktivnost), Michaelis-ove konstante (K_M), i konstante specifičnosti (k_{cat}/K_M). Konstanta k_{cat}/K_M je mera katalitičke efikasnosti jer uzima u obzir i brzinu katalize sa određenim supstratom (k_{cat}) kao i meru (afinitet) interakcije enzima sa supstratom (K_M).

Katalitički koeficijenti k_{cat} , K_M i V_{max} izračunati su fitovanjem Michaelis-Menten-ine jednačine na osnovu početnih brzina reakcije u GraphPad Prism 5.0 programu, na osnovu jednačine:

$$V_0 = \frac{V_{max} * [S]}{(K_M + [S])} \quad (9)$$

gde su: V_0 početna brzina reakcije, V_{max} maksimalna brzina reakcije, $[S]$ koncentracija supstrata za hidrolizu, i K_M Michaelisova konstanta, koja predstavlja koncentracije supstrata pri kojoj se postiže polovina maksimalne brzine. Turnover broj, k_{cat} se izračunava ako se u i na osnovu formule:

$$V_{max} = E_t * k_{cat} \quad (10)$$

gde je E_t je koncentracija enzimskih katalitičkih mesta.

BliAmy i njegovi mutanti spadaju u enzime koji se slabo adsorbuju na skrob iz tog razloga nije bilo moguće odrediti pojedinačno K_M i k_{cat} već samo katalitički koeficijent k_{cat}/K_M iz nagiba $V_0/[E]$ prema $[S]$ (111).

U hidrolizi rastvornog skroba native enzim i mutantna varijanta Y114A/Y156A imaju skoro dvostruko veće vrednosti za k_{cat} i K_M , Tabela 9, kada se uporede njihove konstante specifičnosti može se zaključiti da je trend isti i za rastvorni i za sirovi skrob, što ukazuje na to da nema značajnih razlika u hidrolizi rastvornog i sirovog skroba između native i mutantnih enzima.

Tabela 9. Kinetički parametri hidrolize rastvornog i sirovog kukuruznog skroba enzimskim varijantama *BliAmy*.

| <i>BliAmy</i> | Rastvorni skrob | | Sirovi skrob | |
|---------------|-------------------|--------------|--|---|
| | $k_{cat}(s^{-1})$ | $K_m(mg/mL)$ | k_{cat}/K_m ($s^{-1}mgmL^{-1}$) (%) | k_{cat}/K_m ($s^{-1}mg mL^{-1}$) |
| Nativni | 1189 | 2,46 | 483 (100) | 1,585±0,084 |
| Y114A | 669 | 1,13 | 592 (123) | 1,349±0,0659 |
| Y156A | 785 | 1,11 | 707 (146) | 1,284±0,075 |
| Y114A/Y156A | 1055 | 2,06 | 512 (106) | 1,407±0,071 |

Na osnovu dobijenih rezultata o adsorpciji i kinetičkim parametrima hidrolize rastvornog i sirovog skroba može se videti da ovakvom bioinformatičkom analizom sa ograničenim variranjem nije moguće predvideti aminokiseline koje bi bile SBS.

3.8.2.3 Relativna adsorpcija i hidroliza enzimske varijante *BliAmy*-TC

BliAmy-TC je veoma malo zastupljen u fermentacionoj tečnosti nakon optimizovane produkcije i bilo ga je praktično nemoguće prečistiti, te je sa nativnim upoređen merenjem aktivnosti pre i nakon adsorpcije, kao i merenjem procenta hidrolize kada se primene iste doze enzima na skrobu u trajanju od 16 sati. Dobijeni rezultati (Tabela 10) pokazuju da se *BliAmy*-TC manje adsorbuje na sirovi skrob od nativnog enzima, ali uprkos tome u stanju je da hidrolizuje sirovi skrob u značajnoj meri. Ovo ukazuje na to da se potencijalni SBS kod *BliAmy* najverovatnije ne nalaze na C domenu, kao što je to slučaj kod kod α -amilaze iz ječma (SBS1-Tyr380) (111).

Tabela 10. Relativna adsorpcija i hidroliza *BliAmy*-TC

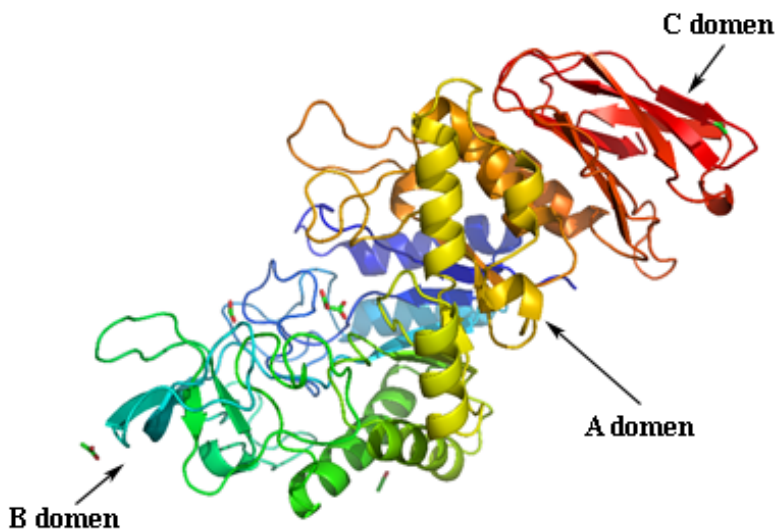
| <i>BliAmy</i> | Relativna adsorpcija (%) | Relativna hidroliza (%) |
|---------------|--------------------------|-------------------------|
| Nativni | 100 | 100 |
| TC | 15 | 54 |

3.8.3 Kristalografska identifikacija mogućih SBS kod *BliAmy*

Nakon uspešno optimizovanog „upstream and downstream” procesovanja obezbeđena je dovoljna količina čistog *BliAmy* za kristalografske studije.

3.8.3.1 Određivanje kristalne strukture native *BliAmy*

Kristalna struktura *BliAmy* određena je molekulskom zamenom pri rezoluciji od 1,95 Å (Slika 20). Struktura se sastoji iz tri domena. N-terminalni katalitički domen A sastavljen od 291 aminokiselinskog ostatka (3 do 103 i 207 do 396), koje formiraju strukturu $(\beta/\alpha)_8$ -burenceta. Domen B (aminokiselinski ostaci 104-206) insertovan je između treće β -zavojnice i trećeg α -heliksa domena A i sastoji se od dve produžene petlje. C-terminalni domen (aminokiselinski ostaci 397-482) zavija se u osmočlano antiparalelno beta-burence.



Slika 20. Model nativnog *BliAmy*.

Enzim je 96% identičan α -amilazi iz *B. licheniformis* (PDB kod 1VJS), 95% identičan α -amilazi iz *B. licheniformis* BLA, (PDB kod 1BLI) (167) sa mutacijama (R134L, N190F,

Q264S, N265Y, S310G, A320S, E465A), 94% identičan α -amilazi iz *B. licheniformis* kojoj je ekstrahovan kalcijum (PDB kod 1BPL) (57) i 95% identičan istom enzimu (PDB kod 1OB0) sa mutacijama (H133V, R134L, N190F, A209V, Q264S, N265Y, S310G, A320S) (168).

Ca^{2+} - Na^+ - Ca^{2+} metalna trijada je identična onoj kod BLA i nalazi se između domena A i B, s tim što je jon Na^+ u strukturi *BliAmy* zamenjen trećim jonom Ca^{2+} u BLA između domena A i C. Fourierova mapa anomalnih razlika nije potvrdila prisustvo jona Ca^{2+} na ovoj poziciji. Ligandi za jon Na^+ su Gly300, Tyr302, His406, His406, Asn407, i Asp430. Jon Cl^- koji je nađen kod drugih struktura amilaza takođe nije vidljiv na mapi anomalija (57).

Struktura aktivnog mesta lociranog na C-terminalnom kraju $(\beta/\alpha)_8$ -burenceta domena A identična je gore pomenutim strukturama. U nativnoj strukturi molekul malonata iz kristalizacionog medijuma vezan je za aktivno mesto vodoničnim vezama za His235 (+1 mesto vezivanja supstrata tj. šećera) i Glu261, koji zauzima dvostruku konformaciju.

Cis peptidna veza između Trp184 i Glu185 je od vitalnog značaja za održanje integriteta metal-vezujuće rešetke (168). U nativnoj strukturi *BliAmy* Trp184 je detektovan u dve različite konformacije bočnog lanca, dok je kristalizovan sa akarbozom detektovan u trećoj konformaciji. Različite konformacije najverovatnije su posledica kontakta među kristalima.

3.8.3.2 Određivanje kristalne strukture native *BliAmy* u kompleksu sa supstratima i inhibitorima

Određena je kristalna struktura *BliAmy* u kompleksu sa supstratima maltozom (G2) i maltoheksaozom (G6), poznatim inhibitorom amilaza akarbozom i β -ciklodekstrinom koji se često koristi kao molekul koji oponaša skrob. Akarboza se sastoji od akarviozinske grupe sa maltozom na redukujućem kraju i predstavlja pseudotetrasaharid koji je analog prelaznog stanja u hidrolizi supstrata i na taj način inhibira amilaznu aktivnost (54,169). β -ciklodekstrin (β -CD) predstavlja ciklični, neredukujućih maltooligosaharid izgrađenih od sedam α -D-glukopiranoznih jedinica povezanih međusobno α -1,4-glikozidnim vezama. β -CD

kompetitivno inhibira amilaznu aktivnost tako što interaguje sa aktivnim mestom u enzimu ili se vezuju za neko drugo mesto na enzimu (170).

U kristalnoj strukturi *BliAmy* u kompleksu sa akarbozom vidi se da se molekuli akarboze vezuju u enzimu za dva mesta, aktivno i još jedno, koje se nalazi na N-terminalnom kraju $(\beta/\alpha)_8$ -burenceta, Slika 21-1. Valienaminski ostatak vezan za enzim van aktivnog mesta vodoničnim vezama je u kontaktu sa Thr38, Glu255 i Tyr358. Interakcije enzima sa dideoksi-glukoznom jedinicom uglavnom su hidrofobne prirode. Prsten šećera ostvaruje interakcije sa Tyr358 i sa prstenom Phe257 koji ima karakterističan T-oblik. Jedna vodonična veza ostvaruje se sa karbonilnom grupom glavnog lanca Val318. Maltozni ostatak u akarbozi ostvaruje vodonične veze sa amidnom kičmom Gly357, Glu255 i karbonilnom kičmom Pro317.

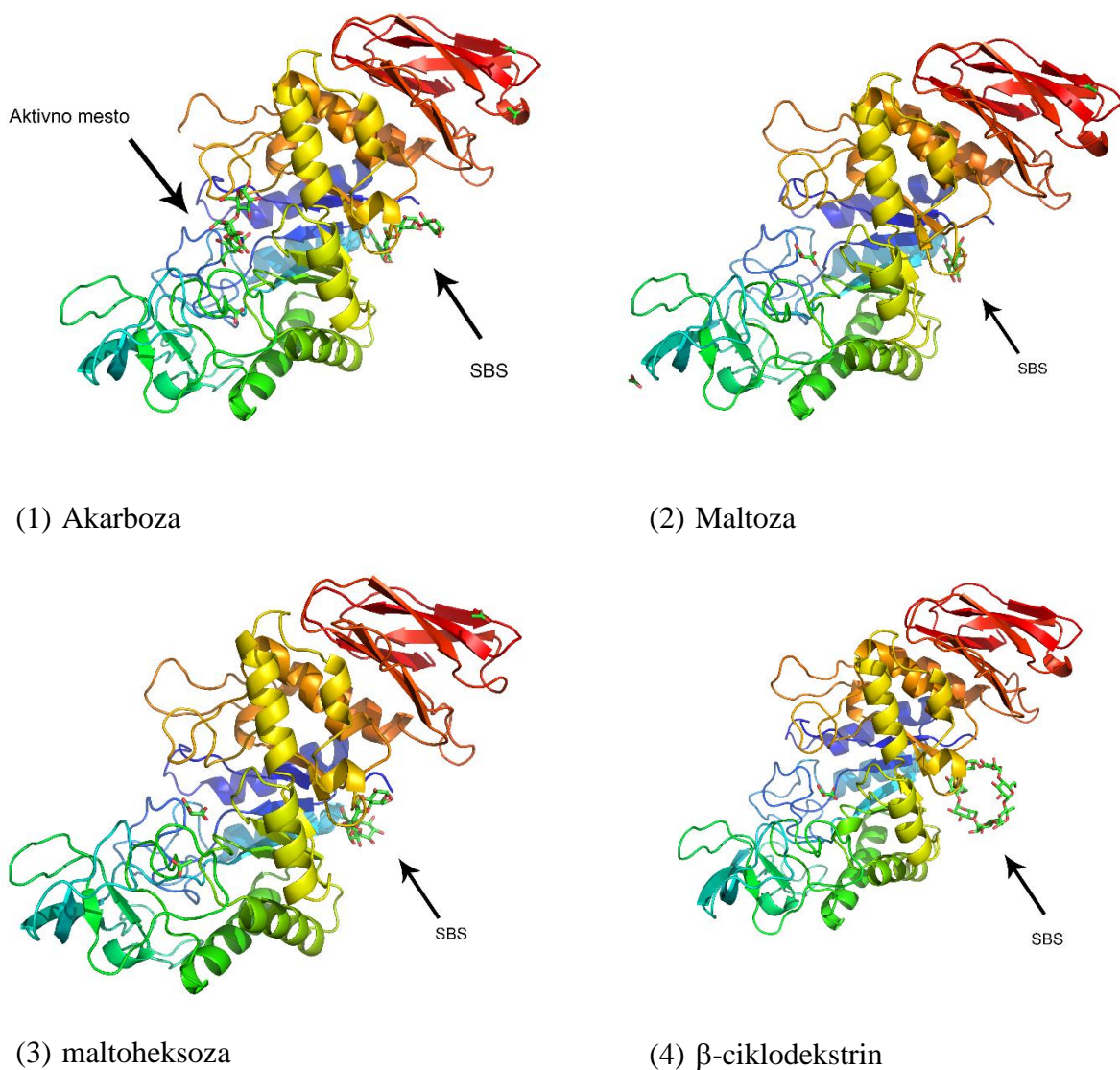
Kristali *BliAmy* natopljeni maltozom takođe pokazuju elektronsku gustinu za disaharid na udaljenom vezujućem mestu napred opisanom za akarbozu, Slika 21-2. Dve glukozne jedinice preklapaju se sa valienaminom i dideoksi grupom akarboze na vezujućem mestu kristala natopljenih akarbozom i ostvaruju slične interakcije.

Kristali natopljeni maltoheksozom pokazuju elektronsku gustinu koja odgovara maltotetrozi u udaljenom vezujućem mestu napred opisanom, Slika 21-3. Druga i treća glukozna jedinica preklapaju se sa maltozom. Neredukujući kraj šećera (1) uspostavlja jednu vodoničnu vezu sa karbonilnom grupom kičme Asp94 i Thr38. Redukujući kraj šećera (4) preklapa se sa prvom glukoznom jedinicom akarboze i ostvaruje isti tip interakcija sa proteinom. Dve spoljašnje glukozne jedinice su verovatno fleksibilne i ne ostvaruju interakcije sa proteinom na ovom mestu vezivanja odnosno ne ostvaruju interakcije sa proteinom, te se stoga ne vidi njihova elektronska gustina.

U kristalima natopljenim β -ciklodekstrinom ovaj analog substrata takođe se vezuje za udaljeno vezujuće mesto, napred opisano, Slika 21-4. Od sedam glukoznih jedinica koje čine prsten ovog molekula, dve se preklapaju sa dvema glukoznim jedinicama akarboze ostvarujući slične interakcije sa proteinom.

Na osnovu dobijenih rezultata kristalnih struktura nativnog enzima i kristalizovanog sa supstratima i inhibitorima može se zaključiti da *BliAmy* nema SBS opisan za α -amilazu iz ječma koja je nazvana mašice za šećer zbog tirozina (Tyr380) kao ni SBS koga čine Trp278 i

Trp279 (166), (Lys-His kod *BliAmy*). Tyr105 na mestu vezivanja -6 u aktivnom mestu amilaza dominantan je u hidrolizi oligosaharida (111). Ekvivalent ostatka Tyr105 kod *BliAmy* je Trp138 koji zajedno sa Trp165 (na -4 mestu vezivanja u aktivnom mestu) formira jako vezujuće mesto za šećere. Ovo mesto nije pristupačno u kristalnoj strukturi *BliAmy*. Trp165 ostvaruje π - π interakcije sa Trp165 iz drugog molekula *BliAmy* kristalisanog u simetriji, a Trp138 hidrofobno interaguje sa bočnim lancem Lys70 iz tog drugog molekula *BliAmy* kristalisanog u simetriji.



Slika 21. Strukture *BliAmy* u kompleksu sa (1) akarbozom, (2) maltozom, (3) maltoheksozom i (4) β -ciklodekstrinom.

