УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Мр Виолета Д. Јаковљевић

БИОХЕМИЈСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ИЗАБРАНИХ ВРСТА ГЉИВА У ФУНКЦИЈИ БИОДЕГРАДАЦИЈЕ ДЕТЕРЏЕНТА

Докторска дисертација

Крагујевац, 2014.

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Мр Виолета Д. Јаковљевић

БИОХЕМИЈСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ИЗАБРАНИХ ВРСТА ГЉИВА У ФУНКЦИЈИ БИОДЕГРАДАЦИЈЕ ДЕТЕРЏЕНТА

Докторска дисертација

Крагујевац, 2014.

I. Аутор	
Име и презиме	**Виолета Д. Јаковљевић**
Датум и место рођења:	21.04.1972. год., Крагујевац
Садашње запослење:	Природно-математички факултет у Крагујевцу
I. Докторска дисертација	
Наслов:	**„Биохемијске карактеристике изабраних врста гљива у функцији биодеградације детерџента“**
Број страна:	187
Број слика:	5 слика, 18 табела, 96 графикона, 20 шема
Број библиографских јединица:	207
Установа и место где је израђен:	Природно-математички факултет, Крагујевац
Научна област (УДК):	Биологија – Биохемија 557.1
Ментор:	др Јелица Стојановић, ванредни професор
II. Оцена и одбрана	
Датум пријаве тезе:	02.10.2013. год.
Комисија за оцену подобности теме и кандидата:	1) **Др Мирослав М. Врвић**, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду, ужа научна област: Биохемија. 2) **Др Јелица Д. Стојановић**, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Биохемија. 3) **Др Недељко Манојловић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Фармацеутска анализа.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:	IV-01-689/14 од 11.12.2013. год.

Комисија за преглед оцену и одбрану докторске дисертације:	1) **Др Мирослав М. Врвић**, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду, ужа научна област: Биохемија. 2) **Др Јелица Д. Стојановић**, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Биохемија. 3) **Др Недељко Манојловић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Фармацеутска анализа
Комисија за одбрану докторске дисертације:	1) **Др Мирослав М. Врвић**, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду, ужа научна област: Биохемија. 2) **Др Јелица Д. Стојановић**, ванредни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Биохемија. 3) **Др Недељко Манојловић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Фармацеутска анализа.
Датум одбране докторске дисертације:	

БИОХЕМИЈСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ИЗАБРАНИХ ВРСТА ГЉИВА У ФУНКЦИЈИ БИОДЕГРАДАЦИЈЕ ДЕТЕРЏЕНТА

ИЗВОД

Циљ овог истраживања био је испитивање утицаја високих концентрација комерцијалног детерџента „Merix“, (Хенкел, Крушевац) на раст, развој и биохемијске карактеристике тестираних гљива које су изоловане из канализационих и индустријских отпадних вода. Гљиве су гајене у течној хранљивој подлози по Чапеку (контрола) и истој подлози са додатком детерџента у концентрацији 0,3% и 0,5%. У огледном периоду од 3. до 16. дана испитиване су промене: pH и редокс потенцијала; количине протеина, слободних и укупних органских киселина; квантитативни и квалитативни састав аминокиселина, као и активност одређених ензима у ферментационој течности. Истовремено је испитивана и концентрација детерџента (анјонских компоненти детерџента) у ферментационој течности помоћу MBAS методе. Све гљиве су разградиле детерџент 0,3% концентрације, а *M. racemosus* је разградила и детерџент 0,5% концентрације. Детерџент је утицао на инхибицију биомасе гљива у различитом проценту у зависности од врсте гљива и места изоловања. Код гљиве *M. racemosus* детерџент је деловао стимулативно на биомасу, тако да је већа биомаса измерена у подлози са 0,5% детерџентом. Присуство детерџента у хранљивој подлози и његових продуката деградације током ферментације гљива утицало је на промене свих испитиваних биохемијских параметара и ензимске активности.

Кључне речи: аминокиселине, биомаса, гљиве, детерџент, ензимска активност органске киселине, протеини, pH вредност, редокс потенцијал.

BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF SELECTED SPECIES OF FUNGI IN THE FUNCTION OF BIODEGRADATION DETERGENT

SUMMARY

The aim of this study was to investigate the effect of high concentrations of commercial detergent "Merix" (Henkel, Krusevac) on growth and development and biochemical characteristics of the tested fungi were isolated from sewage and industrial wastewater. Fungi were grown in a liquid Czapek nutrient medium (control) and in the same medium with the addition of 0.3% and 0.5% detergent. The changing of pH values and redox potential; amounts of protein, free and total organic acids, the qualitative and quantitative composition of the amino acids, as well as the activity of certain enzymes were investigated in the fermentation liquid during the experimental period from 3 to 16 days. At the same time, concentration of detergent (anionic components of the detergent) in the fermentation broth was examined using MBAS method. All of the tested fungi were degrade detergent in concentration of 0.3%, but only *M. racemosus* decompose detergent in concentration of 0.5%. Detergent influenced the inhibition of the fungal biomass in varying percentages depending on the type of fungus and isolation. Detergent has a stimulating effect on biomass of fungus *M. racemosus*, so a greater biomass is measured in a medium containing 0.5% detergent. The presence of detergent in the nutrient medium and its degradation products during fermentation of fungi influenced the change of all the examined biochemical parameters and enzyme activities.

Keywords: amino acids, biomass, detergent, enzyme activity, fungi, organic acids, pH value, proteins, redox potential

Истраживање презентовано и овој докторској дисертацији највећим делом је урађено у лабораторији за биохемију а један део истраживања у лабораторији за микробиологију Института за биологију и екологију и Института за хемију, Природно-матемтичког факултета, Универзитета у Крагујевцу.

Захваљујем се ментору др Јелици Стојановић, ванредном професору Природно-матемтичког факултета у Крагујевцу, која је предложила тему докторске дисертације.

Велику захвалност дугујем и др Славици Солујић, редовном професору у пензији, Природно-матемтичког факултета у Крагујевцу, која је омогућила реализацију овог рада, и наравно свима који су на било који начин допринели изради ове докторске дисертације.

Захваљујем се др Браниславу Ранковићу, редовном професору Природно-матемтичког факултета у Крагујевцу, на детерминацији гљива и стручној литератури.

Израда ове докторске дисертације је реализована у оквиру пројекта (ев. бр. иии 43004), финансираног од стране Министарства за науку и технолошки развој Републике Србије.

Захваљујем се руководиоцу пројекта др Мирославу Врвићу, редовном професору Хемијског факултета у Београду, на указаном поверењу и стручним и конструктивним саветима.

СКРАЋЕНИЦЕ

AESs	алкохол етар сулфати
LASc	линеарни алкил бензен сулфонати
AEs	алифатични алкохоли
TAED	тетраацетилетилен диамин
PAM	површински активне материје
PAHs	полициклични ароматични угљоводоници
CMC	критична мицеларна концентрација
TDTMA	тетрадецилтриметиламониум
SDS	натријум додецил сулфат
MBAS	метилен плаво-активна супстанца
DNase	деоксирибонуклеаза
RNase	рибонуклеаза
TEA	триетаноламин
POE	полиоксиетилен
EDTA	етилен-диамино-тетрасирћетна киселина
TEAD	тетраацетилендиамин
NaCMC	натријум карбоксиметил целулоза
PVP	поли(винилпиролидин)
HMC	хидроксиметил целулоза
MEC	метил-етил-целулоза
MC	метил целулоза
HPMC	хидроксиполиметилцелулоза
SPC	сулфофенолкарбксилат
PEG	полиетиленгликол
EPR	ендоплазматични ретикулум
BSA	говеђи албумин
TCA	трихлорсирћетна киселина
PCA	перхлорна киселина

САДРЖАЈ

1. УВОД

Више од 2000 година човечанство користи површинске активне супстанце или њихове састојке у различитим аспектима свакодневног живота: као средства за одржавање личне хигијене, средства за машинско и ручно прање рубља и посуђа, хемијско чишћење и у козметици.

Синтетичке површински активне супстанце су амфифилна једињења која редукују површински и међуфазни напон акумулацијом у међуслој течности које се не мешају, повећавајући растворљивост и мобилност хидрофобних или нерастворних органских једињења (Ron и Rosenberg, 2002; Mulligan, 2005). Њихова основна примена је у индустријској производњи детерџената. Заједничке групе активних компоненти (у детерџентима) у свим регионима у свету су: линеарни алкил бензен сулфонати (LASs), алкохол етар сулфати (AESs), алифатични алкохоли (AEs), алкохол сулфати (ASs) и сапуни. Савремени детерџенти су сложене смеше површински активних супстанци, компоненти за обезбеђивање ефикасности (натријум фосфата, натријум карбоната, натријум силиката, зеолита), избељивача (пербората, перкарбоната, тетраацетилетилен диамина - TAED), омекшивача, оксидационих средстава и разних ензима (протеазе, липазе, амилазе и целулазе) (Palicka, 1997; Gaur Ruchi *и сар.*, 2008). У детерџентима за прање рубља користе се анјонске и нејонске површински активне супстанце, са уделом 20-25%. Према статистичким подацима (CESIO, 2011), у свету се годишње произведе око 12,5 милиона тона активних супстанци, а само у EU око 2,99 милиона тона. Око 64% произведених тензида се налази у детерџентима за прање и средствима за чишћење. Процењује се да стопа раста производње тензида на годишњем нивоу износи око 0,5 милиона тона.

Повећана употреба детерџената у домаћинствима довела је до њихове акумулације у отпадним водама и природним воденим екосистемима, и изазвала многобројне штетне последице по микробиолошку заједницу и хидробионте (Кумар, 2007; Chaturvedi и Kumar, 2010). Детерџенти и њихови продукти деградације као полутанти доспевају у животну средину преко индустријских и канализационих отпадних вода, применом пестицида или одлагањем отпадног активног муља (Abu-Zreig *и сар.*, 2003; Cavalli, 2004; Ying, 2006). У природним

водама се може очекивати даља разградња помоћу микроорганизама, адсобција на чврсте честице и фотохемијска разградња. Такође, треба предвидети биоакумулацију тензида и њихових производа деградације у хидробионтима, што је један од могућих начина којим штетне материје доспевају до човека. Други начин је путем воде за пиће у коју доспевају из загађених површинских вода или испирањем поља на којима се одлаже муљ. Испуштање отпадних вода и таложење PAS-и у седименту, токсичност на водене организме и биоакумулација у ланцу исхране, заједно са емисијом CO_2, SO_2 и NO_x, су основни проблем савременог света (Horvat *и cap.*, 2005; Hidayat, 2011).

Постоје различити механизми токсичног дејства сурфактаната на жива бића а неки од њих још увек нису сасвим познати. У суштини, токсичност сурфактаната се испитује преко оштећења на шкргама и епидермису или нарушавањем ћелијске мембране акватичних организама. Степен токсичности сурфактаната одређује се на основу способности сурфактаната да абсорбују и продиру у ћелијску мембрану акватичних организама (Rozen *и cap.*, 2001). Токсично дејство на бактерије огледа се у инхибицији пролиферације ћелија и смањењу деградационе способности PAHs. Токсични молекули сурфактаната индукују апоптозу ћелија или некрозе, у зависности од концентрације сурфактаната. Више концентрације (близу или изнад CMC) доводе до стварања смеше мицела са мембранским липидима и изазивају солубилизацију мембрана. Услед тога, веома брзо долази до некрозе и лизе ћелија. На концентрацијама испод CMC, молекули сурфактанта интерферирају са фосфолипидним слојем у мембрани, изазивајући нарушавање структуре неких ензима, или продиру у ћелије. У том случају активира се сигнал за апоптозу.

Токсичност сурфактаната зависи од њихове молекулске структуре. Генерално, нејонски сурфактанти су мање токсични од јонских сурфактаната. Негативно наелектрисана површина бактеријске ћелије чини их осетљивијим на наелектрисане сурфактанте, нарочито позитивно наелектрисане катјонске сурфактанте. Нејонски сурфактанти типа алкилетоксилата и алкилфенолетоксилата са просечним бројем EO 9-12 мономера, су токсични за неколико PAH-деградирајућих бактеријских култура. Токсичност опада са повећањем хидрофилности сурфактанта. Детаљне студије токсичности сурфактаната су показале да токсичност расте у следећем правцу: нејонски сурфактанти (Tween 80,

Brijj 30, 10LE и Brij 35) < анјонски сурфактант (LAS) < катјонски сурфактант (TDTMA). Утврђено је да се раст бактерија благо повећава у присуству фенантрена и LAS-а као јединих извора угљеника и енергије у подлози, у концентрацијама мањим од 10 mg L^{-1}. Према литературним подацима, анјонски сурфактанти имају токсично дејство на различите водене организме у концентрацијама мањим од 0,0025 mg L^{-1}(Petterson *и cap.*, 2000).

Познато је да производи са великим уделом PAS, као што су детерџенти, у воденим екосистемима изазивају низ штетних ефеката: инхибирају раст једноћелијских алги, успоравају процес пречишћавања воде стварањем пене, што успорава растварање кисеоника који је неопходан за дисање и фотосинтезу, и изазива еутрофикацију.

Многе студије су показале да тензиди мењају конформацију протеина и тако утичу на ензимску активност, стабилност и специфичност (Kamiya *и cap.*, 2000; Cserhati *и cap.*, 2002). На пример, дејство тензида Tween 80 и рамнолипида на екстрацелуларне ензиме гљива *Penicillium simplicissimum* и *Streptomyces badius*, бактерија *Pseudomonas aeruginosa* и *Bacillus subtilis* зависи од врсте тензида, врсте микроорганизама и класификације ензима. Tween 80 и Triton X-100 снажно стимулишу липазну активност *Pseudomonas aeruginosa*, док натријум додецил сулфат (SDS) снажно инхибира активност овог ензима (Izrael Zivkovic *и cap.*, 2009). Са друге стране, Tween 60 у концентрацијама од 0,05% до 1,0% (v/v) и анјонски тензид натријум лаурил сулфат (SLS) у концентрацијама од 0,05% до 0,7% (v/v) изазивају инхибицију таназне активности. Tween 80 и Tween 20 утичу на смањење таназне активности у концентрацијама од 0,025% до 1,0% (v/v), а Tween 20 и Triton X-100 стимулишу протеазну активност.

Испитан је утицај различитих врста тензида на раст микроорганизама и корелација са ензимском активношћу и секрецијом протеина. Нејонски детерџент Tween 80 стимулише раст ћелија, док анјонски детерџент SDS значајно смањује број ћелија *Nocardiopsis dawsonvillei*. У присуству Tween 80 утврђена је позитивна корелација између количине секретованих протеина, активности киселе фосфатазе и биомасе. Код бактерија које су гајене у подлози са високим концентрацијама SDS-а уочена је корелација са пероксидазном активношћу што указује на оштећење ћелијске мембране (Gordiziani *и cap.*, 2008). Познато је да агресивни

ћелијски метаболити попут органских киселина, екстрацелуларних ензима, азотних оксида, реактивне врсте кисеоника делују деструктивно (Mercer *и сар.*, 1996). Многа истраживања су показала да се пероксид као и ROS стварају и генеришу током метаболичких реакција микроорганизама. Различити физички и хемијски фактори изазивају значајне промене пермеабилности ћелија, доводећи до нарушавања ензимских и функционалних активности микроорганизама (Livingstone, 2003). Штавише, изазивајући структурне промене мембране, детерџенти се користе као оруђе за испитивање функционалних карактеристика микробиолошких ћелија (Liwarska-Bizukojc и Bizukojc, 2006).