Struktura α -amilaze iz *B. halmapalus* (71% identičnost sekvencije sa *BliAmy*) sadrži nonasaharid u aktivnom mestu koji je proizvod transglikozilovanja koji se proteže od -6 do +3 mesta vezivanja (PDB kod 1W9X) (171). Iako na mestima vezivanja šećera -5 i -6 postoje ekvivalentni Trp140 i Trp167 transglikozilacija nije primećena kod *BliAmy*. Moguće je da je vreme potapanja sa supstratom od 20 min prekratko za ovu reakciju ili ona jednostavno nije moguća kod *BliAmy* (172).

Na osnovu dobijenih rezultata može zaključiti da se SBS u *BliAmy* nalazi na N-terminalnom kraju $(\beta/\alpha)_8$ -burenceta i da su aromatične aminokiseline Phe257 i Tyr358 značajne za hidrofobne interakcije enzima sa skrobom. Za ispitivanje značajnosti ovih aminokiselina u hidrolizi skroba racionalnim dizajnom napravljeni su mutanti F257A i Y358A, tako što su tirozin i fenilalanin mutirani u alanin. Mutanti su proizvedeni optimizovanom fermentacijom na isti način kao i *BliAmy* (3.1.1) i prečišćeni na Nuvia cPrime™ koloni (3.7.2). Prečišćeni mutanti su okarakterisani i upoređeni sa *BliAmy* prema specifičnoj enzimskoj aktivnosti, sposobnosti adsorpcije i kinetičkim parametrima u hidrolizi rastvornog i sirovog skroba.

3.8.3.3 Karakterizacija mutantnih varijanti *BliAmy* F257A i Y358A

3.8.3.3.1 Adsorpcija mutantnih varijanti *BliAmy* F257A i Y358A na skrobne granule

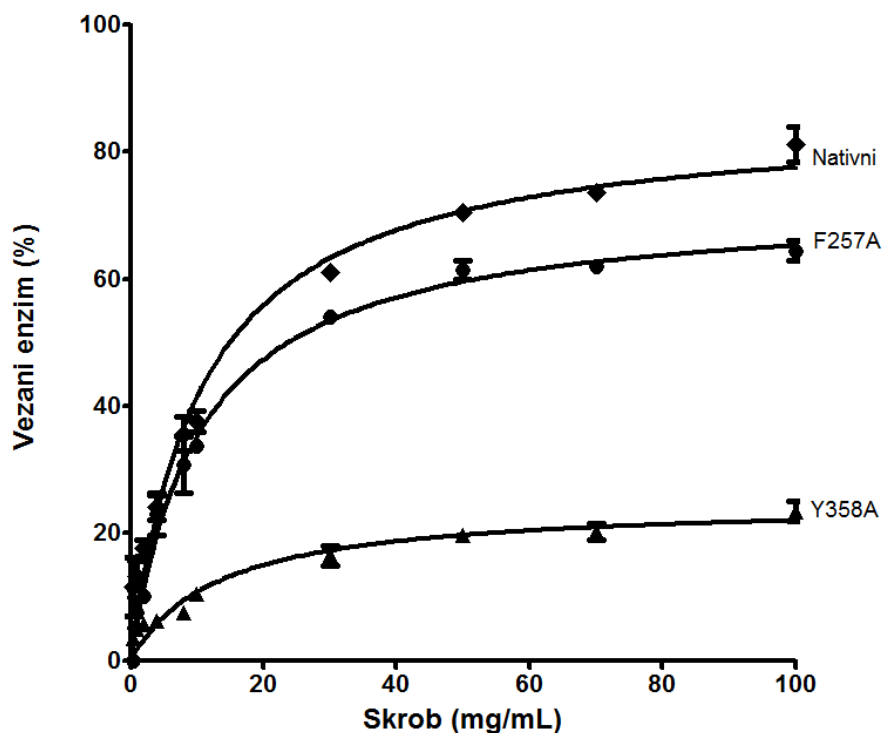
Nakon prečišćavanja mutanata dobijene su čiste frakcije enzima koje su svedene na istu koncentraciju proteina kao i nativni *BliAmy*. Adsorpcija na skrobne granule je rađena isto kao što je opisano u odeljku 3.8.2.1 s tim što je korišćena veća količina enzima, umesto 8 nM uzeto je 750 nM jer je količina proteina morala da se koriguje kako bi bila ista za sve tri varijante enzima, a da se pri tome može odrediti enzimskom aktivnošću količina adsorbovanog proteina.

Vrednosti za konstantu disocijacije (Kd) i maksimalnu količinu adsorbovanog enzima (Bmax) dobijene su fitovanjem Langmuir-ove adsorpcione izoterme (Tabela 11, Slika 22). Sa prikazane adsorpcione izoterme možemo zaključiti da i nativne i mutantne varijante enzima imaju slične vrednosti za konstantu disocijacije, ali se maksimalne količine adsorbovanog

enzima značajno razlikuju. Na adsorpciju najveći uticaj ima Tyr 358 jer se za Y358A Kd povećana 1,2 puta a Bmax smanjena 3,5 puta, on se zapravo veoma slabo adsorbuje za skrobne granule nezavisno od njihove koncentracije. Nativni enzim i mutant F257A pokazuju porast u količini vezanog proteina sve do 30 mg/mL skroba, a nakon toga sa porastom koncentracija adsorpcija ostaje približno ista.

Tabela 11. Konstatnta disocijacije i maksimalna količina adsorbovanog enzima dobijene fitovanjem Langmuir-ove adsorpcione izoterme.

| <i>BliAmy</i> | Kd (mg/mL) | Bmax (%) |
|---------------|-------------|-------------|
| Nativni | 10,70 ±1,33 | 85,86 ±3,02 |
| F257A | 10,40 ±0,93 | 72,03 ±1,80 |
| Y358A | 13,12 ±2,54 | 24,92 ±1,43 |



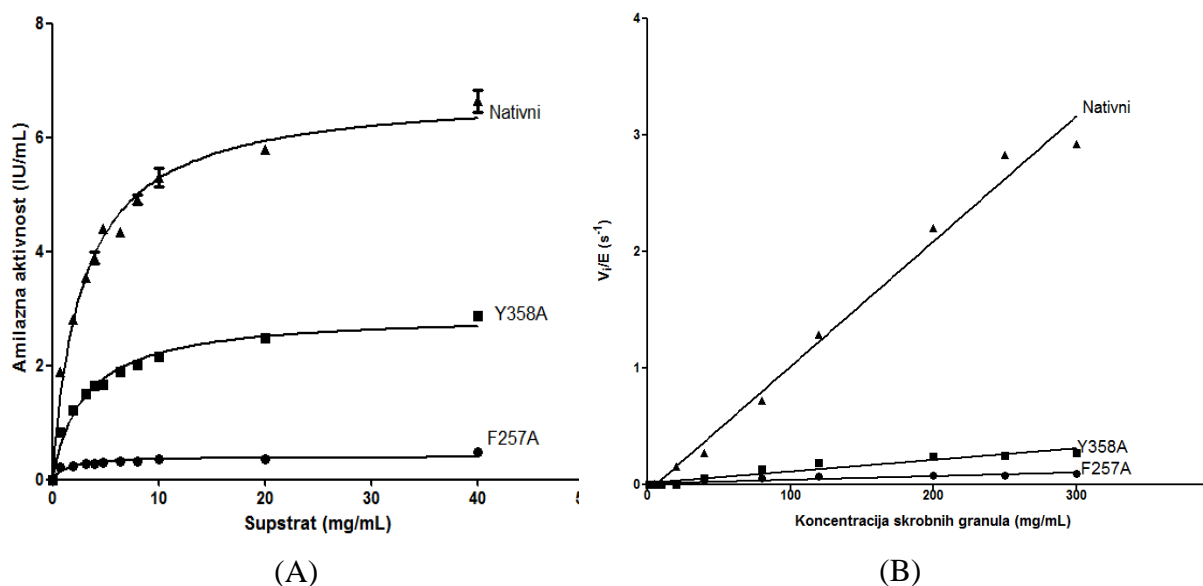
Slika 22. Langmuirova adsorpciona izoterma za količinu adsorbovanih varijanti enzima na različite koncentracije sirovog kukuruznog skroba.

3.8.3.2 Kinetika hidrolize rastvornog i sirovog skroba mutantima *BliAmy* F257A i Y358A

Poređenje mutantnih sa nativnom varijantom enzima u hidrolizi rastvornog i sirovog skroba urađeno je prećenjem kinetike hidrolize rastvornog i sirovog skroba, odnosno određivanjem kinetičkih parametara k_{cat} , K_M i konstante specifičnosti k_{cat}/K_M . Kinetika je rađena na isti način kao što je opisano u odeljku 3.8.2.2, s tim što je korišćena veća količina enzima i to 75 nM za rastvorni skrob a 3,75 - 3750 nM za sirovi skrob. Vrednosti kinetičkih konstanti prikazani su u Tabeli 12 i na Slici 23.

Tabela 13. Hidroliza rastvornog i sirovog skroba enzimskim varijantama *BliAmy*.

| <i>BliAmy</i> | rastvorni skrob | | sirovi skrob | |
|---------------|-------------------|--------------|--|---|
| | $k_{cat}(s^{-1})$ | $K_m(mg/mL)$ | k_{cat}/K_m ($s^{-1}mgmL^{-1}$) (%) | k_{cat}/K_m ($s^{-1}mg mL^{-1}$) (%) |
| Nativni | 1587 | 0,2864 | 5541 (100) | 0,01072 (100) |
| F257A | 95 | 0,1304 | 729 (13,16) | 0,00031 (2,93) |
| Y358A | 676 | 0,3054 | 2213 (39,94) | 0,00099 (9,25) |



Slika 23. (A) Hidroliza rastvornog skroba enzimskim varijantama *BliAmy*, V_0 (amilazna aktivnost) prikazana u funkciji koncentracije supstrata. (B) Hidroliza sirovog kukuruznog skroba enzimskim varijantama *BliAmy* prikazana kao $V_0/[E]$ u funkciji koncentracije supstrata.

Značajno smanjenje specifične aktivnosti u odnosu na *BliAmy* (2416 IU/mg) je primećeno kod oba mutanta; kod mutanta F257A specifična aktivnost (17 IU/mg) je opala na 0,7 % (142 puta manja aktivnost) dok je kod Y358A specifična aktivnost (128 IU/mg) opala na 5,3 % (19 puta manja aktivnost). Mutantne varijante enzima su pokazale značajne promene i u adsorpciji i u hidrolizi skroba. Na hidrolizu i rastvornog i sirovog skroba imaju uticaj oba SBS mesta, to se može zaključiti poređenjem k_{cat}/K_m za nativni i mutantne varijante *BliAmy*. F257A ima samo oko 3% vrednosti katalitičke efikasnosti nativnog enzima i za rastvorni i za sirovi skrob, dok Y358A pokazuje 45% vrednosti katalitičke efikasnosti nativnog enzima za rastvorni, odnosno 9,35% vrednosti katalitičke efikasnosti nativnog enzima za sirovi skrob. Na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da je uloga SBS na površini *BliAmy* najverovatnije u usmeravanju lanca oligosaharida skroba ka aktivnom mestu i ona je veoma bitna za katalitičku aktivnost enzima. Ovo je prvi put da je detektovano SBS u amilazi poreklom iz *B. licheniformis*. Šta više F257 nije kao takva poznata u literaturi, dok je Y363 koji odgovara Y358 kod *BliAmy* detektovan u SBS mestu α -amilaze *Bacillus* sp. 707 (Slika 24) (173).

Najdetaljnije urađeni eksperimenti o funkcijama dva SBS mesta koji se nalaze na α -amilazi iz ječma uradili su Svensson i saradici (111). Njihovi rezultati pokazuju da je u odnosu na nativni enzim AMY1, Kd adsorpcije na skrobne granule za mutante W278A, W279A i W278A/W279A (SBS1 mesto) porasla 15-35, puta dok je katalitička efikasnost prema skrobnim granulama (kcat/Km) pala na 11% - 2%. S druge strane kod mutanta Y380A (SBS2 mesto) i afinitet i katalitička efikasnost su pali na 10% od vrednosti za nativni enzim. Dobijeni rezultati ukazuju na značaj SBS mesta kao ključnog u mehanizmu delovanja α -amilaze koja nema SBD. Identifikacija SBS mesta može pružiti zanimljiv način modulacije enzimskih osobina bez potrebe da se menja, često veoma osetljivo, aktivno mesto enzima.

Daljim eksperimentima kao što su enzimska kinetika prema amilozi i amilopektinu, određivanje stepena višestrukog napada DMA (od eng. Degree of Multiple Attack), kao i individualnih energija vezivanja za SBS mesto upotpuniće sliku o mogućnostima dalje manipulacije ovim aminokiselinama u cilju dobijanja efikasnijeg biokatalizatora.

3.9 Optimizacija dobijanja bioetanola iz sirovog kukuruznog skroba korišćenjem *BliAmy*

Iako postoji veliki broj literaturnih podataka o optimizaciji hidrolize sirovog skroba, oni su dosta različiti u zavisnosti od toga koji proces se primenjuje. Ukoliko se primenjuje SSF, obično čitav proces traje dugo jer se sve odvija na temperaturi od 30°C, a ukoliko se primenjuje SHL, proces hidrolize se najčešće sastoji iz dve faze jer α -amilaza i glukoamilaza imaju različite pH i temperaturne optimume, koji se razlikuju i od uslova fermentacije kvascem (treća faza). Cilj ove optimizacije bio je dobijanje bioetanola brzo i jednostavno i u tom smislu definisano je da traje dva radna dana (oko 36 sati) i u kojem bi se radio simultan proces hidrolize i saharifikacije skroba, ukoliko se pokaže da enzimi mogu sinergistički da deluju na skrob na istom pH (po mogućstvu pH 4,5 koje je optimalno za fermentaciju kvascima), a da se zatim samo smanji temperatura pre dodatka kvasca čime bi se proces pojednostavio.

Za proces simultane hidrolize i saharifikacije (SHS) sirovog kukuruznog skroba korišćena su dva enzima *BliAmy* i komercijalni enzim Dextrozyme[®] GA (Novozyme, Danska). *BliAmy* je korišćen kao delimično prečišćen enzimski preparat. Dextrozyme[®] GA sadrži glukoamilazu genetski modifikovanog soja *Aspergillus* sp. sa aktivnošću od 270 amiloglukozidaznih (AGU) jedinica po gramu i korišćen je za saharifikaciju. Jedna jedinica amiloglukozidazne aktivnosti se definiše kao potrebna količina enzima za oslobađanje jednog mmola D-glukoze po minuti iz rastvornog skroba na pH 4,5 i 40 ° C.

3.9.1 Box-Behnken-ov dizajn (BBD) za optimizaciju simultane hidrolize i saharifikacije sirovog kukuruznog skroba korišćenjem *BliAmy*

Optimizacija SHS sirovog kukuruznog skroba primenom BBD podrazumeva pronalaženje vrednosti promenljivih (X) kojima se poboljšava proces pri čemu je obim poboljšanja određen prema unapred definisanim kvantitativnim kriterijumima. Nezavisne promenljive i odgovarajuća vrednost je određena na osnovu optimalnih uslova oba enzima, literaturnih podataka i preliminarnih eksperimentalnih rezultata. U cilju pronalaženja optimalnih promenljivih, urađena je statistička optimizacija svih značajnih promenljivih koje utiču na proces: količina *BliAmy* (X_1), količina komercijalne glukoamilaze (GA) Dextrozyme[®] GA (X_2), pH (X_3), vreme dodavanja GA (X_4) i vreme inkubacije (X_5). BBD kvadratni model nezavisnih promenljivih sa dobijenim eksperimentalnim rezultatima prikazan je u Tabeli 13.

Regresionom analizom dobijen je kvadratni model koji opisuje procenat hidrolize sirovog kukuruznog skroba u zavisnosti od datih promenljivih i njihovog međusobnog uticaja:

$$\text{Procenat hidrolize (Y)} = 73,33 + 8,00 X_1 + 5,50 X_2 + 1,94 X_3 - 0,19 X_4 + 3,88 X_5 + 1,75 X_1 X_2 - 7,50 X_1 X_3 + 0,75 X_1 X_4 + 0,50 X_1 X_5 + 5,00 X_2 X_3 - 3,75 X_2 X_4 + 0,000 X_2 X_5 - 1,00 X_3 X_4 + 1,75 X_3 X_5 + 2,25 X_4 X_5 + 1,60 X_1^2 - 1,40 X_2^2 + 0,35 X_3^2 + 0,85 X_4^2 + 1,44 X_5^2 \quad (11)$$

Jednačina (11) je prikazana kroz kodirajuće vrednosti faktora i može se koristiti za predviđanje odgovora na nivou svakog faktora. Takođe kodirana jednačina je korisna i za identifikaciju relativnog uticaja svakog faktora na osnovu njegovog koeficijenta. Plus ukazuje

na to da ta promenljiva ima pozitivan efekat na procenat hidrolize, dok minus ukazuje na negativni uticaj.

ANOVA je urađena za procenu značajnosti datog kvadratnog modela i uticaja linearnih, interakcionih i kvadratnih koeficijenata u regresionoj analizi (Tabela 14). F-vrednost modela od 7,22 i p-vrednost od $p < 0,0001$ ukazuju na visoku značajnost modela. Najznačajni uticaj su imali koeficijenti promenljivih: X_1 , X_2 , X_3 , X_5 , X_1X_3 , X_2X_3 , X_2X_4 .

ANOVA testom su procenjeni i kvadrata koeficijenta korelacije R^2 (0,8678) i kvadrata koeficijenta korelacije prilagođenog ukupnom broju eksperimenata, R^2_{adj} (0,8975) koji ukazuje na to da se samo 13,22 % od ukupnih varijacija ne mogu objasniti datim modelom. Na osnovu statističke evaluacije kvadratnog modela pokazano je da je model dobar i da se može primeniti u proceni optimalnih uslova simultane hidrolize suspenzije skroba visoke koncentracije za proizvodnju bioetanol.

3D grafici odgovornih površina i interakcioni grafici (Slika 25) prikazuju interaktivne efekte dve nezavise promenljive na procenat hidrolize. Procenat hidrolize opada sa porastom pH kada se količina *BliAmy* nalazi na maksimalnom nivou (5 IU/mg), dok do povećanja dolazi sa porastom količine *BliAmy* kada se pH nalazi na minimalnom nivou (pH 4,5) (Slika 25.a). Smanjenjem pH može se povećati glukoamilazna aktivnost što za posledicu ima ubrzavanje hidrolize dekstrina.

Pozitivni interaktivni efekti glukoamilaze i pH na procenat hidrolize se mogu videti na Slici 25.b. Oni ukazuju na to da pH ima veoma mali efekat pri minimalnoj količini glukoamilaze, dok se veliki pozitivan efekat dobija pri visokoj količini glukoamilaze.

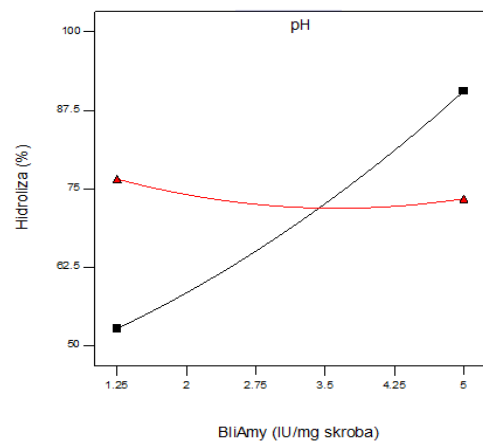
Na Slici 25.c se mogu videti interaktivni efekti količine glukoamilaze i vremena dodavanja GA na procenat hidrolize. Procenat hidrolize značajno raste sa dodatkom maksimalne količine GA na samom početku procesa. To se može potvrditi i na osnovu toga što količina GA ima pozitivan linerni efekat, ali zato i negativan interakcioni (X_2X_4) i kvadratni (X_2^2) efekat na procenat hidrolize.

Tabela 13. BBD za opimizaciju procesa SHS sirovog kukuruznog skroba.

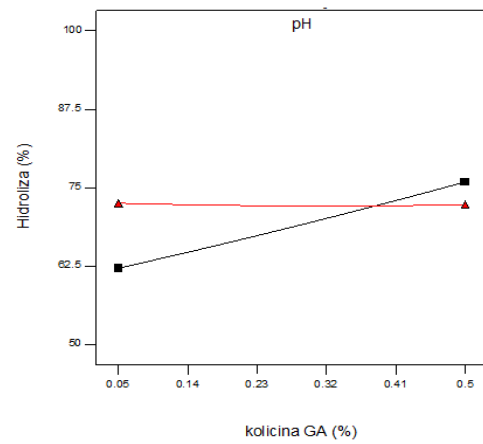
| Redosled eksperimenata | X ₁ <i>Bli</i> Amy (IU/mg) | X ₂ GA (%) | X ₃ pH | X ₄ Dodatak GA (h) | X ₅ Vreme inkubiranja (h) | Y Procenat hidrolize (%) |
|---------------------------|---|-----------------------------|----------------------|-------------------------------------|--|--------------------------------|
| 1. | 3,125 | 0,5 | 5,5 | 2 | 25 | 83 |
| 2. | 3,125 | 0,5 | 5,5 | 4 | 18 | 76 |
| 3. | 3,125 | 0,5 | 6,5 | 2 | 18 | 57 |
| 4. | 3,125 | 0,5 | 4,5 | 2 | 18 | 72 |
| 5. | 5 | 0,5 | 5,5 | 2 | 18 | 90 |
| 6. | 3,125 | 0,5 | 5,5 | 0 | 18 | 84 |
| 7. | 3,125 | 0,5 | 5,5 | 2 | 11 | 77 |
| 8. | 1,25 | 0,5 | 5,5 | 2 | 18 | 69 |
| 9. | 5 | 0,275 | 5,5 | 2 | 25 | 87 |
| 10. | 3,125 | 0,275 | 4,5 | 2 | 25 | 75 |
| 11. | 3,125 | 0,275 | 5,5 | 2 | 18 | 75 |
| 12. | 5 | 0,275 | 4,5 | 2 | 18 | 90 |
| 13. | 5 | 0,275 | 5,5 | 4 | 18 | 84 |
| 14. | 3,125 | 0,275 | 6,5 | 4 | 18 | 77 |
| 15. | 3,125 | 0,275 | 4,5 | 0 | 18 | 70 |
| 16. | 3,125 | 0,275 | 5,5 | 2 | 18 | 70 |
| 17. | 5 | 0,275 | 5,5 | 2 | 11 | 79 |
| 18. | 3,125 | 0,275 | 4,5 | 2 | 11 | 67 |
| 19. | 3,125 | 0,275 | 5,5 | 0 | 25 | 76 |
| 20. | 3,125 | 0,275 | 6,5 | 2 | 11 | 75 |
| 21. | 3,125 | 0,275 | 5,5 | 4 | 11 | 69 |
| 22. | 3,125 | 0,275 | 4,5 | 4 | 18 | 72 |
| 23. | 1,25 | 0,275 | 5,5 | 4 | 18 | 65 |
| 24. | 1,25 | 0,275 | 5,5 | 0 | 18 | 67 |
| 25. | 3,125 | 0,275 | 6,5 | 0 | 18 | 79 |
| 26. | 5 | 0,275 | 6,5 | 2 | 18 | 77 |
| 27. | 3,125 | 0,275 | 6,5 | 2 | 25 | 81 |
| 28. | 3,125 | 0,275 | 5,5 | 0 | 11 | 74 |
| 29. | 1,25 | 0,275 | 4,5 | 2 | 18 | 52 |
| 30. | 1,25 | 0,275 | 5,5 | 2 | 11 | 63 |
| 31. | 3,125 | 0,275 | 5,5 | 2 | 18 | 68 |
| 32. | 1,25 | 0,275 | 6,5 | 2 | 18 | 80 |
| 33. | 3,125 | 0,275 | 5,5 | 4 | 25 | 80 |
| 34. | 5 | 0,275 | 5,5 | 0 | 18 | 83 |
| 35. | 1,25 | 0,275 | 5,5 | 2 | 25 | 69 |
| 36. | 3,125 | 0,05 | 6,5 | 2 | 18 | 69 |
| 37. | 3,125 | 0,05 | 5,5 | 0 | 18 | 66 |
| 38. | 3,125 | 0,05 | 5,5 | 4 | 18 | 73 |
| 39. | 3,125 | 0,05 | 5,5 | 2 | 11 | 66 |
| 40. | 5 | 0,05 | 5,5 | 2 | 18 | 76 |
| 41. | 3,125 | 0,05 | 5,5 | 2 | 25 | 72 |
| 42. | 1,25 | 0,05 | 5,5 | 2 | 18 | 62 |
| 43. | 3,125 | 0,05 | 4,5 | 2 | 18 | 70 |

Tabela 14. ANOVA za BBD

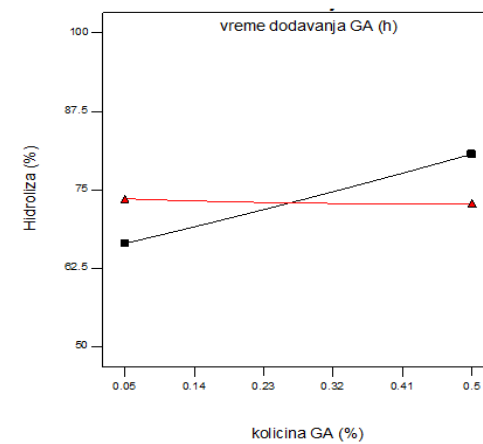
| | Suma kvadrata | Stepeni slobode | Srednji kvadrat | F vrednost | P vrednost |
|-------------------------------|---------------|-----------------|-----------------|------------|------------|
| Model | 2177,75 | 15 | 145,18 | 5,97 | < 0,0001 |
| X ₁ | 1207,56 | 1 | 1207,56 | 49,64 | < 0,0001 |
| X ₂ | 182,25 | 1 | 182,25 | 7,49 | 0,0108 |
| X ₃ | 45,56 | 1 | 45,6 | 1,87 | 0,1824 |
| X ₄ | 0,56 | 1 | 0,56 | 0,023 | 0,8803 |
| X ₅ | 175,56 | 1 | 175,56 | 7,22 | 0,0122 |
| X ₁ X ₂ | 12,25 | 1 | 12,25 | 0,50 | 0,4840 |
| X ₁ X ₃ | 420,25 | 1 | 420,25 | 17,27 | 0,0003 |
| X ₁ X ₄ | 2,25 | 1 | 2,25 | 0,092 | 0,7634 |
| X ₁ X ₅ | 1,00 | 1 | 1,00 | 0,041 | 0,8409 |
| X ₂ X ₃ | 49,00 | 1 | 49,00 | 2,01 | 0,1673 |
| X ₂ X ₄ | 56,25 | 1 | 56,25 | 2,31 | 0,1400 |
| X ₂ X ₅ | 0,000 | 1 | 0,000 | 0,000 | 1,0000 |
| X ₃ X ₄ | 4,00 | 1 | 4,00 | 0,16 | 0,6883 |
| X ₃ X ₅ | 1,00 | 1 | 1,00 | 0,041 | 0,8409 |
| X ₄ X ₅ | 20,25 | 1 | 20,25 | 0,83 | 0,3697 |
| Ostatak | 656,85 | 27 | 24,33 | | |
| Lack of Fit | 606,85 | 25 | 24,27 | 0,97 | 0,6283 |



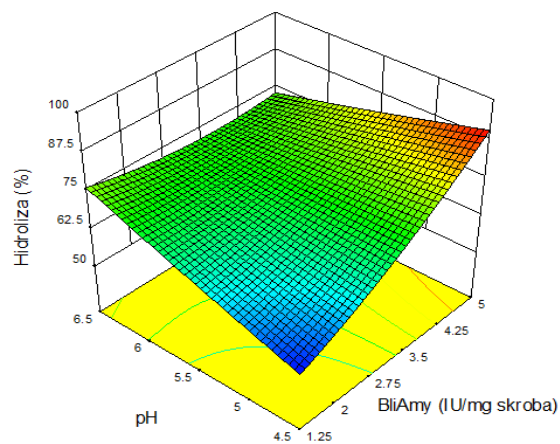
a)



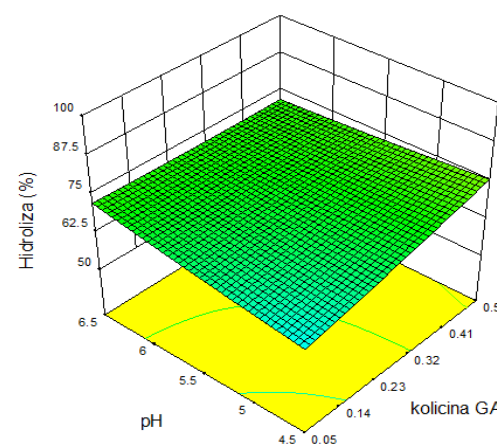
b)



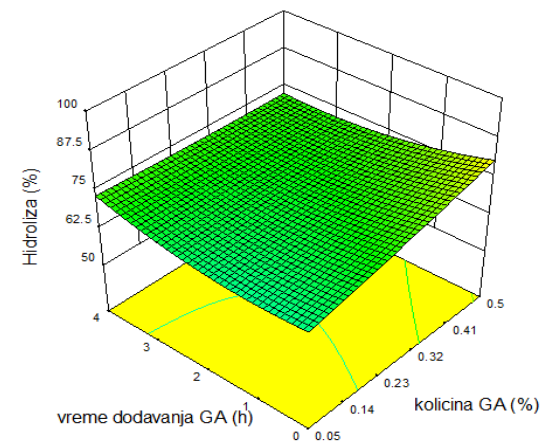
c)



d)



e)



f)

Slika 25. 3D grafici odgovornih površina i interakcioni grafici. Uticaj (a,d) količine *BliAmy* i pH, (b,e) količine GA i pH, (c) količine GA i vremena dodavanja GA. Ostale tri promenljive su fiksirane u vrednosti centralne tačke. Vrednosti prvog faktora u interakciji su prikazane na x-osi grafika, a vrednosti drugog faktora su prikazane u crvenoj (maksimalna vrednost) i crnoj boji (minimalna vrednost).

Na osnovu sva tri prikaza najznačajnijih interakcija možemo zaključiti da se najveći procenat hidrolize dobija ako se istovremeno dodaju maksimalne količine oba enzima, *BliAmy* i *Deztrzyme GA* na pH 4,5.

3.9.2 Proizvodnja bioetanola iz komercijalne dekstroze

Pre produkcije bioetanol iz skroba, urađen je preliminarni eksperiment produkcije iz čiste glukoze, radi određivanja uslova efikasne fermentacije korišćenjem raspoloživog soja kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Alltech-Fermin, Srbija). Za efikasnu alkoholnu fermentaciju izabran je dodatak 20% kvasca imajući u vidu da se većim koncentracijama skraćuje vreme trajanja fermentacije na jedan dan (174). Uslovi fermentacije su obuhvatili 30%-nu komercijalnu glukozu, vreme trajanja fermentacije od 20 sati, dodatak suplementa u obliku ekstrakta kvasca od 5 g/L (175), temperatura od 30°C, pH 4,5 i brzina mešanja 180 rpm.

Maksimalni teorijski prinos etanola iz glukoze je izračunat u skladu sa stehiometrijskim odnosom, odnosno iz 100 g glukoze može se proizvesti 56,79 g etanola. Prinos etanola u odnosu na ukupnu masu početne glukoze je obračunata jednačinom:

$$Y_E(\%) = \frac{C_E \times 100\%}{C_S \times 0,568} \quad (12)$$

gde je Y_E dobijeni prinos etanola, C_E koncentracija etanola u fermentacionoj tečnosti, C_S početna masa glukoze i 0,568 koeficijent transformacije grama glukoze u gram etanola.

Na ovaj način dobijeno je 5 g/L/h alkohola, a maksimalni teorijski prinos etanola izračunat u skladu sa stehiometrijskim odnosom iznosio je 88%.

3.9.3 Proizvodnja bioetanola iz kukuruznog skroba

Za proizvodnju bioetanola, odabran je proces simultane hidrolize i saharifikacije u kojem su *BliAmy* i GA dodati odmah u 30%-ni rastvor skroba pH 4,5, na 60°C, a hidroliza je trajala 16 sati. Nakon toga temperatura je u bioreaktoru spuštana na 30°C, dodat je ekstrakt kvasca i 20%-ni *Saccharomyces cerevisiae* i fermentacija je trajala 20 sati. Nakon završene fermentacije uzorak je centrifugiran, a sadržaj alkohola u supernatantu određen je NMR-om. Na ovaj način dobijeno je 3,24 g/L x h alkohola, a maksimalni teorijski prinos etanola izračunat iz jednačine 12 je iznosio 86% teorijske vrednosti alkohola. Može se reći da je ovo odličan rezultat imajući u vidu da je pri istim uslovima iz komercijalne glukoze maksimalni teorijski prinos etanola 88% alkohola.

Koncentracija suve materije od 30% omogućava visoke prinose etanola i najčešće se primenjuje u industriji (tipično 30-32%) (176), a to je i koncentracija kukuruznog skroba na kojoj je optimizovana hidroliza korišćenjem *BliAmy* (odjeljak 3.3), pa je ona odabrana za produkciju bioetanola u procesu simultane hidrolize i saharifikacije.

DOE je pokazao da *BliAmy* i GA mogu na pH 4,5 u potpunosti da hidrolizuju visoko koncentrovan sirovi kukuruzni skrob nakon produženog vremena inkubacije, ali na osnovu dobijene kvadratne jednačine (11), može se predvideti minimalna količina oba enzima potrebna da se za 16 sati dobije oko 90% hidrolize (koliko se postiže i samim *BliAmy* nakon 24 sata). Zato je odabrana količina *BliAmy* od 1 IU /mg skroba (što je 11,5 puta manje nego kada se za hidrolizu koristio samo *BliAmy*, sekcija 3.4) i 0,5% GA odmah na početku procesa.