Сагледавајући штетне утицаје детерџента на животну средину и жива бића, индустрија детерџената се данас суочава са два велика проблема као што су биодеградабилност и екотоксичност. Регулатива Европске Уније прописује да су произвођачи детерџената у обавези да провере биодеградабилност сваке компоненте присутне у детерџенту, пре пуштања детерџента на тржиште. Скрининг методе којима се испитује степен примарне биодеградације прописују да површинске активне компоненте треба да буду разградиве најмање 80%, у периоду од 28 дана. Међутим, због наглог пораста производње и потрошње детерџената у свету, нова регулатива Европске Уније из 2004. год. прописује да све компоненте детерџента треба да буду потпуно разградиве. Законским актима ЕУ дефинисана је највећа дозвољена концентрација детерџента у отпадним водама које се уливају у градску канализацију - 4 mg L^{-1} и 0,5 mg L^{-1} у водама које се уливају у природне реципијенте (European Parliament Regulation (EC) No 648/2004).

Као одговор на присуство различитих полутаната који нарушавају природне екосистеме развијене су бројне физичке и хемијске методе за уклањање ксенобиотика из животне средине. Ове методе се најчешће морају комбиновати да биле што ефикасније (Farhadian *и сар.*, 2008). Поред тога што су физичко-хемијске технике ремедијације веома скупе, велики проблем представља и то што њихова употреба често доводи до стварања интермедијерних једињења са потенцијално токсичнијим ефектом од полазних полутаната. Многобројна истраживања су усмерена на продукцију биосурфактаната помоћу микроорганизама који би били алтернатива синтетичким сурфактантима. Међутим, због скупог технолошког процеса, овај проблем се решава применом обновљивих супстрата

(агроиндустријски отпад, меласа, фракције из рафинерија јестивих уља, отпад дестилерија, итд.) у процесу ферментације, чиме се трошкови производње смањују а истовремено се решава и проблем индустријског отпада. Са друге стране, велику пажњу истраживача и даље привлачи идентификација различитих врста микроорганизама које су резистентне на присуство полутаната у њиховом непосредном окружењу. Употреба способности микроорганизама да користе широк спектар једињења као извор угљеника и енергије у сврху пречишћавања полутаната се означава као биоремедијација и представља обећавајућу, релативно ефикасну и веома скупу технологију (Megharaj *и сар.*, 2011).

С обзиром на дугачак списак различитих загађивача, али и у складу са постојањем великог броја микроорганизама и њихов диверзитет (Curtis *и сар.*, 2002; Buvaneswari *и сар.*, 2013), постоји стална потреба за изолацијом нових микроорганизама са способношћу деградације полутаната, као и разумевањем генетике и биохемије процеса биодеградације. Такође, поред потраге за организмима који би се могли користити у биоремедијацији, напредак у области метагеномике и настојање да се секвенционира што већи број генома, отворили су врата потрази за генима чији продукти имају улогу у деградацији полутаната (Golyshin *и сар.*, 2003; Zhao и Poh, 2008).

До данас је идентификован велики број врста микроорганизама (бактерија, алги и гљива) које имају способност биодеградације органских једињења доспелих у животну средину посредством човека. Многобројна истраживања су показала да бактерије, посебно врсте из родова *Alcaligenes*, *Deleya*, *Oceanospirillum*, *Aquaspirillum* и *Pseudomonas* имају изузетну способност потпуне деградације LAS-а. Међутим, иако у истраживањима биодеградације доминирају бактерије, гљиве су много практичније као тест организми због својих морфолошких, физиолошких и биохемијских карактеристика.

Гљиве су еукариотски организми који живе у различитим животним срединама и изложене су многобројним екстремним факторима који ограничавају њихов опстанак. Ови фактори су разноврсни: промене pH, осмотске промене, оксиди радикала, дефицит хране и изложеност разним хемикалијама (Fuchs и Mylonakis, 2009). Они могу да потичу из природне средине или од одбрамбеног

имунолошког система домаћина (животиња и човека) као одговор на патогенезу. Одбрамбени механизам гљива заснива се на структури ћелијског зида који је јединствен у живом свету. Ћелијски зид се састоји од *α*- и *β*-глукана, N-ацетилглукозамина, манопротеина и различитих гликопротеина. Када ћелије гљива дођу у контакт са овим факторима оне одговарају експресијом гена у правцу синтезе протеина који омогућавају опстанак у измењеним условима средине (Estruch, 2000; Elisane *и cap.*, 2008). Захваљујући томе, филаментозне гљиве имају потенцијал да расту у присуству различитих полутаната које разграђују до простијих молекула и да користе деградационе продукте као извор енергије и угљеника. Апикалним растом хифа омогућено је продирање у чврсте супстрате и секреција екстрацелуларних ензима из везикула, које су лоциране на врху хифа, у спољашњу средину. Под дејством ових ензима долази до разлагања сложених органских једињења на простија које гљива користи за раст и развој, тј. за биомасу (Mohsenzadeh *и cap.*, 2010). Осим тога, гљиве су препознатљиве по способности продукције великог броја екстрацелуларних протеина, органских киселина и других секундарних метаболита, као резултат адаптације на измењене услове средине (Lilly и Barnett, 1951; Punt *и cap*., 2002; Adrio и Demain, 2003). Захваљујући овим особинама гљиве се интензивно користе у ферментационој индустрији. Егзоензими филаментозних гљива имају широку индустријску употребу због вишеструких предности: лаког изоловања и пречишћавања, јефтиније и обимније продукције и стабилности.

Ћелијски зид гљива делује као измењивач катјона услед негативног наелектрисања које потиче од различитих функционалних група карбоксилне, фосфатне, амино или сулфхидрилне, у различитим компонентама зида (хемицелулоза, пектин, лигнин, итд.). Полимери (полисахариди, гликопротеини) у ћелијском зиду су значајан извор лиганда који стварају комплексе са металима. Уклањање токсичних металних јона помоћу биомасе гљива (биосорпцијом) је процес који се интензивно проучава и привлачи све већу пажњу истраживача. По изузетној способности биосорпције металних јона издвајају се врсте из рода *Penicillium*: *P. cyclopium* Cu(II); *P. chrysogenum* U(VI), Th(IV), Cu(II), Pb(II), Zn (II); *P. italicum* Mn(II), Fe(II), Ni(II), Co(II); *P. canescence* Cd(II), Pb(II), Hg(II), As(III). Из рода *Aspergillus* издвајају се врсте *A. fumigatus* Cd(II), Cu(II), Co(II), Ni(II); *A. niger*

Cu(II), Zn(II). Биомаса ових гљива представља отпад ферментационе индустрије који се ефикасно може применити за уклањање метала као алтернатива конвенцијалим физичко-хемијским процесима (Shazia *и сар.*, 2013).

За разлику од ферментационих процеса у којима се гљиве интензивно примењују, њихова примена у биодеградацији различитих ксенобиотичких једињења је недовољно заступљена и углавном је ограничена на врсте из родова *Penicillium* и *Aspergillus* (Damodarkumar и Murugesan, 2013). За разлику од бактерија, гљиве не могу да асимилирају PAHs као једини извор угљеника и енергије, већ захтевају присуство кометаболита (најчешће глукозе) за њихову детоксикацију. Механизам деградација PAH филаментозним гљивама је повезан са екстрацелуларним лигнолитичким ензимима или са интрацелуларним цитохром P_{450} монооксигеназама, што је случај код врста из рода *Penicillium*. Почетне реакције оксидације доводе до стварања монофенола, дифенола, дихидродиола и кинона као главног производа оксидације. У литератури се могу наћи подаци везани за деградацију пирена и фенола и његових деривата (хлорофенола, пентахлорфенола) врстама *Penicillium* при чему настају катехол, хидрокинон и *cis,cis*-муконска киселина. Врсте родова *Aspergillus, Cladosporium, Penicillium, Fusarium, Rhizopus, Trichoderma* и *Ulocladium*, које су изоловане из земљишта контаминираног нафтом показале су се веома ефикасним у деградацији нафте и нафтних деривата (Hashem, 2007; Akpoveta *и сар.*, 2011). Међутим, механизми биодеградације комплексних PAHs гљивама нису довољно испитани, зато су неопходна даља истраживања за идентификацију метаболита и објашњење ензимских реакција укључених у биодеградационе процесе (Tang *и сар.*, 2013).