U literaturi se može naći podatak da je u eksperimentima korišćena koncentracija 0,02% (g/kg skroba) komercijalnog enzima Termamyl® 120L u fazi otečnjavanja skroba na visokim temperaturama (konvencionalno dobijanje alkohola). Tako su Montesinos i Navaro hidrolizovali pšenično brašna koristeći 0,02% (g/kg skroba) enzima Termamyl® 120L na temperaturi od 95°C (177), dok su Xu i saradnici u fazi otečnjavanja skroba kukuruznog brašna koristili koncentraciju α -amilaze od 0,05% (g/kg skroba) na 95°C (178). Ako se količina dodate *BliAmy* uporedi na osnovu amilazne aktivnosti sa komercijalnom α -amilazom Termamyl® 120L može se zaključiti da je za SHS proces dodato 5% (g/kg skroba) *BliAmy*.

Drugim rečima dodaje se 100 puta više enzima *BliAmy* nego u konvencionalnom procesu dobijanja alkohola, što je razumljivo ako se ima u vidu da su uslovi hidrolize značajno ispod optimalnih vrednosti za ovu amilazu (98). U literaturi se ne mogu naći podaci o simultanom procesu hidrolize i saharifikacije bakterijskih α -amilaza i glukoamilaza koje mogu da hidrolizuju sirovi skrob pri visokim koncentracijama na pH 4,5. Za takve procese koriste se uglavnom enzimi iz gljiva *Aspergillus niger* ili *Aspergillus awamori* (179–181), čije α -amilaze imaju optimalne pH vrednosti oko 4 - 5.

U literaturi se najčešće nalazi koncentracija glukoamilaze od 0,8% (g/kg skroba) na temperaturi od 30°C (182). Lemuz i saradnici su se u svojim eksperimentima takođe odlučili za ovu koncentraciju enzima glukoamilaze na temperaturi od 32°C, nakon što su ispitivali vrednosti koncentracije od 0,4 i 0,16% (v/w) (183). Xu i saradnici su objavili nešto višu optimalnu vrednost koncentracije glukoamilaze koja je iznosila 0,15% (v/w) na temperaturi od 65°C (178). Na osnovu BBD optimizovanih rezultata o hidrolizi kukuruznog skroba za simultane hidrolize i saharifikacije korišćena je koncentracija od 0,5 % GA jer uslovi SHS procesa odgovaraju optimalnoj temperaturi i optimalnom pH ovog enzima (184).

Primenom optimalnih koncentracija enzima postižu se visoke vrednosti prinosa glukoze iz skroba tokom hidrolize. Kvantitativno poređenje efikasnosti različitih procesa hladne hidrolize granularnog skroba za proizvodnju bioetanola nije jednostavno imajući u vidu da su u literaturi jedinice enzimске aktivnosti različito određivane, različiti su uslovi hidrolize i fermentacije, a najčešće i nedostaje podatak o tome koliko je korišćeno enzima i kvasca. Pa ipak se proces simultane hidrolize i saharifikacije sirovog kukuruznog skroba sa *BliAmy* i GA i alkoholne fermentacije koji je trajao ukupno samo 36 sati, pokazao kao veoma efikasan proces dobijanjem 86% teorijskog prinosa etanola. Poređenja radi, hladnom hidrolizom kukuruznog brašna, upotrebom komercijalog STARGEN 001TM koji sadrži α -amilazu iz *Aspergillus kawachi* i glukoamilazu iz *Aspergillus niger* dobijeno je 84,6% teorijskog prinosa etanola nakon 72 sata (181) dok je hidrolizom kukuruznog brašna enzimskim ekstraktom poreklom iz *A. niger* i *A. awamori* nakon 72 sata hidrolize na 32°C dobijen teorijski prinos etanola od 89.6% (185).

3.10. Zaključci

- U ovoj tezi je prikazana osnovna prednost primene eksperimentalnog dizajna u mogućnosti organizovanog pristupa rešavanju nekog definisanog problema, nezavisno od stepena njegove složenosti. Pokazali smo da je eksperimentalnim dizajnom, kroz optimizaciju hidrolize skroba, prečišćavanja proteina i dobijanja bioetanol, omogućena istovremena procena većeg broja faktora, kao i njihov uticaj na sistem, kao i prepoznavanje njihovog značaja i međusobnih interakcija. Na taj način se dobijaju korisnije i preciznije informacije o analiziranom sistemu usled istovremene procene uticaja većeg broja faktora, značajno smanjujući broj eksperimenata.
- Razvijeni su efikasni i reproduktivni procesi fermentacije sa ćelijama *E. coli* BL21 (DE3) i *E. coli* C43 (DE3) kroz dizajn medijuma za rast mikroorganizma i optimizaciju koraka u proizvodnji amilaze. Dobijene su velike količine *BliAmy* i to, u fermentaciji sa ćelijama *E. coli* BL21 (DE3) ukupna amilazna aktivnost od $250,5 \text{ IU mL}^{-1}$ ($0,7 \text{ g L}^{-1}$), a sa ćelijama *E. coli* C43 (DE3) 500 IU mL^{-1} ($1,2 \text{ g L}^{-1}$).
- α -Amilaza iz *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a (*BliAmy*) pokazala se kao veoma efikasna RSDA u hidrolizi granularnog skroba ispod temperature geliranja, tako da je optimizovan proces hidrolize koncentrovane suspenzije sirovog kukuruznog skroba statističkom metodom odgovornih površina.
- TLC analiza rastvorljivih oligosaharida proizvedenih u hidrolizi 30% suspenzije skroba sa *BliAmy* je pokazala da je raspodela slična uobičajnoj distribuciji oligosaharida koja se dobija u hidrolizi sirovog skroba klasičnim otečnjavajućim α -amilazama.
- Na osnovu promena u kristalnoj strukturi analiziranjem rezidualnog skroba koji zaostaju nakon hidrolize 30%-ne suspenzije nakon 5 i 24 sata pokazano je da kukuruzni skrob ima A-tip i Vh-tip kristaliniteta. Upoređivanjem difrakcionih intenziteta pikova kristalne strukture nativnog i rezidualnog

skroba nakon oba testirana vremena hidrolize može se zaključiti da nema povećanja kristaliniteta u rezidualnom skrobu. Ovo ukazuje na to da *BliAmy* najverovatnije istom brzinom hidrolizuje i kristalne i amorfne regione u granulama skroba, što je u skladu sa načinom hidrolize skrobnih granula tzv. „granula po granula“.

- Skenirajućom elektronskom mikrografijom je pokazano da pri hidrolizi kukuruznih skrobnih granula unutar istog eksperimenta nisu sve granule podjednako podložne enzimskoj hidrolizi što je verovatno posledica načina na koji se amilaza adsorbuje na granule skroba. Hidroliza se odvija „granula po granula“ pri čemu se granula kompletno hidrolizuje.
- Primenom mešovitog matriksa Nuvia cPrime™ razvijena je efikasna metoda za prečišćavanje rekombinantne *BliAmy* uz istovremeno koncentrovanje, uklanjanje pigmenata i prečišćavanje direktno iz fermentacione tečnosti u jednom koraku. Optimalni uslovi prečišćavanja na Nuvia cPrime™ za maksimalni prinos specifične aktivnosti *BliAmy* od 96% su: pH vezivanja 5,3 + 150 mM NaCl i pH eluiranja 8,0 + 500 mM NaCl.
- Određena je kristalna struktura *BliAmy* koja pokazuje da se enzim sastoji iz tri domena. N-terminalni katalitički domen A, domen B i C-terminalni domen. Kristalografskom analizom. strukture *BliAmy* u kompleksu sa supstratima i inhibitorima identifikovano je SBS mesto koje je značajno za adsorpciju na skrobne granule kao i hidrolizu što je potvrđeno eksperimentima adsorpcije i hidrolize rastvornog i sirovog skroba nakon što su racionalnim dizajnom dobijani mutanti, F257A i Y356A.
- Optimizovan je simultani proces hidrolize i saharifikacije sirovog kukuruznog skroba za proizvodnju bioetanola. Proces SHS sirovog kukuruznog skroba sa *BliAmy*-Dextrozyme GA i alkoholne fermentacije u trajanju od ukupno samo 36 sati pokazao se kao veoma efikasan proces dobijanjem 86% teorijskog prinosa etanola.

4. Eksperimentalni deo

Spisak glavne korišćene opreme:

Tehnička vaga Mettler PE 3600

Analitička vaga Mettler

Analitička vaga Shimadzu AX200

Konduktometar WTW LF521, InoLab

pH metar, InoLab pH7110

Centrifuga, miniSpin plus, Eppendorf

Centrifuga Thermo SL 40R

Kada za horizontalnu elektroforezu Hoefer HE33

Kada za horizontalnu elektroforezu Hoefer SE260

Ispravljači Pharmacia Biotech EPS 3500, Pharmacia ECPS 2000/300, Bio Rad Power PAC 200

Inkubator-mučkalica IKA KS 4000i control

Inkubator Memmert INB 300

Vodeni inkubator LabCompanion BW-20H

Termoblok Biosan TS-100

PCR Bio Rad T100

FPLC sistem Pharmacia LCC501-plus

Spektrofotometri Shimadzu UV1800 i Nano Drop 2000c

Biostat B reaktor, Sartorius

Mosquito crystallization robot (TTP Labtech)

NMR spektroskop

4.1 Semikontinualna fermentacija

4.1.1. Preinokulum bakterijske kulture

Sastav LB (Luria-Bertani) podloga:

| | |
|-------------------|---------|
| Tripton | 10 g |
| Ekstrakt kvasca | 5 g |
| NaCl | 10 g |
| Dejonizovana voda | 1000 mL |

U pripremljenu i sterilisanu podlogu dodat je ampicilin 100 mg/mL neposredno pre zasejavanja, finalno 0,1 mg/mL. Sojevi *E. coli* BL21 (DE3) i *E. coli* C43 koji sadrže pDA-amy plazmid (99) je korišćen u radu. Preinokulum bakterijske kulture zasejan je iz glicerolskog štoka inkubiran preko noći na 37°C u rotacionom šejkeru pri 150 rpm.

4.1.2 Definisana podloga za fermentaciju

Definisani mineralni medijum koji sadrži glukozu kao jedini izvor ugljenika, korišćen je za pripremu inokuluma i gajenje u bioreaktoru:

| Sastav podloge: | za preinokulum | za „batch“ | za „fed-batch“ |
|--|----------------|------------|----------------|
| glukoza 600g/L | 0,834 mL | 30 mL | 398 mL |
| makroelementi | 16,60 mL | 664 | / |
| MgSO ₄ 7H ₂ O 500g/L | 0,022 mL | 0,9 mL | 9,5 mL |
| FeCl ₃ 5 g/L | 0,120 mL | 4,58 mL | 49 mL |
| CaCl ₂ 10g/L | 0,020 mL | 0,413 mL | 4.45 mL |
| tiamin 100g/L | 0,026 mL | 1 mL | 1,65 mL |
| mikroelemenati | 0,080 mL | 2,86 mL | 31,5 |
| Voda | do 100 mL | do 900 mL | do 500mL |
| Ampicilin | 0,1 mL | 0,9 mL | / |

Sastav rastvora makroelemenata:

| | |
|----------------|----------|
| K_2HPO_4 | 11.9 g/L |
| KH_2PO_4 | 2.4 g/L |
| NaCl | 1.8 g/L |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 3 g/L |

Sastav rastvora mikroelemenata:

| | |
|----------------------|----------|
| $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ | 0.04 g/L |
| $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 1.74 g/L |
| $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ | 0.16 g/L |
| $CuSO_4 \cdot H_2O$ | 1.55 g/L |
| H_3BO_3 | 0.01 g/L |
| $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ | 0.01 g/L |
| $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ | 1.44 g/L |
| NaMoO ₄ | 1.42 g/L |

Fosfati nisu bili dodati u rastvoru za fed-bach kako bi se izbegla koprecipitacija sa solima magnezijuma. Umesto toga, koncentrovani fosfatni rastvor koji sadrži 500 g/L K_2HPO_4 i 100 g/L KH_2PO_4 se dodaje u podlogu na svaki porast OD za 30. U toku fermentacije se dodaje i 0,5 mL/L antipenušavca (Antifoam, Sigma).

4.1.3 Uslovi rasta

Za inokulum se uzima 5 mL preinokulum kulture koja se ubacuje u 0,25 L erlenmajer koja sadrži 100 mL definisane podloge, inkubira se na 37°C, 5 h na 150 rpm. 100 ml inokuluma se zatim ubacuje u bioreaktor koji sadrži 900 mL definisanog

medijuma. Sve fermentacije su rađene u Biostat B bioreктору (Sartorius) opremljen fermentacionim sudom od 2 L. Kraj bač faze u fermentaciji se može odrediti na osnovu smanjenja brzine potrošnje kiseonika i povećanja pH vrednosti.

Kad masa suvih ćelija dostigne vrednost od 15 g/L, dodaje se 0,2 mM IPTG uz podešavanje konstantnog dotoka glukoze od 15 mL/h. pH je održavan na $7,00 \pm 0,05$ dodavanjem 15% rastvora NH_3 ili 0,5 M H_3PO_4 . Temperatura je održavana na 37°C i snižena na 25°C posle indukcije. Vrednost pO_2 je održavana na 50% zasićenja vazduha prilagođavanjem brzine mešanja između 450 i 900 rpm i snabdevanjem vazduhom (obogaćen čistim kiseonikom kada je to neophodno).

4.1.4 Sirovi enzimski preparat

Nakon završene fermentacije fermentaciona tečnost je centrifugirana na 10,000 rpm tokom 20 min na 4°C , i supernatant bez ćelija je korišćen kao sirovi enzimski preparat.

4.1.5 Praćenje toka fermentacije

4.1.5.1 Određivanje mase suvih ćelija

Bakterijski rast je praćen optičkim merenjem gustine na 600 nm (OD600). Za određivanje mase suvih ćelija (DCW), uzorkovani su alikvoti fermentacije koji su centrifugirani. Dobijeni talozi su isprani dva puta dejonizovanom vodom i osušeni na 110°C do konstantne mase.

4.1.5.2 Kvantifikacija glukoze

Tokom fermentacije koncentracija glukoze kao jedinog izvora ugljenika u fermentaciji određivana je u supernatantu uzorkovanih alikvota fermentacije. Glukoza je kvantifikovana dinitrosalicilnom (DNS) metodom (186).

Potrebni rastvori:

1. 3.5-dinitro – salicilatni (DNSA, dinitrosalicilna kiselina) reagens:

A) 0,4 M dinitrosalicilna kiselina u 0,4M NaOH

| | |
|------|-----------|
| NaOH | 8 g |
| DNS | 5 g |
| voda | do 100 mL |

B) Tartaratni rastvor:

| | |
|---------------|-----------|
| K,Na-tartarat | 150 g |
| vode | do 250 mL |

Rastvor B se dodaje u rastvor A i dopuni vodom do 500 mL.

2. Glukoza standard, 10 mM:

| | |
|---------|----------|
| glukoza | 18 mg |
| voda | do 10 mL |

Postupak:

Po 500 μ L rastvora (potrebnog razblaženja) se odmeri u epruvete i doda 500 μ L DNS reagensa i zatim se smeša prokuva 5 minuta u ključalom vodenom kupatilu. Kada se ohladi rastvor se razblaži vodom do 5 mL, promeša i meri se A_{540} . Slepna proba je istog sastava samo što se umesto fermentacione tečnosti koristi voda. Za odmerenu vrednost A_{540} se sa standardne prave očita koncentracija redukujućih šećera (mM), odnosno glukoze, na osnovu koje se izračunava sadržaj glukoze u g/L.

Standardna prava

Od 10 mM rastvora glukoze (rastvor 2) se pripreme razblaženja tako što se u epruvete odmeri po:

| Koncentracija glukoze mM | $V_{\text{rastvor 2}} (\mu\text{L})$ | $V_{\text{vode}} (\mu\text{L})$ |
|--------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| 10 | 500 | 0 |
| 8 | 400 | 100 |
| 6 | 300 | 200 |
| 4 | 200 | 300 |
| 2 | 100 | 400 |
| 1 | 50 | 450 |
| 0,5 | 25 | 475 |
| 0 | 0 | 500 |

4.1.5.3 Amilazna aktivnost

Amilazna aktivnost rekombinantne amilaze tokom fermentacije je određivana u supernatatu uzorkovanih alikvota fermentacije. Korišćen je esej sa rastvornim skrobom kao supstratom i DNS reagensom po proceduri (186).

Potrebni rastvori:

1. 1% skrob

Potrebni materijal:

- 50 mM fosfatni pufer pH 6,5
- Rastvorni skrob

Izmeri se 0,80 g skroba i doda se nekoliko kapi pufera da se napravi pasta. 80 mL pufera se zagreva do ključanja i u jednom potezu se dodaje u napravljenu pastu, do mase 80 g.