У литератури има веома мало података везаних за деградацију комерцијалних детерџената дејством гљива. Недавно су Ojo и Oso (2009) дошли до открића да гљиве изоловане из речног муља могу да разграђују различите синтетичке детерџенте анјонског типа: *Myceliophthora thermophila, Geomyces* sp., *Alternaria alternata*, *Verticillium alboatrum*, *Aspergillus flavus*, *Trichoderma* sp., *Aspergillus oryzae*. Наша досадашња истраживања су базирана на проучавању утицаја комерцијалног прашкастог детерџента „Merix“ (Мерима, Крушевац) нејонског типа, етоксилованог олеил-цетил алкохола и натријум триполифосфата као квантитативно најзаступљенијих компоненти детерџента, на метаболичку

активност преко 20 различитих врста филаментозних гљива које су изоловане из отпадних вода реке Лепенице. Испитиван је утицај различитих концентрација детерџента на промене физичко-хемијских и биохемијских параметара гљива: pH, редокс потенцијала, количине протеина, количине слободних и укупних органских киселина, квалитативни и квантитативни састав аминокиселина и угљених хидрата, ензимске активности и суву биомасу. Један део истраживања био је усмерен на испитивање биодеградације етоксилованог олеил-цетил алкохола у присуству појединачних и здружених култура различих врста гљива (*Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *T. longiobrachum*). Међутим, деградација анјонског детерџента „Merix“ (Хенкел, Крушевац) дејством филаментозних гљива није била предмет истраживања.

2. ЦИЉ РАДА

Циљ овог истраживања био је испитивање утицаја комерцијалног прашкастог детерџента марке „Merix“ (Хенкел, Крушевац) на раст и биохемијске карактеристике изабраних врста филаментозних гљива гајених у течној Чапековој подлози, у временском периоду од 16 дана. Изабране врсте гљива су изоловане из отпадних канализационих вода које садрже детерџент пореклом из домаћинстава и индустријских отпадних вода фабрике за производњу детерџента Хенкел, Крушевац. Селекција гљива извршена је на основу квантитативне заступљености гљива у отпадним водама и на основу литературних података о примени гљива у биоремедијацији и њиховој способности биодеградације различитих угљоводоника. У овом истраживању испитивана је биоразградивост комерцијалног детерџента у концентрацији 0,3% и 0,5% (неколико хиљада пута више од законом прописаних концентрација које се могу наћи у природним водама и које су леталне за већину живих бића) дејством изабраних врста гљива. Добијени резултати требало би да послуже као теоријска основа за могућу практичну примену тестираних гљива у процесима пречишћавања отпадних вода и производњи ензима који би се користили као додатак детерџенту у хемијској индустрији и другим индустријским гранама.

Методологија истраживања се може поделити у неколико сегмената:

1. Изоловање и идентификација различитих врста филаментозних гљива из отпадних канализационих вода које садрже детерџент пореклом из домаћинстава као и из индустријских отпадних вода фабрике Хенкел, Крушевац, Србија.

2. Испитивање утицаја високих концентрација детерџента 0,5% и 0,3% на раст и развој изолованих гљива, гајених у течној Чапековој подлози са додатком комерцијалног детерџента „Merix“ (Хенкел, Србија) мерењем суве биомасе, у експерименталном периоду од 3. дана до 16. дана.

3. Утврђивање и упоређивање степена биодеградације комерцијалног детерџента „Merix“, (Хенкел, Србија) методом MBAS, дејством изолованих гљива у експерименталном периоду од 16 дана.

4. Испитивање утицаја тестираних концентрација детерџента на физичко-хемијске, хемијске и биохемијске карактеристике гљива током њиховог раста и развоја у течној хранљивој подлози. Испитивани су следећи параметри:
   - pH вредност,
   - редокс потенцијал,
   - количина слободних и укупних органских киселина,
   - количина протеина,
   - квалитативни и квантитативни састав аминокиселина,
   - активност алкалне и киселе инвертазе,
   - активност алкалне протеазе,
   - активност алкалне фосфатазе,
   - активност фосфорилазе,
   - активност нуклеаза (DNaze и RNaze).

5. Статистичка анализа добијених резултата и утврђивање степена корелације између тестираних параметара.

3. ОПШТИ ДЕО

3.1. Хемијски састав детерџената

Детерџенти су површински активне супстанце које смањују површински напон, помажу квашење и емулговање, скидају прљавштину и стварају пену, употребљавају се као средства за прање, а нису обухваћени сапунима (Џокић, 1985).

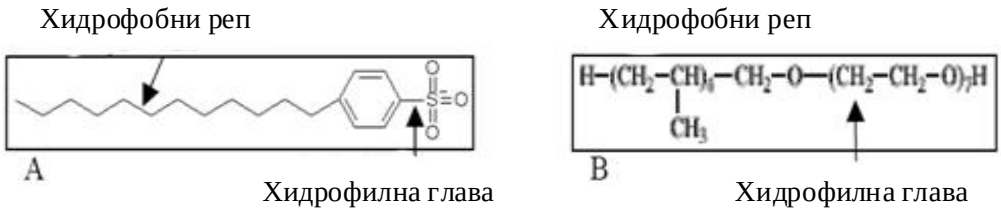
Детерџенти су вишекомпонентни производи у којима су најважнији састојци површински активне супстанце (PAS), познате под називом тензиди или сурфактанти. Детерџенти садрже и различите додатке помоћу којих се постижу и појачавају одређена жељена дејства средстава за прање. Зато се као најважније компоненте у формулацији детерџената поред PAS издвајају и компоненте за обезбеђивање ефикасности (билдери), средства за бељење и адитиви (Докић, 2000; Совиљ, 2012). У састав једног типичног детерџента за прање рубља (Мићовић, 1967) улазе следеће компоненте (Табела 3.1.1):

Табела 3.1.1. Процентуални удео компонената у детерџенту за прање рубља

Хемијски састав детерџента	Проценат (%)
Додецил бензол сулфонат	20
Натријум триполифосфат	45
Натријум силикат (алкалне соли)	5
Натријум карбоксиметил целулоза	0,5
Алифатични амиди	25
Натријум сулфат	22
Влага	5
Супстанце са флуоросцентним својствима	у траговима

3.1.1. Површински активне супстанце

Тензиди су органска једињења са карактеристичном дифилном структуром молекула која им омогућава двојако понашање према води и другим растварачима. Молекул тензида садржи два дела: један који је растворљив у специфичној течности - *лиофилни део* и други који је нерастворљив - *лиофобни део*. Када је растварач вода тада су ови делови молекула означени као хидрофилни и хидрофобни део.



Шема 3.1.1. Приказ хидрофилног и хидрофобног дела молекула линеарног алкил бензен сулфоната (А) и етоксилованог алкохола (Б)

Хидрофилни део молекула је поларна глава а хидрофобни реп. Хидрофобни део молекула садржи 8-18 C атома повезаних у раван или разгранати низ, са засићеним или незасићеним везама. Тај низ може делимично да садржи и цикличне структуре. Дужина и структура хидрофобног дела утичу на површинску активност тензида тј. на способност прања, квашења и емулговања (Ash и Ash, 1993). Хидрофилни део молекула сачињавају групе које доприносе њиховој лакшој растворљивости у води. Према врсти јона који одређују наелектрисање хидрофилног дела, тензиди се деле на 4 класе (Шема 3.1.2):

Шема 3.1.2. Класификација сурфактаната

Анјонски тензиди у воденом раствору дисосују на површински активни јон и Na^+ јон. Нејонски тензиди у воденом раствору не дисосују, тј. не дају јоне. Хидрофилност и растворљивост у води овим тензидима дају групе које сарже атоме кисеоника, као нпр. оксиетиленска група -CH2CH2O-. Катјонски тензиди дисосују у воденом раствору на површински активан катјон и анјон. Амфотерни тензиди имају једну или више функционалних група које дисосују у воденом раствору, а у зависности од pH испољавају својства анјонских (у базној средини), катјонских (у киселој средини) тензида, или неутралних цвитер јона.