U epruvete se u duplikatu odmeri po 50 μ L uzorka i epruvete se postavljaju na stalak u vodenom termostatu, zatim se u tačno određenom trenutku u svaku epruvetu dodaje po 450 μ L 1% skroba, koji je prethodno termostatiran u tom vodenom kupatilu. Inkubiranje se radi na 37°C 15 minuta. Svaki uzorak ima svoju slepu probu (DNS reagens + 1% skrob + uzorak). Nakon 15 minuta reakcija se prekida dodavanjem 500 μ L DNS reagensa. Dodavanje DNS-a se radi istim redosledom i u istim vremenskim intervalima kao i dodavanje supstrata tj. skroba. Epruvete se odmah prebacuju u ključalo vodeno kupatilo. Kuvaju se tačno 5 minuta, a nakon toga hlade ubacivanjem u hladno vodeno kupatilo. Uzorci se razblažuju sa 4 mL vode, dobro se izvorteksuju i očitava se apsorbancija na 540 nm, prema odgovarajućoj slepoj probi.

Standardna prava

Od 10 mM rastvora maltoze se pripreme razblaženja tako što se u epruvete odmeri po:

| Koncentracija maltoze mM | V _{maltoza} (μL) | V _{vode} (μL) |
|--------------------------|---------------------------|------------------------|
| 10 | 500 | 0 |
| 8 | 400 | 100 |
| 6 | 300 | 200 |
| 4 | 200 | 300 |
| 2 | 100 | 400 |
| 1 | 50 | 450 |
| 0,5 | 25 | 475 |
| 0 | 0 | 500 |

Izmerena A₅₄₀ se na osnovu jednačine standardne prave prevodi u koncentraciju maltoze i računa se amilazna aktivnost.

4.1.5.4 Određivanje koncentracije proteina po Bradford-u

Potrebni rastvori:

1. Koncentrovana boja, Coomassie brilliant blue G-250 (CBB G-250)

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

Boja se rastvori u etanolu, pa se dodaju redom kiselina i voda do finalne zapremine.

2. Rastvor BSA(1mg/mL) (eng. bovine serum albumin) za standardnu krivu:

| Koncentracija BSA mg/mL | V _{BSA} (μL) | V _{vode} (μL) |
|-------------------------|-----------------------|------------------------|
| 1 | 500 | 0 |
| 0,8 | 400 | 100 |
| 0,6 | 300 | 200 |
| 0,4 | 200 | 300 |
| 0,2 | 100 | 400 |
| 0,1 | 50 | 450 |
| 0 | 0 | 500 |

3. Bradford-ov reagens.

Potrebni rastvori:

| | |
|------------------|-----------|
| rastvor 1 | 100 mL |
| destilovana voda | do 500 mL |

Postupak:

1. U 50 μ L rastvora (uzorak + pufer) dodaje se 2,5 mL razblaženog rastvora boje.
2. Promeša se na vibracionoj mešalici (vortex-u).
3. Nakon 5 minuta meri se apsorbancija na 595 nm. Uzorcima se meri apsorbancija u toku 30 minuta.

4.2 Prečišćavanje enzima

4.2.1 Delimično prečišćavanje *BliAmy*

Za delimično prečišćavanje *BliAmy*, zapremina od 1600 mL fermentacione tečnosti (4,5 mg proteina/mL, 250,5 U/mL) je koncentrovana 10 puta ultrafiltracijom, korišćenjem membrane sa MWCO 10 kDa. Nakon toga je u retentatu podešeno pH 9 i termički je obrađen 1 sat na 60°C. Retentat je nakon toga centrifugiran 20 minuta na 10000 rpm, 4 ° C. Dobijeni supernatant se u radu koristio kao delimično prečišćen enzim.

4.2.2. Prečišćavanje *BliAmy* jonoizmenjivačkom hromatografijom

Za dobijanje čistog enzima uzeto je 20 mL delimično prečišćenog koncentrovanog enzima (2000 U/mL, 1,2 mg/mL), podešeno je pH 7,5 i urađena je jonoizmenjivačka hromatografija na koloni Q-Sepharose. Kolona je prethodno ekvilibrisana u 10 mM Tris-HCl puferu pH 7,5. Nakon nanošenja uzorka, kolona je isprana sa početnim puferom. Vezani proteini su eluirani gradijentom soli (0-0.5 M NaCl), pH 7.5. Frakcija u kojima je detektovana amilazna aktivnost analizirana je SDS-PAG elektroforezom (10% gel).

4.2.2.1 SDS- PAG elektroforeza

Potrebni rastvori, način pripreme rastvora i tok rada

1. Monomerni rastvor (30% T^{*}, 2,7% C). Oznaka ovog rastvora u tablici je AA.

| | |
|------------------|-------------|
| akrilamid | 58,4 g |
| bisakrilamid | 1,6 g |
| destilovana voda | do 200,0 mL |

2. Pufer za razdvajajući gel, (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8). Oznaka u tablici je Tris pH 8,8.

| | |
|------------------|--------------|
| Tris | 36,30 g |
| destilovana voda | do 200,00 mL |
| 4 M HCl | do pH 8,8 |

3. Pufer za koncentrujući gel, (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8). Oznaka ovog rastvora u tablici je Tris pH 6,8.

| | |
|------------------|-------------|
| Tris | 6,0 g |
| destilovana voda | do 100,0 mL |
| 4 M HCl | do pH 6,8 |

4. Inicijator (amonijum-persulfat) 10% m/V. Oznaka ovog rastvora u tablici je APS.

| | |
|------------------|-----------|
| APS | 0,2 g |
| destilovana voda | do 2,0 mL |

5. Rastvor za nadslojavanje (2-butanol ili n-butanol zasićen vodom).

| | |
|-------------------------|-----------------------------|
| n-butanol ili 2-butanol | 100 mL |
| destilovana voda | do postojanog donjeg sloja. |

Rastvor se pre upotrebe promućka i ostavi da se slojevi razdvoje. Koristi se gornji sloj.

6. Pufer za obradu uzoraka (PUZ)

Rastvori za PUZ (3X):

| | |
|-------------------------|------------|
| 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 | 9,38 mL |
| Natrijum-dodecil-sulfat | 1,5 g |
| 85% glicerol | 9,0 mL |
| β -merkaptoetanol | 3,75 mL |
| 0,1% bromfenol-plavo | 1,5 mL |
| destilovana voda | do 25,0 mL |

Priprema uzoraka:

Uzorci se mešaju sa puferom za uzorke (PUZ) u odnosu 2:1. Rezultujući rastvor se tretira zagrevanjem 3 minuta na ključalom vodenom kupatilu.

7. Pufer za elektroforezu (0,025 M Tris, 0,192 M glicin, pH 8,3),

| | | |
|-------------------------|-------|-------|
| Tris | 0.2 g | |
| glicin | 1 g | |
| Natrijum-dodecil-sulfat | | 0,7 g |
| destilovana voda do | 70 mL | |

8. Rastvor za fiksiranje, bojenje i obezbojavanje (50% (V/V) etanol, 10% (V/V) sirćetna kiselina):

| | |
|-------------------|--------|
| etanol | 500 mL |
| sirćetna kiselina | 100 mL |
| destilovana voda | do 1L |

9. Rastvor boje (0,1% (m/V) CBB , 50% (V/V) etanol, 10% (V/V) sirćetna kiselina).

| | |
|-----------|-------|
| CBB R 250 | 0,5 g |
|-----------|-------|

rastvor 8

do 500,0 mL

10. Rastvor za obezbojavanje (7% (V/V) sirćetna kiselina).

sićetna kiselina 70 mL

destilovana voda do 1 L

Priprema gela i postupak:

| Rastvori () | gel za razdvajanje (10% gel) (mL) | gel za koncentrovanje (4%) (mL) |
|--------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| AA | 3,33 | 0,66 |
| Tris pH 8,8 | 2,5 | - |
| Tris pH 6,8 | - | 1,25 |
| destilovana voda | 4,0 | 3,0 |
| dezaeracija 5– 10 minuta | | |
| temed | 0,004 | 0,005 |
| APS | 0,05 | 0,025 |
| SDS | 0.1 | 0.05 |
| finalna zapremina | 10,0 mL | 5,0 mL |

Dezaerisani rastvor gela za razdvajanje se sipa između ploča. Nakon sipanja rastvora za gel površina se nadsloji rastvorom 5. Kada je polimerizacija donjeg gela završena sipa se dezaerisani rastvor za koncentrujući gel. U rastvor se stavi „češalj“. Kada je polimerizacija gornjeg gela završena, izvadi se češalj, a nastali „bunarčići“ se operu i u njih unesu uzorci. Voltaža je konstantna (80 V) dok uzorci uđu u gel za razdvajanje, a povisava se od 150 do 400 V do kraja rada ili se sve vreme drži konstantna struja od 12 mA kroz koncentrujući gel i 25 mA kroz razdvajajući gel. Nakon završene elektroforeze gel se boji da bi se detektovali proteini.

Detekcija CBB-om R 250

Postupak bojenja:

ispiranje: dest. voda

1 min

fiksiranje: rastvor 8

20 min

bojenje: rastvor 9

20 min

obezbojavanje: rastvor 10

20 min (i preko noći)

Gelovi su skenirani na Canon skeneru pri rezoluciji od 300 dpi.

4.3 Hidroliza sirovog skroba dejstvom *BliAmy*

Sirovi kukuruzni skrob i enzim su inkubirani u 50 mM fosfatnom puferu pH 6,5 na 60 °C različito vreme. Korišćene su različite koncentracije skroba od 16,6 do 34 % suve mase. Količina *BliAmy* je optimizovana korišćenjem 0,2 – 14,2 IU po mg suvog skroba. Svaka reakcija je centrifugirana da bi se odvojio skrob od ostataka rastvornih šećera. Supernatanti sa rastvornim šećerima su dalje hidrolizovani sa glukoamilazom (Dektrozyme® GA, Novozyme) na pH 5,0 na 50°C da bi se svi rastvorni šećeri preveli u glukozu. Glukoza je merena DNS metodom Na ovaj način eliminisane su greške koje nastaju usled toga što redukujući šećeri različite dužine lanaca različito reaguju sa DNS. Stepent hidrolize skroba je izražen kao procenat oslobođene glukoze iz hidrolizovanog skroba u odnosu na početnu masu skroba. Svi eksperimenti su ponovljeni u triplikatu.

Korišćenjem 30% sirovog kukuruznog skroba u 50 mM fosfatnom puferu pH 6,5 na 60°C, efikasnost hidrolize dejstvom *BliAmy* upoređena je sa komercijalnom α -amilazom Termamyl®120 L (Novozymes). Komercijalni enzim Termamyl®120 L sadrži α -amilazu genetski modifikovanog soja *Bacillus licheniformis*. sa aktivnošću od 120 KNU (Kilo-Novo-Unit) jedinica po gramu. Jedna jedinica KNU aktivnosti se definiše kao količina enzima potrebna za hidrolizu 672 mikromolova etilen-G7PNP po minuti pri standardnim uslovima (pH 7,1; 37 °C).

4.4 Analiza hidrolizata tankoslojnom hromatografijom

Tankoslojna hromatografija je rađena na pločama silika gela (Merck, Darmstadt, Nemačka). Uzorci su nanešeni na ploču mikrošpicem od 5 μ L (Hamilton). Smeša standarda i uzorci hidrolizata (po 1 μ L svakog), nanose se na ploču na rastojanju od 10 mm od donje ivice. Kao optimizovana mobilna faza korišćena je smeša n-butanol / etanol / voda / sirćetna kiselina (5:3:2:0.5, v/v/v/v) i za prvo i za drugo razdvajanje. Hromatogram je razvijen u kadici za TLC koja je predhodno bila zasićena parom mobilne faze, oko 30 min. Nakon dvostruke hromatografije, pločica je osušena, a zatim obojena rastvorom α -naftola i zagrevana u sušnici na 110 °C do vizualizacije traka.

4.5 Kvalitativna analiza rezidualnog skroba

4.5.1 Rendgenska difrakcija skroba

Uzorci skroba (100 mg) su isprani tri puta dejonizovanom vodom pa centrifugirani 2 min na 14000 rpm i osušeni na konstantnoj temperaturi (22°C). Skrob je analiziran na difraktometru za prah PHILIPS PW 1710 pod sledećim uslovima: radni napon, $U = 40 \text{ kV}$, jačina struje, $I = 30 \text{ mA}$, rendgensko zračenje sa antikatode bakra, talasna dužina: $\text{CuK}\alpha = 1,54178 \text{ \AA}$, grafitni monohromator. Opseg ispitivanja je bio od $3 - 30^\circ 2\theta$, korak od $0,020^\circ 2\theta$, i vremenska konstanta od 4 s po koraku. Na osnovu dobijenih vrednosti intenziteta I/I_{max} i međuravanskih rastojanja d i upoređivanjem sa literaturnim podacima identifikovane su prisutne kristalne faze.

4.5.2 SEM karakterizacija hidrolizovanih granula skroba

Posle 22 h hidrolize ostaci skroba su isprani tri puta sa dejonizovanom vodom i dva puta apsolutnim etanolom, centrifugirani 2 min na 14000 rpm i osušeni na sobnoj temperaturi (22°C). Osušeni uzorci hidrolizovanog i netretiranog skroba su napareni zlatom. Skenirajući elektronski mikroskop, korišćen za ispitivanje uzoraka je SEM JEOL JSM-6390. Karakterizacija delimično hidrolizovanih granula skroba je određen upotrebom SMile View softvera.

4.6 Prečišćavanje *BliAmy* mešanom hidrofobno-katjonskom hromatografiom

4.6.1 CCD za optimizaciju prečišćavanja amilaze iz fermentacione tečnosti

Urađen je centralni kompozitni dizajn (CCD) sa četiri promenljive:

| | $-\alpha$ | -1 | 0 | +1 | $+\alpha$ |
|----------------------------|-----------|-----|-----|-----|-----------|
| A: pH vezivanja | 4,3 | 4,8 | 5,3 | 5,8 | 6,3 |
| B: NaCl (mM) u vezivanju | 55 | 92 | 128 | 164 | 200 |
| C : pH eluiranja | 4,0 | 5,0 | 6,0 | 7,0 | 8,0 |
| D : NaCl (mM) u eluiranju: | 160 | 270 | 380 | 490 | 600 |

Ukupan broj eksperimentalnih tačaka sa ponovljenem pet puta centralne tačke bio je 29. Analizom grafika odgovornih površina određeni su optimalni uslovi analiziranih promenljivih za najveći prinos u prečišćavanju.

4.6.2 Optimizovano prečišćavanje na NuviaTM cPrimeTM matriksu

U sirovom enzimskom preparatu podešen je pH 5,3 i konduktivitet od $\chi \sim 18,3 \text{ mS cm}^{-1}$. Preparat je dodatno centrifugiran, kako bi se potpuno izbistrio. Kolona napakovana sa matriksom NuviaTM cPrimeTM (1 mL) ekvilibrisana je u 50 mM Na-acetatnom puferu pH 5,3 sa 150 mM NaCl. 20 mL enzimskog ekstrakta koji sadrži ukupno 9200 IU amilaze (66 mg) nanet je na kolonu. Nevezane frakcije su testirane na amilaznu aktivnost. Kolona je isprana sa 20 mL startnog pufera. α -Amilaza je eluirana sa 30 mM Tris HCl pH 8,0 sa 0,5 M NaCl.

4.7 Određivanje potencijalnih SBS racionalnim dizajnom aminokiselinskih ostataka *BliAmy*

4.7.1 Bioinformatička analiza sekvenci

Swiss modeler korišćen je za generisanje homologog modela korišćenjem poznate strukture 2GJP kao templata. Clustal Omega je korišćen za poređenje poznatih sekvencija i pretragu za identifikaciju jedinstvenih razlika u odnosu na poznate RSDA, za koje su sekvencije prikupljene iz CAZY GH13-5. Nakon bioinformatičke analize modela *BliAmy* i detektovanja izloženih amino-kiselinskih ostataka Y114 i Y156 kao moguće važnih u vezivanju lanaca skroba dizajnirani su prajmeri za izmenu specifičnih baznih parova za dobijanje pojedinačnih i dvostrukog mutanta, mutiranjem određenih amino-kiselina u alanin. Takođe je dizajniran prajmer za dobijanje mutanta kojem je isečen domen nepoznate funkcije tzv. DUF1966 na C-terminalu (poslednjih 100 amino-kiselina).

Sekvencije prajmera:

FwY114A: 5'CAACAGCCGTTACAGCTTCGGTCGCATCAGCGCC3'

RevY114A: 5'GGCGCTGATGCGACCGAAGCTGTAACGGCTGTTG3'

FwY156A: 5'GGTTCCGTCAAATGGTACCAAGCCCATTTGAAATCGCTGTATGTG3'

RevY156A: 5'CACATACAGCGATTTCAAATGGGCTTGGTACCATTTTGACGGAACC3'

FwCterm: 5'GAAATAATCATGCTGTGCTCAGTACGCATATTGTTTTCTCG3'

RevCterm: 5'CGAGAAAACAATATGCGTACTGAGCACAGCATGATTATTC3'

Mutacije su generisane QuikChange metodom (187) Plazmidna DNA korišćena je kao templat (pDA-*BliAmy*), a mutacije su kreirane Phusion DNA polimerazom (Thermo Fisher Scientific) prema uputstvu proizvođača. PCR produkt je tretiran DpnI endonukleazom za digestovanje originalnog DNA templata. PCR produkt je transformisan u soj *E. coli* TOP10, amplifikovan i prečišćen a DNA sekvencije mutanata su potvrđene sekvenciranjem DNA. Plazmidi su zatim transformisani elektroporacijom u *E. coli* C43(DE3), a mutanti su zatim provedeni kao što je opisano u 4.1 i prečišćeni opisano u odeljku 4.7.2.

4.7.1.1 Adsorpcija *BliAmy* na skrobne granule

Enzim (8 nM) i kukuruzni sirovi skrob (10 koncentracija od 0,5-100 mg / mL) inkubirani su u 20 mM fosfatnom puferu (pH 6,5) u prisutstvu 0,005 % (v/v) BSA na 4°C tokom 30 minuta uz konstantno mešanje. Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani na 16 000 g i 4°C, 15 minuta. Supernatanti su prebačeni u ependorfe na ledu i analizirani na aktivnost prema rastvornom skrobu.

4.7.1.2 Katalitički koeficijenti *BliAmy* prema rastvornom skrobu

Početna brzina reakcije V_o je određena dodatkom iste količine proteina (8 nM) na 11 različitih koncentracija rastvornog skroba (0,5-50 mg/mL) u 20 mM fosfatnom puferu (pH 6,5) na 60°C.

4.7.1.3 Katalitički koeficijenti *BliAmy* prema sirovom skrobu

Hidroliza sirovog kukuruznog skroba je urađena dodatkom različitih količina enzima (9-535 nM) u 10 različitih koncentracija skroba (1-300 mg/mL) u 20 mM fosfatnom puferu (pH 6,5), inkubacijom od 25 minuta pri 800 rpm na 60°C. Oslobođeni rastvorni redukujući šećeri su kvantifikovani u supernatantu nakon centrifugiranja na 16 000g, 4 °C, 15 minuta.

4.7.1.4 Relativna adsorpcija i hidroliza sirovog kukuruznog skroba

Relativna hidroliza sirovog kukuruznog skroba i adsorpcijaza *BliAmy* ΔC je određena dodatkom istog broja enzimskih jedinica delimično prečišćenog *BliAmy* dC i *BliAmy* wild-type. Reakcija je rađena u 20 mM fosfatnom puferu (pH 6,5), inkubacijom od 16 sati pri 800 rpm na 60°C.

Za relativna hidroliza sirovog kukuruznog skroba mereni su oslobođeni rastvorni redukujući šećeri koji su kvantifikovani u supernatantu nakon centrifugiranja na 16 000g, 4

°C, 15 minuta. Poređenjem sa BliAmy WT (dodeljena relativna vrednost od 100%) određen je relativni procenat hidrolize skroba za BliAmy dC.

Za relativnu adsorpciju na skrobne granule, određena je enzimaska aktivnost koja zaostaje u supernatantu nakon hidrolize od 16h. Poređenjem sa BliAmy WT (dodeljena relativna vrednost od 100%) određen je relativni adsorpcija za BliAmy dC.

4.7.2 Kristalizacija, prikupljanje podataka i određivanje strukture *BliAmy*

Inicijalna pretraga uslova za kristalizaciju *BliAmy* urađena je metodom stajaće kapi koršćenjem robota „Komarac“ (Mosquito, TTP Labtech) u formatu mikrotitar pločice (Molecular Dimensions) koristeći koncentraciju *BliAmy* 7,5 mg/mL. Rastvori koji su korišćeni za pretragu su PACT, Wizard i JCGS (Molecular Dimensions), Index i Greed Screen Salt (Hampton). Bipiramidalni kristali pojavili su se nakon nedelju dana inkubacije na 294 K u rastvoru malonata pH 5 do 6. Uslovi za kristalizaciju su optimizovani u stajaćoj kapi sa 42-46% Taksimata (Hampton) koji je sadržao 1,36 M malonsku kiselinu, 0,25 M amonijum-citrat trobazni, 0,12 M ćilibarnu kiselinu, 0,3 M DL-jabućnu kiselinu, 0,4 M natrijum-acetat, 0,5 M natrijum-formijat i 0,16 M amonijum-tartarat dvobazni na pH 6,0 i 10 mM kalcijum-hlorid kao precipitant kao i kapi sa 0,1 µL rastvora proteina i 0,1 µL rastvora rezervoara. Kristali dobijeni iz malonata i taksimata bez CaCl₂ nisu imali dobru morfologiju i nisu difraktovali.

Pre sakupljanja podataka kristali su kratko potopljeni u rastvor krioprotektanta sastavljenog iz 60% taksimata i 10 mM CaCl₂. Kompleksi sa ligandima dobijeni su potapanjem kristala u 25 mM akarbozu i 100 mM maltozu (Aca-Mal) 20 minuta; 100 mM maltozu (Mal), 100 mM maltoheksaozu (G6) i 20 mM β-ciklodekstrin (β-CD) sa dodatkom krioprotektanta nekoliko minuta. Podaci dobijeni difrakcijom X-zracima sakupljeni su MarDTB Goniostat sistemom korišćenjem Cu-Kα radijacije iz generatora Bruker MicrostarH

sa rotirajućom anodom i opremljenog sa HeliosMX ogledalima. Dobijeni intenziteti obrađeni su programom iMosflm.

Kristali *BliAmy* spadaju u tetragonalnu prostornu grupu $P4_32_1$ sa jednim monomerom od 55 kDa u asimetričnoj jedinici. V_M je $3.0 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ sa sadržajem rastvarača od 59%. Struktura *BliAmy* određena je metodom molekulske izmene korišćenjem programa Phaser sa model koordinatama α -amylase iz *B. licheniformis m* (167) (PDB code:1BLI) kao modelom za pretragu.

Model je rafinisan programom REFMAC5 a program Coot je upotrebljen za manualno remodelovanje i inspekciju mape. Kontinualne gustine u $2mFo-DFc$ i $mFo - DFc$ mapama dva molekula akarboze po jednom molekulu proteina uočene su u Aca-Mal kristalima od kojih je jedna vezana za aktivno mesto, a druga na udaljenom mestu. U tom drugom supstrat-vezujućem mestu elektronska gustina je vidljiva za 4 od 6 ostataka šećera iz G6 eksperimenta; maltozu iz Mal eksperimenta i β -ciklodekstrin iz β -CD eksperimenta. Kvalitet modela analiziran je programima PDB_REDO i MolProbity. Koordinate atoma i faktori amplituda eksperimentalnih struktura deponovane su u bazi podataka Protein Data Bank (PDB).

4.7.2.1. Racionalni dizajn za dobijanje mutanata *BliAmy* nakon kristalizacije

Nakon određivanja SBS kod *BliAmy* kristalografskim studijama i određivanjem amino-kiselinskih ostaka kritičnih u vezivanju sustrata dizajnirani su prajmeri programom Clone Manager 9 za izmenu specifičnih baznih parova za dobijanje pojedinačnih i dvostrukog mutanta, mutiranjem amino-kiselina F257 i Y358 u alanin.

Sekvencije prajmera:

F257A Fw GCCAATATTCAGCTACCGTAGCCATTTCCCTCCCTGTTTTTTCC

F257A Rev GGAAAAACAGGGAAGGAAATGGCTACGGTAGCTGAATATTGGC

Y358A Fw CCGTAGAAAATCTGCGGGGCGCCTGCTTCTCTTGTC

Y358A Rev TTGACAAGAGAAGCAGGCGCCCCGCAGATTTTCTACGG

Mutacije su generisane ko što je opisano u 4.8, a mutanti su zatim produkovani 4.1 i prečišćeni 4.7.2.

4.8 Dobijanje bioetanol

4.8.1 Optimizacija procesa simultane hidrolize i saharifikacije skroba Bok-Behnken-ovim dizajnom

Da bi se postigao visok procenat hidrolize, kao i visoka koncentracija fermentabilnih šećera, sadržaj skroba i temperatura inkubacije su podešeni na 30 % (w/v) i 60 °C, redom. Bok-Behnken dizajn (BBD) je korišćen za identifikaciju optimalnih uslova za hidrolizu i saharifikaciju sirovog kukuruznog skroba. Pet nezavisnih promenljivi je analizirano na tri nivoa (-1, 0, 1) sa 40 faktorijalnih tačaka i 3 ponovljene tačke (Tabela 13).

4.8.2 Alkoholna fermentacija

4.8.2.1 Alkoholna fermentacija komercijalne dekstroze

Za određivanje optimalnih uslova u alkoholnoj fermentaciji postavljena je fermentacija na većoj skali (500mL) u fermentoru. Korišćeno je 150 g komercijalne dekstroze za fermentaciju. Komercijalni soj *Saccharomices cerevisiae* (Alltech-Fermin, Srbija), u obliku sveže pakovanog kvasca u kockama (70% v/v vlage) korišćen je za proizvodnju alkohola. Količina od 30 g kvasca je suspendovana u 100 ml 0,9% rastvora NaCl. Fermentacija je urađena pod anaerobnim uslovima na 30°C, u bioreaktoru BIOSTAT B (Sartorius) u sudu od 2 L u kojem se nalazilo 500 ml 30% rastvora dekstroze u acetatnom puferu pH 4,5. Optimizovani su uslovi trajanja fermentacije, dodatka suplementa u obliku ekstrakta kvasca i brzina mešanja. Koncentracija etanola je određena 1H NMR spektroskopskom kvantitativnom analizom u D₂O, uz upotrebu etanola kao standarda (188).

4.8.2.2 Alkoholna fermentacija hidrolizata iz sirovog kukuruznog skroba

Postavljena je hidroliza skroba na većoj skali (500mL) u fermentoru. Korišćeno je 150 g skroba za hidrolizu. Optimalni uslovi simultane hidrolize i saharifikacije sirovog kukuruznog skroba dobijeni RSM-om su temperatura od 60°C, pH 4,5, 1 IU *BliAmy*/mg skroba i dodavanje 0,5% GA odmah na početku procesa. Da bi se sistem ravnomerno mešao

podešeno je 450 rpm. Proces simultane hidrolize je trajao 18 sati nakon čega je dodat kvasac, komercijalni soj *Saccharomyces cerevisiae* (Alltech-Fermin, Srbija). Količina od 30 g kvasaca je suspendovana u 100 ml 0,9% rastvora NaCl pre dodatka. Fermentacija je urađena pod anaerobnim uslovima bioreaktoru BIOSTAT B u sudu od 2 L u kojem se nalazilo 500 mL hidrolizata skroba i 5% ekstrakta kvasca na 30 °C, pH 4,5 i 180 rpm u trajnju od 22 sata. Koncentracija etanola je određena ¹H NMR spektroskopskom kvantitativnom analizom u D₂O, uz upotrebu etanola kao standarda. Prinos etanola iz glukoze je izračunat u skladu sa stehiometrijskim odnosom (jednačina 12).

5. Literatura

1. Robertson GH, Wong DWS, Lee CC, Wagschal K, Smith MR, Orts WJ. Native or raw starch digestion: A key step in energy efficient biorefining of grain. *J Agric Food Chem.* 2006;54(2):353-65.
2. Uthumporn U, Zaidul ISM, Karim AA. Hydrolysis of granular starch at sub-gelatinization temperature using a mixture of amylolytic enzymes. *Food Bioprod Process.* 2010;88(1):47-54.
3. Cinelli BA, Castilho LR, Freire DMG, Castro AM. A brief review on the emerging technology of ethanol production by cold hydrolysis of raw starch. *Fuel.* 2015;150:721-9.
4. Sun H, Zhao P, Ge X, Xia Y, Hao Z, Liu J. Recent advances in microbial raw starch degrading enzymes. *Appl Biochem Biotechnol.* 2010;160(4):988-1003.
5. Uthumporn U, Zaidul ISM, Karim AA. Hydrolysis of granular starch at sub-gelatinization temperature using a mixture of amylolytic enzymes. *Food Bioprod Process.* 2010;88(1):47-54.
6. Sun H, Ge X, Wang L, Zhao P, Peng M. Microbial production of raw starch digesting enzymes. *African J Biotechnol.* 2009;8(9):1734-1739.
7. Božić N, Lončar N, Šokarda Slavić M, Vujčić Z. Raw starch degrading α -amylases: an unsolved riddle. *Amylase.* 2017;1:12.
8. Moller MS, Henriksen A, Svensson B. Structure and function of α -glucan debranching enzymes. *Curr Opin Struct Biol.* 2016;40:33-42.
9. Cockburn D, Wilkens C, Ruzanski C, Andersen S, Willum Nielsen J, Smith AM. Analysis of surface binding sites (SBSs) in carbohydrate active enzymes with focus on glycoside hydrolase families 13 and 77 — a mini-review. *Biologia (Bratisl).* 2014;69(6):705-12.
10. Himmel ME, Ding S-Y, Johnson DK, Adney WS, Nimlos MR, Brady JW. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science.* 2007;315(5813):804-7.

11. Davies GJ, Williams SJ. Carbohydrate-active enzymes: sequences, shapes, contortions and cells. *Biochem Soc Trans.* 2016;44(1):79–87.
12. Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Database issue):D490-5.
13. Klaus Buchholz, Volker Kasche UTB. Biocatalysts and enzyme technology. In: John Wiley & Sons. 2012. p. 626.
14. Karaki N, Aljawish A, Humeau C, Muniglia L, Jasniewski J. Enzymatic modification of polysaccharides: Mechanisms, Properties, And potential applications: A review. *Enzyme and Microbial Technology.* 2016;90:1–18.
15. Vamadevan V, Bertoft E. Structure-function relationships of starch components. *Starch.* 2015;67:55–68.
16. Haki GD, Rakshit SK. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour Technol.* 2003;89(1):17-34.
17. Shannon Jc, Garwood DI. Chapter III – Genetics And Physiology Of Starch Development. In: *Starch: Chemistry and Technology.* 1984. p. 25–86.
18. Puspasari F, Nurachman Z, Noer AS, Radjasa OK, Van Der Maarel MJEC, Natalia D. Characteristics of raw starch degrading α -amylase from *Bacillus aquimaris* MKSC 6.2 associated with soft coral *Sinularia* sp. *Starch/Staerke.* 2011;
19. Goldstein, J., Newbury, D.E., Joy, D.C., Lyman, C.E., Echlin, P., Lifshin, E., Sawyer, L., Michael, J.R.. *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis.* Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis. 3rd ed., Springer, Berlin, 2003.
20. Fitt Le, Snyder Em. Chapter XXIII – Photomicrographs Of Starches. In: *Starch: Chemistry and Technology.* 1984. p. 675–89.
21. Larsson K. Structure of the starch granule--a curved crystal. *Acta Chem Scand.* Denmark; 1991;45(8):840–3.
22. Parker R, Ring SG. Aspects of the Physical Chemistry of Starch. *J Cereal Sci.* 2001;34(1):1–17.

23. Kong L, Lee CM, Kim SH, Ziegler GR. Characterization of starch polymorphic structures using vibrational sum frequency generation (SFG) spectroscopy. *J Phys Chem B*. 2014;118(7):1775–1783.
24. Dunn G. A model for starch breakdown in higher plants. *Phytochemistry*. 1974;13(8):1341–6.
25. Hizukuri S. Relationship between the distribution of the chain-length of amylopectin and the crystalline-structure of starch granules. *Carbohydr Res*. 1985;141:295-206.
26. Srichuwong S, Sunarti TC, Mishima T, Isono N, Hisamatsu M. Starches from different botanical sources I: Contribution of amylopectin fine structure to thermal properties and enzyme digestibility. *Carbohydr Polym*. 2005 60(4):529–38.
27. Le Corre D, Bras J, Dufresne A. Starch nanoparticles: A review. *Biomacromolecules*. 2010;11(5):1139–1153.
28. Nigam P, Singh D. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme Microb Technol* 1995;17(9):770–8.
29. Wang L Sen, Ge XY, Zhang WG. Improvement of ethanol yield from raw corn flour by *Rhizopus* sp. *World J Microbiol Biotechnol*. 2007;23(4):461–5.
30. Colonna P, Leloup V, Buléon A. Limiting factors of starch hydrolysis. *Eur J Clin Nutr*. 1992;46(Suppl 2):S17-32.
31. Zhang B, Dhital S, Gidley MJ. Synergistic and Antagonistic Effects of α -Amylase and Amyloglucosidase on Starch Digestion. *Biomacromolecules*. 2013;14(6):1945-54.
32. Jamme F, Bourquin D, Tawil G, Viksø-Nielsen A, Buléon A, Réfrégiers M. 3D imaging of enzymes working in situ. *Anal Chem*. 2014;86(11):5265-70;
33. Lei Y, Peng H, Wang Y, Liu Y, Han F, Xiao Y. Preferential and rapid degradation of raw rice starch by an alpha-amylase of glycoside hydrolase subfamily GH13_37. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;94(6):1577–1584.
34. Tawil G, Vikso-Nielsen A, Rolland-Sabate A, Colonna P, Buleon A. Hydrolysis of concentrated raw starch: A new very efficient α -amylase from *Anoxybacillus flavothermus*. *Carbohydr Polym*. 2012;87:46-52.