3.1.1.1 Анјонске површински активне супстанце

Поларне групе су карбоксилна, сулфатна, сулфонска и фосфатна. Као наелектрисани јони користе се натријум, калијум, амонијум, калцијум и разни протоновани амини. Јони Na^+ и K^+ помажу растворљивост у води а јони Ca^{2+} и Mg^{2+} растворљивост у мастима. Амини и соли алканол амина дају производе који су растворљиви и у води и у мастима. Комерцијалне анјонске PAS-е представљају смешу хомолога алкил ланаца различите дужине (Kosswig и Stache, 1993; Holmberg *и сар.*, 2002).

Најзначајније особине анјонских PAS-и:

- Имају најбољу моћ прања, јефтини су и главна су компонента детерџената за прање.
- Осетљиви су на тврдоћу воде.
- Представљају највећу и најзначајнију групу PAS-и.
- Нису компатибилни са катјонским PAS-а.
- Кратки POE низови између анјонске групе и хидрофобног остатка значајно повећавају толеранцију на соли и растворљивост у органским растварачима.
- У присуству киселина сулфати су подложни хидролизи, док су др. типови стабилни.
- Везују се за протеине и уколико се нађу у воденим екосистемима утичу на живи свет.

Од анјонских тензида највише се употребљавају:

А. Сапуни (соли виших масних киселина),

Б. Сулфонати (алкилбензен сулфонат, алфа-олефин сулфонат и алкан сулфонати),

В. Сулфати (алкил-сулфати и алкил етар-сулфати).

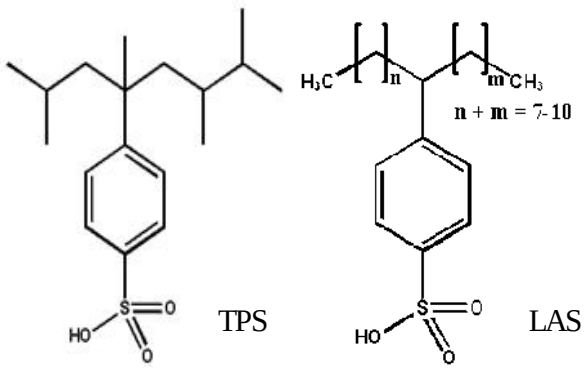
А. Сапуни су средства за прање у којима су као површински активне компоненте заступљене алкалне соли масних киселина, односно анјонски тензиди у којима хидрофилни део молекула чини карбоксилна група. Добијају се деловањем база на масти и уља. Као базе користе се NaOH, KOH или TEA. Растварају се и у

поларном и у неполарном растварачу. Недостаци су им осетљивост на тврдоћу воде, и издвајање у киселој средини у виду нерастворне карбоксилне киселине. Због велике моћи прања и пенушања и даље се користе у формулацијама детерџената. Ако се додају у малом проценту могу деловати и као антипенушавци.

Б. Сулфонати

Сулфонати су соли сулфонске киселине код које је хидроксисулфонил-група везана преко сумпора директно за угљеников атом хидрофобног остатка. Ова веза је хемијски и термално стабилна. Јак афинитет ове групе према води чини ову класу једињења добро растворном у води. Осетљивост ове класе једињења на тврдоћу воде опада са порастом молекулске масе. Сулфонати данас представљају најважнију групу синтетичких сурфактаната.

p-алкилбензенсулфонати, односно њихове соли, представљају најважнију групу сурфактаната по количини која се производи. Алкилбензен сулфонати са мање од 6 C атома у алкил низу не показују особине површински активних супстанци. Алкилбензен сулфонати са 8 до 10 C атома показују добре особине квашења али нису погодни за емулзије и средства за чишћење због кратког хидрофобног дела. Највећу примену имају они са просечним бројем од 12 C атома. Међу алкилбензен сулфонатима разликују се 2 групе (Шема 3.1.3):



TPS LAS

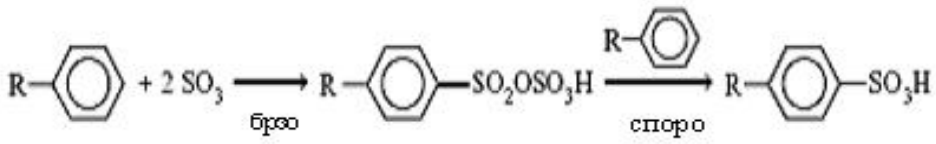
Шема 3.1.3. Структура алкил бензен сулфоната

Уколико се алкиловање бензена изводи са рачвастим тетрапропиленом као производ настаје тетрапропиленбензен сулфонат (TPS), али ако се алкиловање изводи са смешом *n*-алкена као производ настаје линеарни алкилбензен сулфонат (LAS). Данас се скоро искључиво примењује LAS због своје биодеградабилности.

Производња LAS-а се састоји из три фазе:

- производња олефина или алкилхлорида,
- алкиловање бензена,
- сулфоновање бензена.

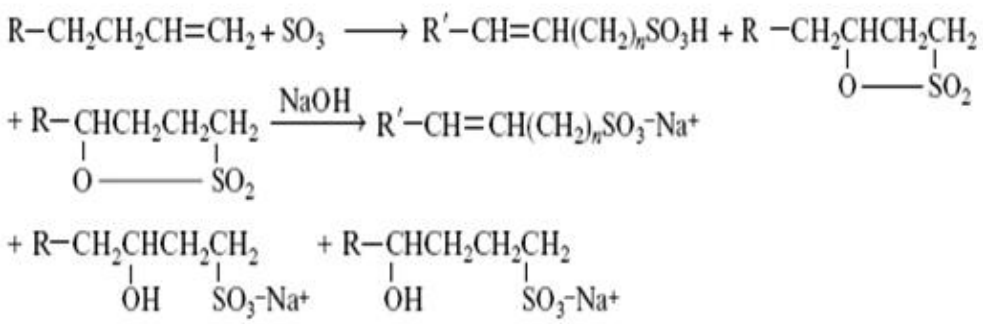
Олефини који се користе у реакцији алкиловања добијају се претежно дехидрогенизацијом парафина (*n*-алкана). Парафини се одвајају из керозинске фракције MOLEX поступком помоћу молекулских сита (зеолит 5 A).Овако добијени парафини се загревају на 500°C и под притиском од 3 бара се мешају са благим вишком водоника и пропуштају преко модификованог платинског катализатора на Al_2O_3 (Pacol поступак). Смеша олефина и парафина се меша са вишеструким вишком бензена (да би се спречило полиалкиловање) и флуороводоником. Алкиловање се изводи на $t < 50$°C уз интензивно хлађење. Након тога се издваја кисели катализатор. Трагови HF се одвајају у посебној *striping* колони, а затим се одвајају бензен и парафини и на крају се одваја производ од производа полиалкиловања. Сулфоновање се претежно изводи реакцијом са SO_3, а могу се користити и сумпорна киселина, олеум, хлоросулфонска киселина или амидосулфонска киселина. Почетна реакција у синтези је стварање пиросулфонске киселине која лаганом, спонтаном реакцијом даје сулфонску киселину. Она се затим неутралише помоћу каустичне соде и даје површински активну алкилбензен сулфонатну со.



Ова реакција даје смешу изомера са фенил групом везаном за C атом алкил ланца. Стога LAS представља специфичну смешу изомера и хомолога; сваки садржи ароматични прстен сулфонован у *пара* положају и спојен са линеарним алкил ланцем на било ком угљениковом атому осим на терминалном (Schönkaes, 1998; Cavalli *и сар*, 1999b; Valtorta *и сар*., 2000).

Алфа-олефин сулфонати су добили назив по алфа-олефинима из којих се добијају у реакцији са сумпор триоксидом. Овом реакцијом се добија смеша алкен-сулфоната (60-70%), 3- и 4-хидроксиалкан сулфоната (око 30%) и неких дисулфоната. Као почетни материјал за синтезу користе се две главне фракције алфа-олефина C12-

C16 и C16-C18. Стварање хидроксиалкан сулфонске киселине тече преко цикличног султона који се дејством базе преводи у алкен сулфонат.



Алфа-олефин сулфонати нису осетљиви на тврдоћу воде, имају велику моћ квашења на нижим температурама али обилно пенушају због чега им се обавезно додају антипенушавци.

Парафин сулфонати или секундарни *n*-алкан сулфонати се углавном производе у Европи. Настају сулфоксидацијом парафин угљоводоника са сумпор диоксидом и кисеоником помоћу УВ зрака или сулфохлоринацијом.

B. Сулфатни алкохоли и етоксиловани алкохоли представљају веома значајне групе анјонских PAS-и у детерџентима. То су моноестри сумпорне киселине. Естарска веза је слаба и лако се раскида на ниској pH када је хидролиза аутокаталитичка. Као сиров материјал користе се и линеарни и разгранати алкохоли са C8-C16. Линеарни C12 алкохоли доводе до стварања додецилмоноестра сумпорне киселине, а након неутрализације са каустичном содом настаје натријум додецил сулфат (SDS).

Етоксиловани алкохоли који се користе као интермедијенти обично су масни алкохоли са 2-3 оксиетилен јединице. Процес је сличан сулфонацији. У реакцији учествује сумпор триоксид, и аналогно сулфонацији, реакција тече преко интермедијента пиросулфата. Синтеза сулфатног естра етоксилованог алкохола тече упоредо (на сличан начин). У овој реакцији настају значајне количине 1,4-диоксана који је токсичан и мора се уклонити евапорацијом. Ови сурфактанти су обично означени као етар сулфати.

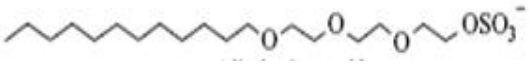
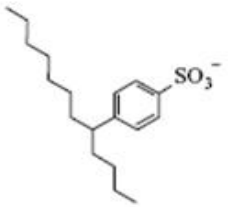
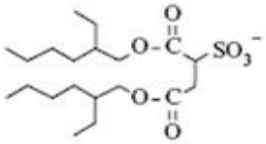
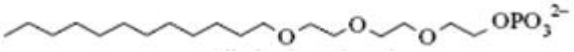
$$R-OH + 2\,SO_3 \xrightarrow[\text{брзо}]{} R-O-SO_2OSO_3H \xrightarrow[\text{споро}]{R-OH} R-O-SO_3H$$

Етоксиловани алкохоли могу да се трансформишу у карбоксилате као нпр. етар карбоксилате. Један од начина њиховог традиционалног добијања је из натријум-монохлорацетата, реакцијом Вилиамсове синтезе етра:

$$R-(OCH_2CH_2)_n-OH + ClCH_2COO^-Na^+ \longrightarrow R-(OCH_2CH_2)_n-O-CH_2COOH + NaCl$$

Други, много значајнији процес је оксидација етоксилованог алкохола кисеоником или пероксидом у алкалном раствору, у присуству катализатора платине или паладијума. Ова реакција омогућава конверзију етоксилата у великим количинама али може довести до оксидативне деградације полиоксиетиленског ланца.

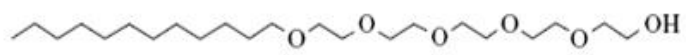
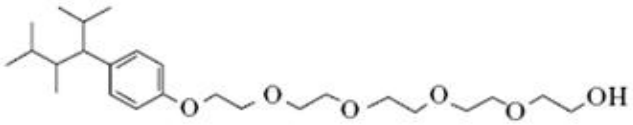
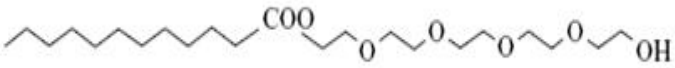
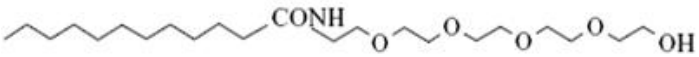
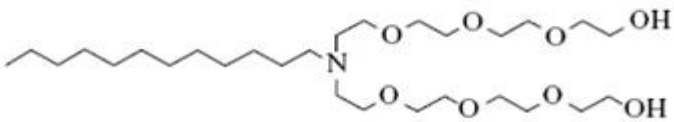
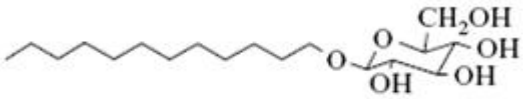
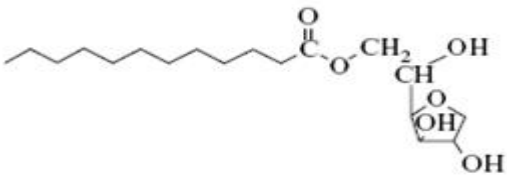
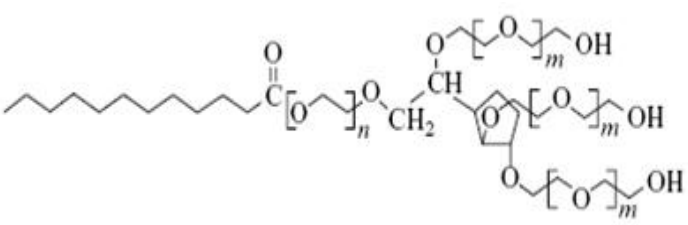
Табела 3.1.2. Најзаступљеније анјонске површински активне супстанце

Хемијска структура	Назив
	Алкил етар карбоксилат
	Алкил сулфат
	Алкил етар сулфат
	Алкил бензен сулфонат
	Диалкилсулфо сукцинат
	Алкил фосфат
	Алкил етар фосфат

3.1.1.2. Нејонске површински активне супстанце

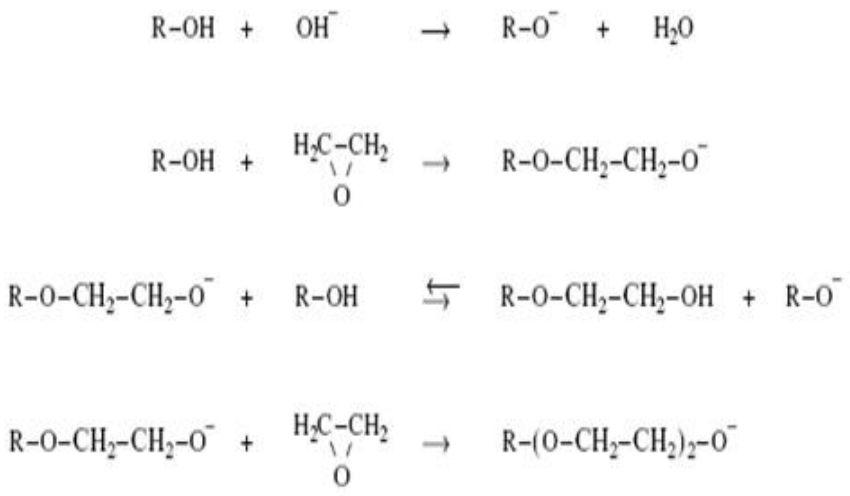
Нејонски сурфактанти су новијег порекла а у последњих 30 година су успели да заузму 40% тржишта сурфактаната. Најважнији представници ове категорије једињења су етоксиловани алкохоли, етоксиловани алкилфеноли, естри виших масних киселина са полихидроксилним алкохолима, амини и амиди (Табела 3.1.3).

Табела 3.1.3. Најзаступљеније нејонске PAS-е

Хемијска структура	Назив
	Етоксилат масног алкохола
	Етоксилат алкилфенола
	Етоксилат масне киселине
	Етоксилат масног амида
	Етоксилат масног амина
	Алкил гликозид
	Сорбитан алканоат
	Етоксиловани сорбитан алканоат

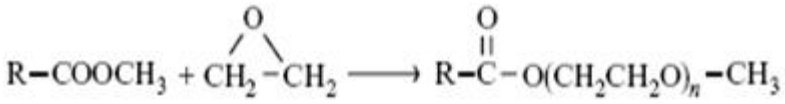
Нејонске PAS-е имају као поларну групу полиетарну или полихидроксилну јединицу. Добијају се полимеризацијом етилен оксида у алкалној средини. Најчешће, број оксиетилен јединица у поларној глави је 5 до 10, мада неки дисперзанти често имају много дужи ланац.