35. Oates CG. Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis. *Trends in Food Sci Technol.* 1997;8(11):375-382.
36. Tawil G, Vikso-Nielsen A, Rolland-Sabate A, Colonna P, Buleon A. In depth study of a new highly efficient raw starch hydrolyzing α -amylase from *Rhizomucor* sp. *Biomacromolecules.* 2011; 12 (1):34–42.
37. Moller MS, Svensson B. Structural biology of starch-degrading enzymes and their regulation. *Curr Opin Struc Biol.* 2016;40:33–42
38. Van der Maarel MJEC, Van der Veen B, Uitdehaag JCM, Leemhuis H, Dijkhuizen L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. *J Biotechnol.* 2002;94:137–55.
39. Pandey A, Nigam P, Soccol CR, Soccol VT, Singh D, Mohan R. Advances in microbial amylases. *Biotechnol Appl Biochem.* 2000;31(Pt 2):135-52.
40. Israilides C, Smith A, Scanlon B, Barnett C. Pullulan from Agro-industrial Wastes. *Biotechnol Genet Eng Rev. Taylor & Francis.* 1999;16(1):309–24.
41. Bender H, Lehmann J, Wallenfels K. Pullulan, ein extracelluläres Glucan von *Pullularia pullulans*. *Biochim Biophys Acta.* 1959;36(2):309–16.
42. Henrissat B, Vegetales M, Grenoble F. A classification of glycosyl hydrolases based sequence similarities amino acid. *Biochem J.* 1991;280(Pt 2):309-16.
43. Lo Leggio L, Simmons TJ, Poulsen J-CN, Frandsen KEH, Hemsworth GR, Stringer MA. Structure and boosting activity of a starch-degrading lytic polysaccharide monooxygenase. *Nat Commun.* 2015;6:5961.
44. Koropatkin NM, Cameron E A., Martens EC. How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10(5):323-35.
45. Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami VK, Chauhan B. Microbial α -amylases: A biotechnological perspective. *Process Biochemistry.* 2003;38:1599–616.
46. Mehta D, Satyanarayana T. Bacterial and archaeal α -amylases: Diversity and amelioration of the desirable characteristics for industrial applications. *Front Microbiol.* 2016;7:1129.

47. Janeček Š, Svensson B, MacGregor EA. α -Amylase: An enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(7):1149-70.
48. Stam MR, Danchin EGJ, Rancurel C, Coutinho PM, Henrissat B. Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: Towards improved functional annotations of α -amylase-related proteins. *Protein Eng Des Sel.* 2006; 19(12):555-62.
49. Moller MS, Svensson B. Structural biology of starch-degrading enzymes and their regulation. *Curr Opin Struc Biol.* 2016;40:33–42.
50. Wolfenden R, Lu X, Young G. Spontaneous Hydrolysis of Glycosides. *J Am Chem Soc.* 1998;120(27):6814–5.
51. Uitdehaag JCM, Mosi R, Kalk KH, van der Veen BA, Dijkhuizen L, Withers SG. X-ray structures along the reaction pathway of cyclodextrin glycosyltransferase elucidate catalysis in the α -amylase family. *Nat Struct Mol Biol.* 1999;6(5):432–6.
52. Nakamura a, Haga K, Yamane K. Three histidine residues in the active center of cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic *Bacillus* sp. 1011: effects of the replacement on pH dependence and transition-state stabilization. *Biochemistry.* 1993;32:6624–31.
53. Lawson CL, van Montfort R, Strokopytov B, Rozeboom HJ, Kalk KH, de Vries GE. Nucleotide sequence and X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 in a maltose-dependent crystal form. *J Mol Biol.* 1994;236(2):590-600.
54. Strokopytov B, Knegt RM, Penninga D, Rozeboom HJ, Kalk KH, Dijkhuizen L. Structure of cyclodextrin glycosyltransferase complexed with a maltononaose inhibitor at 2.6 angstrom resolution. Implications for product specificity. *Biochemistry.* 1996;35(13):4241–9.
55. Vallee BL, Stein EA, Sumerwell WN, Fischer EH. Metal content of alpha-amylases of various origins. *J Biol Chem.* 1959;234:2901-5.
56. Kandra L. α -Amylases of medical and industrial importance. *J Mol Struct (Theochem).* 2003;666-667:487–98.

57. Machius M, Wiegand G, Huber R. Crystal structure of calcium-depleted *Bacillus licheniformis* alpha-amylase at 2.2 Å resolution. *J Mol Biol.* 1995;246(4):545–59.
58. Agarwal RP, Henkin RI. Metal binding characteristics of human salivary and porcine pancreatic amylase. *J Biol Chem.* 1987;262(6):2568–75.
59. Buisson G, Duée E, Haser R, Payan F. Three dimensional structure of porcine pancreatic alpha-amylase at 2.9 Å resolution. Role of calcium in structure and activity. *The EMBO Journal.* 1987;6:3909–16.
60. Holm L, Koivula AK, Lehtovaara PM, Hemminki A, Knowles JKC. Random mutagenesis used to probe the structure and function of *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylase. *Protein Eng Des Sel.* 1990;3(3):181–91.
61. Vihinen M, Peltonen T, Iitiä A, Suominen I, Mäntsälä P. C-terminal truncations of a thermostable *Bacillus stearothermophilus* α -amylase. *Protein Eng.* 1994;7(10):1255–9.
62. Dauter Z, Dauter M, Brzozowski AM, Christensen S, Borchert T V., Beier L. X-ray structure of Novamyl, the five-domain “maltogenic” α -amylase from *Bacillus stearothermophilus*: Maltose and acarbose complexes at 1.7 Å resolution. *Biochemistry.* 1999;38(26):8385–92.
63. Majzlová K, Janeček Š. Two structurally related starch-binding domain families CBM25 and CBM26. *Biologia.* 2014;69(9): 1087–1096.
64. Southall SM, Simpson PJ, Gilbert HJ, Williamson G, Williamson MP. The starch-binding domain from glucoamylase disrupts the structure of starch. *FEBS Lett.* 1999; 447(1):58-60.
65. Christiansen C, Abou Hachem M, Janecek S, Viksø-Nielsen A, Blennow A, Svensson B. The carbohydrate-binding module family 20--diversity, structure, and function. *FEBS J.* 2009; 276(18):5006-29.
66. Cuyvers S, Dornez E, Delcour JA, Courtin CM. Occurrence and functional significance of secondary carbohydrate binding sites in glycoside hydrolases. *Crit Rev Biotechnol.* 2012; 32(2):93-107.

67. Cockburn D, Svensson B. Structure and Functional Roles of Surface Binding Sites in Amylolytic Enzymes. *Understanding Enzymes*. 2016; 267–96.
68. Textor SD, Hill GA, Macdonald DG, Denis E St. Cold enzyme hydrolysis of wheat starch granules. *Can J Chem Eng*. 1998;76(1):87–93.
69. Janeček Š, Ševčík J. The evolution of starch-binding domain. *FEBS Lett*. 1999; 456(1):119-25.
70. Schwimmer S. The role of maltase in the enzymolysis of raw starch. *J Biol Chem*. United States; 1945;161:219–34.
71. Viksø-Nielsen A, Andersen C, Hoff T, Pedersen S. Development of new alpha-amylases for raw starch hydrolysis. *Biocatal Biotransformation*. 2006;24(1-2):121-127.
72. Iefuji H, Chino M, Kato M, Iimura Y. Raw-starch-digesting and thermostable alpha-amylase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, characterization, cloning and sequencing. *Biochem J*. England; 1996;318 (3):989–96.
73. Hamilton LM, Kelly CT, Fogarty WM. Production and properties of the raw starch-digesting α -amylase of *Bacillus* sp. IMD 435. *Process Biochem*. 1999;35(1):27–31.
74. Hamilton LM, Kelly CT, Fogarty WM. Raw starch degradation by the non-raw starch-adsorbing bacterial alpha amylase of *Bacillus* sp. IMD 434. *Carbohydr Res*. 1998;314(3-4):251-257.
75. Hayashida S, Teramoto Y, Inoue T, Mitsuiki S. Occurrence of an affinity site apart from the active site on the raw-starch-digesting but non-raw-starch-adsorbable *Bacillus subtilis* 65 α -amylase. *Appl Environ Microbiol*. 1990;56(8):2584-2586.
76. Goyal N, Gupta JK, Soni SK. A novel raw starch digesting thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. *Enzyme Microb Technol*. 2005;37(7):723-734.
77. Qian M, Haser R, Payan F. Carbohydrate binding sites in a pancreatic alpha-amylase-substrate complex, derived from X-ray structure analysis at 2.1 Å resolution. *Protein Sci*. 1995; 4(4):747-55.
78. Gibson RM, Svensson B. Identification of tryptophanyl residues involved in binding of carbohydrate ligands to barley α -amylase 2. *Carlsberg Res Commun*. 1987;52(6):373–9.

79. Mok SC, Teh AH, Saito JA, Najimudin N, Alam M. Crystal structure of a compact alpha-amylase from *Geobacillus thermoleovorans*. *Enzym Microb Technol*. 2013;53(1):46-54.
80. Mesbah NM, Wiegel J. Halophilic alkali- and thermostable amylase from a novel polyextremophilic *Amphibacillus* sp. NM-Ra2. *Int J Biol Macromol*. 2014; 70:222-9.
81. Mehta D, Satyanarayana T. Biochemical and molecular characterization of recombinant acidic and thermostable raw-starch hydrolysing α -amylase from an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans*. *J Mol Catal B Enzym*. 2013; 85–86: 229-238.
82. Hamilton LM, Kelly CT, Fogarty WM. Raw starch degradation by the non-raw starch-adsorbing bacterial alpha amylase of *Bacillus* sp. IMD 434. *Carbohydr Res*. 1998;314(3–4):251–7.
83. Liu XD, Xu Y. A novel raw starch digesting alpha-amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: purification and characterization. *Bioresour Technol*. 2008; 99(10):4315-20.
84. Soni SK, Goyal N, Gupta JK, Soni R. Enhanced production of alpha-amylase from *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* in solid state fermentation by response surface methodology and its evaluation in the hydrolysis of raw potato starch. *Starch/Staerke*. 2012;64(1):64–77.
85. Roy JK, Manhar AK, Nath D, Mandal M, Mukherjee AK. Cloning and extracellular expression of a raw starch digesting α -amylase (Blamy-I) and its application in bioethanol production from a non-conventional source of starch. *J Basic Microbiol*. 2015;55(11):1287-98.
86. Parashar D, Satyanarayana T. A chimeric α -amylase engineered from *Bacillus acidicola* and *Geobacillus thermoleovorans* with improved thermostability and catalytic efficiency. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2016;43(4):473–84.

87. Puspasari F, Radjasa OK, Noer AS, Nurachman Z, Syah YM, van der Maarel M. Raw starch-degrading α -amylase from *Bacillus aquimaris* MKSC 6.2: Isolation and expression of the gene, bioinformatics and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *J Appl Microbiol.* 2013; 114(1):108-20.
88. Kalpana BJ, Pandian SK. Halotolerant, acid-alkali stable, chelator resistant and raw starch digesting α -amylase from a marine bacterium *Bacillus subtilis* S8-18. *J Basic Microbiol.* 2014; 54(8):802-11.
89. Šokarda Slavić M, Pešić M, Vujčić Z, Božić N. Overcoming hydrolysis of raw corn starch under industrial conditions with *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a α -amylase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016; 100(6):2709-19.
90. Mehta D, Satyanarayana T. Domain C of thermostable α -amylase of *Geobacillus thermoleovorans* mediates raw starch adsorption. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014; 98(10):4503-19,
91. Finore I, Kasavi C, Poli A, Romano I, Oner ET, Kirdar B. Purification, biochemical characterization and gene sequencing of a thermostable raw starch digesting α -amylase from *Geobacillus thermoleovorans* subsp. *stromboliensis* subsp. nov. *World J Microbiol Biotechnol.* 2011;27(10):2425-2433.
92. Hostinová E, Janecek S, Gasperík J. Gene sequence, bioinformatics and enzymatic characterization of α -amylase from *Saccharomycopsis fibuligera* KZ. *Protein J.* 2010; 29(5):355-64.
93. Bai Y, Huang H, Meng K, Shi P, Yang P, Luo H. Identification of an acidic α -amylase from *Alicyclobacillus* sp. A4 and assessment of its application in the starch industry. *Food Chem.* 2012; 131(4):1473-1478.
94. Afrisham S, Badoei-Dalfard A, Namaki-Shoushtari A, Karami Z. Characterization of a thermostable, CaCl_2 -activated and raw-starch hydrolyzing alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* AT70: Production under solid state fermentation by utilizing agricultural wastes. *J Mol Catal B Enzym.* 2016;132: 98-106.

95. Maktouf S, Kamoun A, Moulis C, Remaud-Simeon M, Ghribi D, Châabouni SE. A new raw-starch-digesting α -amylase: Production under solid-state fermentation on crude millet and biochemical characterization. *J Microbiol Biotechnol.* 2013; 23(4):489-98.
96. Božić N, Slavić MŠ, Gavrilović A, Vujčić Z. Production of raw-starch-digesting α -amylase isoform from *Bacillus* sp. under solid-state fermentation and biochemical characterization. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2014;53(2), 203-209.
97. Jiang T, Cai M, Huang M, He H, Lu J, Zhou Xl. Characterization of a thermostable raw-starch hydrolyzing α -amylase from deep-sea thermophile *Geobacillus* sp. *Protein Expr Purif.* 2015; 114:15-22.
98. Božić N, Ruiz J, López-Santín J, Vujčić Z. Production and properties of the highly efficient raw starch digesting α -amylase from a *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a. *Biochem Eng J.* 2011;53(2): 203-209.
99. Božić N, Puertas JM, Lončar N, Duran CS, López-Santín J, Vujčić Z. The DsbA signal peptide-mediated secretion of a highly efficient raw-starch-digesting, recombinant α -amylase from *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a. *Process Biochem.* 2013;48(3): 438-442.
100. Sarian FD, Van Der Kaaij RM, Kralj S, Wijbenga DJ, Binnema DJ, Van Der Maarel MJECl. Enzymatic degradation of granular potato starch by *Microbacterium aurum* strain B8.A. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012; 93(2):645-54.
101. Guillen D, Moreno-Mendieta S, Aguilera P, Sanchez S, Farres A, Rodriguez-Sanoja R. The starch-binding domain as a tool for recombinant protein purification. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013;97(9):4141–8.
102. Lin SC, Lin IP, Chou WI, Hsieh CA, Liu SH, Huang RY. CBM21 starch-binding domain: A new purification tag for recombinant protein engineering. *Protein Expr Purif.* 2009;65(2):261–6.