Појединачно најзначајнија група нејонских PAS-и су етоксилати масних алкохола (Stache, 1996; Holmberg *и cap.*, 2002). Етоксилати се добијају адицијом етилен-оксида на једињења која поседују протоне који могу да дисосују. Најчешћи супстрати су виши алкохоли (хидрогенизација метилестара виших масних киселина или синтетски) нонилфенол (добијен алкиловањем фенола тримером пропена у присуству BF_3 као катализатора), карбонске киселине и амиди етаноламина са карбонском киселинама. Етоксилати масних алкохола су означени општом формулом C*m*E*n*, где *m*-представља број C атома у алкил ланцу а *n*-број оксиетиленских јединица. Користе се за производњу течних и прашкастих детерџената и имају разноврсну примену у индустрији. Употребљавају се и као емулгатори. Хидролитичку стабилност испољавају на pH 3-11. На ваздуху подлежу спорој оксидацији, а неки оксидациони продукти, нпр. алдехид и водоник пероксид су токсичнији за кожу од полазних молекула.



Посебну групу нејонских сурфактаната представљају естри масних киселина и полихидроксилних алкохола (глицерола, еритрола, пентаеритрола, сорбитола и шећера). Индустријски су најважнији естри глицерола и сорбитола мада у новије време пажњу привлаче и естри шећера.

Етоксиловани триглицериди нпр. етоксилати рицинусовог уља имају централно место на тржишту и сматрају се „полуприродним“ тензидима. У последње време расте интересовање за метилестрима етоксилованих масних киселина који се добијају етоксилацијом метил естара употребом специјалног катализатора Mg-Al угљоводоника. Предност ових једињења у односу на етоксиловане алкохоле је боља растворљивост у води.



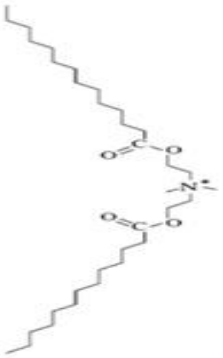
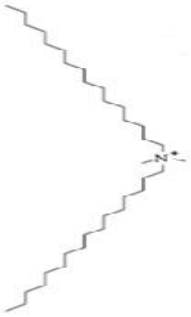
Најважније карактеристике нејонских PAS-и:

- Компатибилне су са свим осталим PAS-а.
- Нису осетљиве на тврдоћу воде и присуство електролита.
- Имају ниске вредности CMC.
- Добра су средства за квашење, емулговање и детерџенти.
- Физичко-хемијске особине им јако зависе од температуре. Са повећањем температуре опада им растворљивост јер расте хидрофобни карактер, за разлику од јонских. Нејонске PAS-е на бази шећера ипак показују нормалну зависност од температуре, растворљивост се повећава са порастом температуре.

3.1.1.3. Катјонске површински активне супстанце

Катјонски сурфактанти имају позитивно наелектрисану хидрофилну групу. Катјонска структура може бити присутна у молекулу сурфактанта (кватернерне амонијум соли) или може настати у киселој средини (етоксиловани амини са дугачким алкил низом) (Richmond, 1990; Holmberg *и сар.,* 2002). Катјонски сурфактанти се користе као биоциди, хербициди, инхибитори корозије и оксидације, омекшивачи, флотациона средства, дисперзанти и друго. Најважнији катјонски сурфактанти су кватернерне тетраалкил-амонијум соли, *N*-*N*-диалкилимидазолини и *N*-алкилпиридијум соли.

Табела 3.1.4. Најзаступљеније катјонске PAS-е

Хемијска структура	Назив
	Масна амино со
	Масна диамино со
	Кватернерни алкил
	Кватернерни естар
	Кватернерни диалкил

Амини делују само у протонованом облику, не могу се користити на вишим pH вредностима. За разлуку од амина, кватернерна амонијум једињења нису осетљива на pH. Етоксиловани амини могу имати особине и катјонских и нејоногених PAS-и. Са повећањем дужине полиоксиетиленског ланца ове PAS-е добијају све више нејоногени карактер.

Синтеза неестарских кватернерних амонијума тече преко нитрила. Масна киселина реагује са амонијаком на високој температури дајући одговарајући нитрил

преко интермедијента амида. Нитрил се затим хидрогенацијом преводи у примарни амин помоћу кобалта или никла као катализатора.

$$R-COOH + NH_3 \xrightarrow{-H_2O} R-C\equiv N \xrightarrow{H_2} R-CH_2NH_2$$

Секундарни амини могу настати директно из нитрила или у двостепеној реакцији из примарног амина. У првој реакцији која тече преко интермедијента имина, амонијак се уклања из реакције у правцу стварања секундарног амина.

$$R-C\equiv N + R-CH_2NH_2 + 2H_2 \longrightarrow (R-CH_2)_2NH + NH_3$$

Примарни амин може да се конвертује у дуголанчани 1,3-диамин, цијаноетилацијом.

$$R-CH_2NH_2 + CH_2=CHCN \longrightarrow R-CH_2NH(CH_2)_2CN \xrightarrow{H_2} R-CH_2NH(CH_2)_3NH_2$$

Примарни или секундарни дуголанчани алкил амини могу да се метиловањем конвертују у терцијарне амине, нпр. реакцијом са формалдехидом у редукујућим условима.

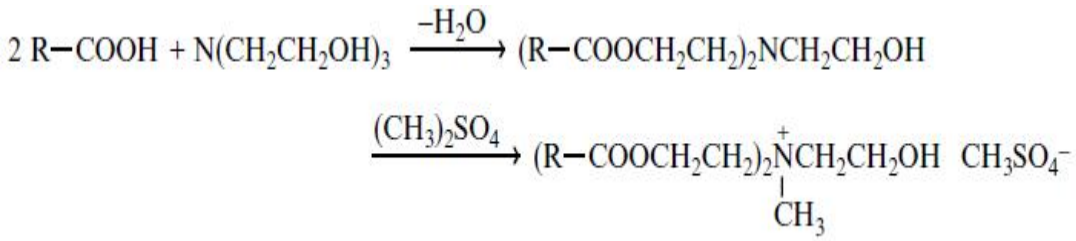
$$(R-CH_2)_2NH + HCHO + H_2 \longrightarrow (R-CH_2)_2NCH_3$$

Етилен оксид такође може да се користити за алкиловање примарног или секундарног амина у терцијарне амине, $R\text{-}CH_2N(CH_2CH_2OH)_2$ или $(R\text{-}CH_2)_2NCH_2CH_2OH$.

Кватернерна амонијум једињења настају из терцијарних амина алкилацијом помоћу метил хлорида, метил бромида или диметил сулфата.

$$(R-CH_2)_2NCH_3 + CH_3Cl \longrightarrow (R-CH_2)_2N + (CH_3)_2\ Cl^-$$

Естарске кватернерне амонијум PAS-е добијају се естерификацијом масних киселина или њихових деривата са аминоалкохолима после чега следи реакција N-алкилације. Реакција се може илустровати на примеру триетаноламина као амин алкохола и диметилсулфата као метилационог средства.

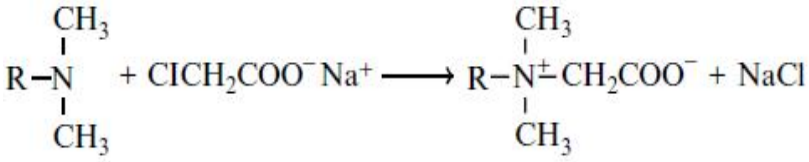


Етоксиловани алкохоли код којих се терминална OH-група замењује метил или етилетар групом представљају категорију посебних производа. Ове нејонске PAS-е добијају се O-алкилацијом етоксилата са алкил хлоридом или диалкилсулфатом, или хидрогенацијом одговарајућег ацетала. У поређењу са нормалним етоксилованим алкохолима, они су стабилнији према јаким алкалијама и јакој оксидацији. Одликују се слабим пенушањем.