103. Woo J, Parimal S, Brown MR, Heden R, Cramer SM. The effect of geometrical presentation of multimodal cation-exchange ligands on selective recognition of hydrophobic regions on protein surfaces. *J Chromatogr A*. 2015;1412:33–42.
104. Woo JA, Chen H, Snyder MA, Chai Y, Frost RG, Cramer SM. Defining the property space for chromatographic ligands from a homologous series of mixed-mode ligands. *J Chromatogr A*. 2015;1407:58–68.
105. Yang H, Liu L, Xu F. The promises and challenges of fusion constructs in protein biochemistry and enzymology. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(19):8273–81.
106. Dey TB, Kumar A, Banerjee R, Chandna P, Kuhad RC. Improvement of microbial α -amylase stability: Strategic approaches. *Process Biochem*. 2016;51(10):1380-1390.
107. Nwagu TN, Aoyagi H, Okolo BN, Yoshida S. Immobilization of a saccharifying raw starch hydrolyzing enzyme on functionalized and non-functionalized sepa beads. *J Mol Catal B Enzym*. 2012;78:1-8.
108. Nwagu TN, Okolo B, Aoyagi H, Yoshida S. Improved yield and stability of amylase by multipoint covalent binding on polyglutaraldehyde activated chitosan beads: Activation of denatured enzyme molecules by calcium ions. *Process Biochem*. 2013;48(7):1031-1038
109. Ismaya WT, Hasan K, Kardi I, Zainuri A, Rahmawaty RI, Permanahadi S. Chemical Modification of *Saccharomycopsis fibuligera* R64 α -Amylase to Improve its Stability Against Thermal, Chelator, and Proteolytic Inactivation. *Appl Biochem Biotechnol*. 2013;170(1):44–57.
110. Zhang X, Caner S, Kwan E, Li C, Brayer GD, Withers SG. Evaluation of the Significance of Starch Surface Binding Sites on Human Pancreatic α -Amylase. *Biochem*. 2016;55(43):6000–9.
111. Nielsen MM, Bozonnet S, Seo EN, M \acute{o} ty \acute{a} n JA, Andersen JM, Dilokpimol A. Two secondary carbohydrate binding sites on the surface of barley α -amylase 1 have distinct functions and display synergy in hydrolysis of starch granules. *Biochem*. 2009; 48 (32):7686–7697

112. Valk V, Eeuwema W, Sarian FD, van der Kaaij RM, Dijkhuizen L. Degradation of granular starch by the bacterium *Microbacterium aurum* strain B8.A involves a modular α -amylase enzyme system with FNIII and CBM25 domains. *Appl Environ Microbiol.* 2015; 81(19):6610-20
113. Montgomery DC. *Design and Analysis of Experiments.* John Wiley & Sons; 2008.
114. Weuster-Botz D. Experimental design for fermentation media development: statistical design or global random search. *J Biosci Bioeng.* 2000;90(5):473–83.
115. Zhang G, Block DE. Using highly efficient nonlinear experimental design methods for optimization of *Lactococcus lactis* fermentation in chemically defined media. *Biotechnol Prog.* 2009;25(6):1587–97.
116. Kammoun R, Naili B, Bejar S. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for α -amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). *Bioresour Technol.* 2008;99(13):5602–9.
117. Prakasham RS, Subba Rao C, Sreenivas Rao R, Sarma PN. Enhancement of acid amylase production by an isolated *Aspergillus awamori*. *J Appl Microbiol.* 2007;102(1):204–11.
118. Gangadharan D, Sivaramakrishnan S, Nampoothiri KM, Sukumaran RK, Pandey A. Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Bioresour Technol.* 2008;99:4597–602.
119. Kunamneni A, Singh S. Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of maize starch for higher glucose production. *Biochem Eng J.* 2005;27(2):179–90.
120. Ferreira S, Duarte AP, Ribeiro MHL, Queiroz JA, Domingues FC. Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of *Cistus ladanifer* and *Cytisus striatus* for bioethanol production. *Biochem Eng J.* 2009;45(3):192–200.
121. Kuhfeld W. Experimental design, efficiency, coding, and choice designs. *Mark Res methods sas Exp Des choice, conjoint, Graph Tech.* 2005;47–97.

122. Barclay WD. Factorial Design in a Pricing Experiment. *Journal of Marketing Research (JMR)*. 1969;6:427–9.
123. Gunst RF, Mason RL. Fractional factorial design. In: *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*. 2009. p. 234–44.
124. Hajjaji N, Renaudin V, Houas A, Pons MN. Factorial design of experiment (DOE) for parametric exergetic investigation of a steam methane reforming process for hydrogen production. *Chem Eng Process Process Intensif*. 2010;49(5):500–7.
125. Hibbert DB. Experimental design in chromatography: A tutorial review. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2012;910: 2–13.
126. Cotter SC. A Screening Design for Factorial Experiments with Interactions. *Biometrika*. 1979;66(2):317–20.
127. Fang H, Zhao C, Song XY. Optimization of enzymatic hydrolysis of steam-exploded corn stover by two approaches: Response surface methodology or using cellulase from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* NL02. *Bioresour Technol*. 2010;101(11):4111–9.
128. Marcos M, García-Cubero MT, González-Benito G, Coca M, Bolado S, Lucas S. Optimization of the enzymatic hydrolysis conditions of steam-exploded wheat straw for maximum glucose and xylose recovery. *J Chem Technol Biotechnol*. 2013;88(2):237–46.
129. Lončar N, Slavić MŠ, Vujčić Z, Božić N. Mixed-mode resins: taking shortcut in downstream processing of raw-starch digesting α -amylases. *Sci Rep*. 2015;5:15772.
130. Zabed H, Sahu JN, Suely A, Boyce AN, Faruq G. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renew Sustain Energy Rev*. 2017;71:475–501.
131. Gnansounou E. Fuel Ethanol Current Status and Outlook. In: *Handbook of Plant-Based Biofuels*. CRC Press; 2008. p. 57–71.
132. Thangavelu SK, Ahmed AS, Ani FN. Review on bioethanol as alternative fuel for spark ignition engines. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2016;56:820–35.

133. Balls AK, Schwimmer S. DIGESTION OF RAW STARCH. *J Biol Chem.* 1944;156:203–10.
134. Schill SR. Ethanol Producer Magazine – Embracing the Carbohydrate Economy. 2008. p. 10099.
135. Cardona CA, Sánchez ÓJ. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technol.* 2007; 98(12):2415–57.
136. Zaldivar J, Nielsen J, Olsson L. Fuel ethanol production from lignocellulose: A challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001;56:17–34.
137. Thomas KC, Hynes SH, Ingledew WM. Effects of particulate materials and osmoprotectants on very-high-gravity ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* 1994; 60(5):1519-24.
138. Jones AM, Ingledew WM. Fuel alcohol production: optimization of temperature for efficient very-high-gravity fermentation. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60(3):1048–51.
139. Wang FQ, Gao CJ, Yang CY, Xu P. Optimization of an ethanol production medium in very high gravity fermentation. *Biotechnol Lett.* 2007;29(2):233–6.
140. Miot M, Betton JM. Optimization of the inefficient translation initiation region of the *cpxP* gene from *Escherichia coli*. *Protein Sci.* 2007;16(11):2445–53.
141. Pinsach J, de Mas C, López-Santín J. A simple feedback control of *Escherichia coli* growth for recombinant aldolase production in fed-batch mode. *Biochem Eng J.* 2006;29(3):235–42.
142. Ruiz J, Pinsach J, Álvaro G, González G, de Mas C, Resina D. Alternative production process strategies in *E. coli* improving protein quality and downstream yields. *Process Biochem.* 2009;44(9):1039–45.
143. Duan X, Chen J, Wu J. Optimization of pullulanase production in *Escherichia coli* by regulation of process conditions and supplement with natural osmolytes. *Bioresour Technol.* 2013;146:379–85.

144. Pinsach J, de Mas C, López-Santín J, Striedner G, Bayer K. Influence of process temperature on recombinant enzyme activity in *Escherichia coli* fed-batch cultures. *Enzyme Microb Technol.* 2008;43(7):507–12.
145. Lončar N, Fraaije MW. Not so monofunctional - a case of thermostable *Thermobifida fusca* catalase with peroxidase activity. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015;99(5):2225–32.
146. Lundstedt T, Seifert E, Abramo L, Thelin B, Nyström Å, Pettersen J. Experimental design and optimization. Vol. 42, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems.* 1998. p. 3–40.
147. Liu XD, Xu Y. A novel raw starch digesting alpha-amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: purification and characterization. *Bioresour Technol.* 2008; 99(10):4315-20.
148. Declerck N, Joyet P, Trosset JY, Garnier J, Gaillardin C. Hyperthermostable mutants of *Bacillus licheniformis* α -amylase: Multiple amino acid replacements and molecular modelling. *Protein Eng Des Sel.* 1995;8(10):1029–37.
149. Yook C, Robyt JF. Reactions of alpha amylases with starch granules in aqueous suspension giving products in solution and in a minimum amount of water giving products inside the granule. *Carbohydr Res.* 2002;337(12):1113–7.
150. Chang C, Richel A, Paquot M, Pappin B, Kiefel MJ, Todd A., *Carbohydrates – Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology.* 2012. 570 p.
151. Santiago M, Strobel S. Thin layer chromatography. *Methods Enzymol.* 2013;533:303–24.
152. Gernat C, Radosta S, Anger H, Damaschun G. Crystalline Parts of Three Different Conformations Detected in Native and Enzymatically Degraded Starches. *Starch.* 1993;45(9):309–14.
153. Colonna P, Buléon A, Lemarié F. Action of *Bacillus subtilis* alpha-amylase on native wheat starch. *Biotechnol Bioeng.* 1988;31(9):895–904.
154. Helbert W, Schüle M, Henrissat B. Electron microscopic investigation of the diffusion of *Bacillus licheniformis* alpha-amylase into corn starch granules. *Int J Biol Macromol.* 1996;19(3):165–9.

155. Kandra L, Gyémánt G, Remenyik J, Hovánszki G, Lipták A. Action pattern and subsite mapping of *Bacillus licheniformis* α -amylase (BLA) with modified maltooligosaccharide substrates. *FEBS Lett.* 2002;518(1–3):79–82.
156. Tran PL, Lee J-S, Park K-H. Experimental evidence for a 9-binding subsite of *Bacillus licheniformis* thermostable α -amylase. *FEBS Lett.* 2014;588(4):620–4.
157. Levison PR. Large-scale ion-exchange column chromatography of proteins. *J Chromatogr B.* 2003;790(1–2):17–33.
158. Ersson B, Rydén L, Janson JC. Introduction to Protein Purification. *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications: Third Edition.* 2011;1–22.
159. Janson JC, Jönsson JÅ. Introduction to Chromatography. In: *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications: Third Edition.* 2011. p. 23–50.
160. Karlsson E, Hirsh I. Ion Exchange Chromatography. In: *Protein Purification.* 2011. p. 93–133.
161. Scopes RK. Separation by Adsorption II: Ion Exchangers and Nonspecific Adsorbents. In: *Protein Purification: Principles and Practice*. New York, NY: Springer New York; 1994. p. 146–86.
162. Johansson BL, Belew M, Eriksson S, Glad G, Lind O, Maloisel JL. Preparation and characterization of prototypes for multi-modal separation media aimed for capture of negatively charged biomolecules at high salt conditions. *J Chromatogr A.* 2003;1016(1):21–33.
163. Wang P, Singh V, Xue H, Johnston DB, Rausch KD, Tumbleson ME. Comparison of raw starch hydrolyzing enzyme with conventional liquefaction and saccharification enzymes in dry-grind corn processing. *Cereal Chem.* 2007;84(1):10–14..
164. Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T. SWISS-MODEL: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:W252–8.
165. Kiefer F, Arnold K, Künzli M, Bordoli L, Schwede T. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Res.* 2009;37: D387–D392.
166. Robert X, Haser R, Mori H, Svensson B, Aghajari N. Oligosaccharide binding to

- barley α -amylase 1. *J Biol Chem*. 2005;280(38):32968–78.
167. Machius M, Declerck N, Huber R, Wiegand G. Activation of *Bacillus licheniformis* alpha-amylase through a disorder->order transition of the substrate-binding site mediated by a calcium-sodium-calcium metal triad. *Structure*. 1998 Mar;6(3):281–92.
 168. Machius M, Declerck N, Huber R, Wiegand G. Kinetic stabilization of *Bacillus licheniformis* alpha-amylase through introduction of hydrophobic residues at the surface. *J Biol Chem*. United States; 2003 Mar;278(13):11546–53.
 169. Kadziola A, Sogaard M, Svensson B, Haser R. Molecular structure of a barley α -amylase-inhibitor complex: implications for starch binding and catalysis. *J Mol Biol*. 1998;278(1):205–17.
 170. Hamilton LM, Kelly CT, Fogarty WM. Review: Cyclodextrins and their interaction with amylolytic enzymes. Vol. 26, *Enzyme and Microbial Technology*. 2000. p. 561–7.
 171. Davies GJ, Marek Brzozowski A, Dauter Z, Rasmussen MD, Borchert T V., Wilson KS. Structure of a *Bacillus halmapalus* family 13 α -amylase, BHA, in complex with an acarbose-derived nonasaccharide at 2.1 Å resolution. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. 2005;61(2):190–3.
 172. Tran PL, Cha HJ, Lee JS, Park SH, Woo EJ, Park KH. Introducing transglycosylation activity in *Bacillus licheniformis* α -amylase by replacement of His235 with Glu. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;451(4):541–7.
 173. Kanai R, Haga K, Akiba T, Yamane K, Harata K. Role of Trp140 at subsite -6 on the maltohexaose production of maltohexaose-producing amylase from alkalophilic *Bacillus* sp. 707. *Protein Sci*. 2006;15:468–77.
 174. Lopes ML, Paulillo SC de L, Godoy A, Cherubin RA, Lorenzi MS, Giometti FHC. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. *Brazilian J Microbiol*. 2016;1–13.
 175. Yingling B, Li C, Honglin W, Xiwen Y, Zongcheng Y. Multi-objective optimization of bioethanol production during cold enzyme starch hydrolysis in very high gravity cassava mash. *Bioresour Technol*. 2011;102(17):8077–84.

176. Jacques KA, T.P. Lyons, Kelsall DR. The Alcohol Textbook: A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries. Vol. 3, Test. 2003. 261-274 p.
177. Montesinos T, Navarro J-M. Production of alcohol from raw wheat flour by Amyloglucosidase and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol.* 2000;27(6):362–70.
178. Xu TJ, Zhao XQ, Bai FW. Continuous ethanol production using self-flocculating yeast in a cascade of fermentors. *Enzyme Microb Technol.* 2005;37(6):634–40.
179. Lee W. S, Chen I. C, Chang C. H, Yang S. S. Bioethanol production from sweet potato by co-immobilization of saccharolytic molds and *Saccharomyces cerevisiae*. *Renew Energ.* 2012;39: 216-222.
180. Wang P, Singh V, Xu L, Johnston DB, Rausch KD, Tumbleson ME. Comparison of enzymatic (E-Mill) and conventional dry-grind corn processes using a granular starch hydrolyzing enzyme. *Cereal Chem.* 2005;82(6):734–8.
181. Bialas W, Szymanowska D, Grajek W. Fuel ethanol production from granular corn starch using *Saccharomyces cerevisiae* in a long term repeated SSF process with full stillage recycling. *Bioresour Technol.* 2010;101:3126–3131.
182. Graves T, Narendranath N V, Dawson K, Power R. Interaction effects of lactic acid and acetic acid at different temperatures on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007;73(5):1190–6.
183. Lemuz CR, Dien BS, Singh V, McKinney J, Tumbleson ME, Rausch KD. Development of an ethanol yield procedure for dry-grind corn processing. *Cereal Chem.* 2009;86(3):355–60.
184. Johnson R, Padmaja G, Moorthy SN. Comparative production of glucose and high fructose syrup from cassava and sweet potato roots by direct conversion techniques. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2009;10(4):616–20.
185. Weller CL, Steinberg MP, Rodda ED. Fuel ethanol from raw corn by *Aspergilli* hydrolysis with concurrent yeast fermentation. Wiley; 1984.
186. Bernfeld P. Amylases, alpha and beta. *Methods Enzymol.* 1955;1(C):149–58.

187. Braman J, Papworth C, Greener A. Site-Directed Mutagenesis Using Double-Stranded Plasmid DNA Templates. In: Rapley R, editor. *The Nucleic Acid Protocols Handbook* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2000. p. 835–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1385/1-59259-038-1:835>
188. Milosavljević S. *Strukturne instrumentalne metode*. 2004. p. 469.

BIOGRAFIJA

Marinela Šokarda Slavić je rođena 05.12.1986. godine u Pančevu, Republika Srbija. Diplomirala je na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, smer diplomirani biohemičar, 2010. godine. 2011. godine je odbranila master rad pod nazivom „Odabir producenata amilaze iz domaćih izolata Bacillus sp.“

Član je Srpskog hemijskog društva, Srpskog biohemijskog društva i FEBS-a.

Do sada je objavila 5 radova u međunarodnim časopisima, jedan u vrhunskom međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti (kategorije M-21a), dva u vrhunskom međunarodnom časopisu (M-21), jedan u međunarodnom časopisu (kategorije M23), i revijalni rad u novom časopisu koji još uvek nije kategorisan; 8 saopštenja na skupovima međunarodnog značaja i 5 na skupovima nacionalnog značaja.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Маринела В. Шокарда Славић

Број индекса ДБ 06/2011

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Карактеризација, рационални дизајн и примена високоефикасне α -амилазе из *Bacillus licheniformis* за хидролизу сировог скроба“

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

Потпис аутора

У Београду, 19.09.2017.

Маринела Шокарда Славић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

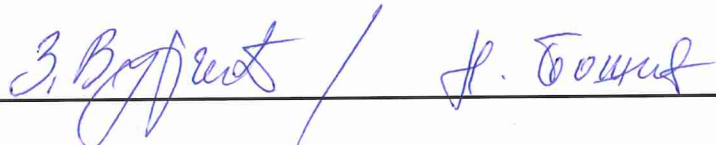
Име и презиме аутора Маринела В. Шокарда Славих

Број индекса ДБ 06/2011

Студијски програм Доктор биохемијских наука

Наслов рада „Карактеризација, рационални дизајн и примена високоефикасне α -амилазе из *Bacillus licheniformis* за хидролизу сировог скроба“

Ментор : проф. др Зоран Вујчић и научни саветник др Наташа Божић



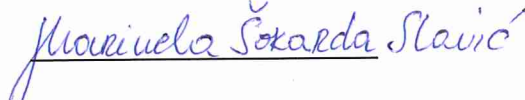
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

У Београду, 19.09.2017.

Потпис аутора



Изјава о коришћењу

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

„Карактеризација, рационални дизајн и примена високоефикасне α -амилазе из *Bacillus licheniformis* за хидролизу сировог скроба“

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

У Београду, 19.09.2017.

Потпис аутора

Јовица Ђоковић