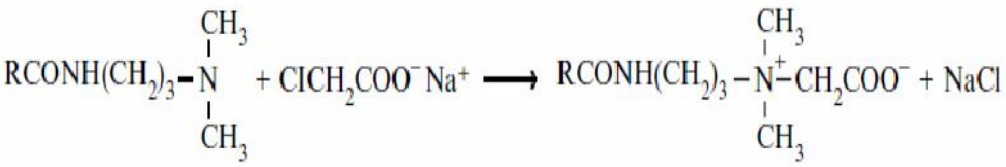
3.1.1.4. Цвитерјонске PAS-е

Ове површински активне супстанце садрже две супротно наелекрисане групе. Позитивно наелектрисани део молекула је на натријуму, а негативни најчешће на карбоксилату. Најзаступљеније цвитерјонске PAS-е су *N*-алкил деривати појединих аминокиселина као што су: глицин (NH_2CH_2COOH), бетаин ($(CH_2)_2NCH_2COOH$) и амино пропионска ($NH_2CH_2CH_2COOH$).

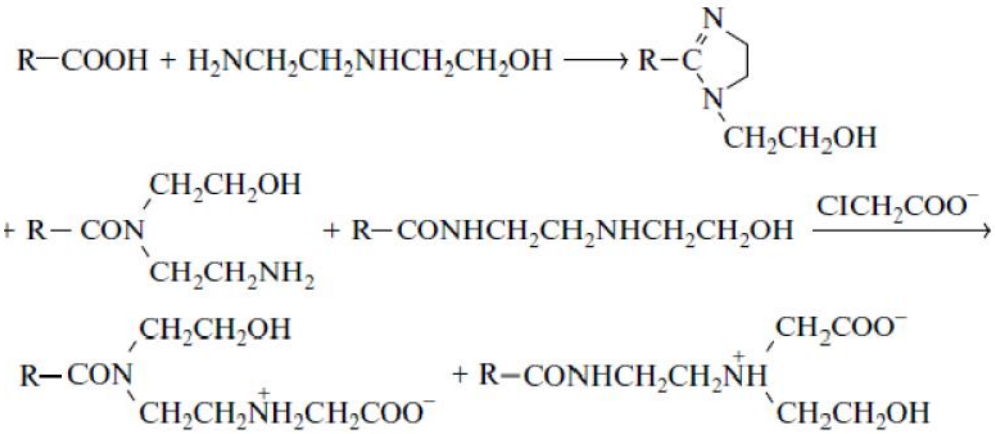
Бетаинска PAS-а настаје реакцијом алкил диметиламина са натријум монохлорацетатом:



Амидо бетаини се синтетишу аналогно из амидоамина:

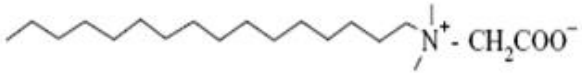
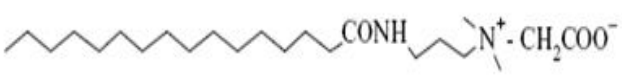
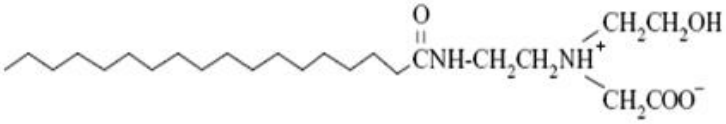
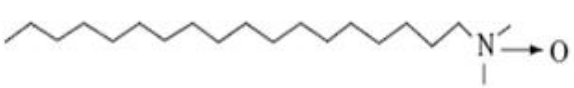


Још једна веома важна група цвитерјонских PAS-и је имидазолин који се синтетише у реакцији масних киселина са аминоетилетанол амином, у реакцији са хлороацетатом:



Амин оксиди или тачније *N*-оксиди терцијерних амина могу бити цвитерјонске, нејоногене или катјонске PAS-е (Lomax, 1996; Holmberg *и сар.*, 2002). Код њих је наелектисање на азоту и кисеонику. Они су у суштини неелектролити, али на ниској pH или у присуству анјонске PAS-е могу да привуку протон и награде катјонску коњуговану киселину. Амино оксиди настају оксидацијом одговарајућег терцијерног амина водоник пероксидом.

Табела 3.1.5. Најзаступљеније цвитерјонске PAS-е

Хемијска структура	Назив
	Бетаин
	Амидобетаин
	Имидазолин
	Амино оксид

3.1.2. Компоненте за обезбеђивање ефикасности (билдери)

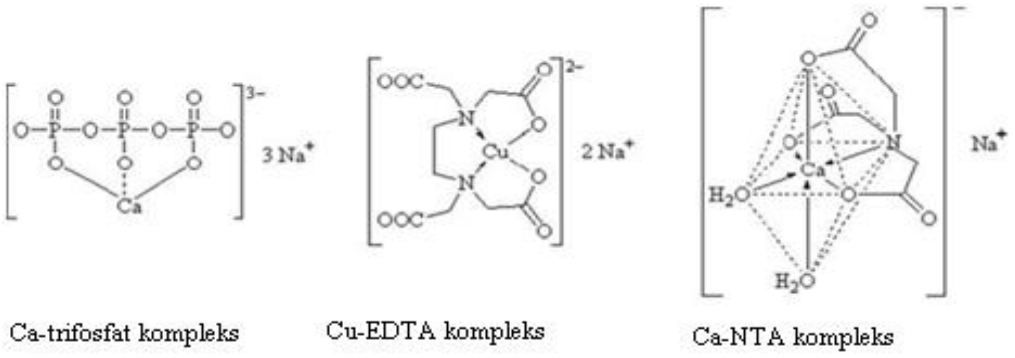
Билдери директно утичу на изглед прања, додају се у већим количинама у детерџенте за разлику од осталих помоћних сировина које су заступљене у малом проценту или их уопште нема у зависности од намене детерџента. Билдери садрже

материје које потпомажу процес прања, омекшавају воду и за себе вежу јоне тешких метала који потичу из воде, тканине, нечистоћа. Данас се користе 3 врсте билдера: алкалије, комплексирајућа средства, и измењивачи јона. Билдери могу да:

1. Елиминишу јоне метала из воде, тканине, нечистоћа.
2. Отклоне нечистоће и мрље на основу специфичне детерџентске способности за одређене тканине и нечистоће.
3. Повећају способност детерџента и олакшају дисперговање нечистоће.
4. Спречавају таложење каменца на текстил и машину.
5. Имају добру хемијску стабилност, компатибилни су са др. адитивима, нису хигроскопни.
6. Имају ниску токсичност на људе и околину.
7. Јефтини су.

Алкалије су се користиле као први билдери: Na- и K-карбонат и Na-силикат. Отклањају тврдоћу тако што преципитују јоне. Модерни билдери не преципитују тврдоћу већ је отклањају комплексацијом или јоноизменом.

Комплексирајућа средства формирају стабилне комплексе који су растворљиви у води са присутним јонима тешких и земноалкалних метала. Обично се као резултат комплексирања добијају хелати. Скупљи су од алкалија, а највише се користе трифосфати, углавном Na-трифосфат. Најбоље делују на температури изнад 60°C, одлично отклањају јоне метала, али не делују на нижим температурама. То се може регулисати повећањем њихове концентрације. Мана им је што при недовољној концентрацији граде дикалцијум-трифосфат који преципитује.



Шема 3.1.4. Комплексирајућа средства

Данас се њихово коришћење избегава, па се користе мање акватоксични билдери попут EDTA, лимунске киселине, нитрилсирћетне киселине, итд.

Сложени фосфати имају велики удео у општим особинама детерџента, како због својих битних својстава тако и због процентног удела у смеши (око 45%). Најзначајнији сложени фосфати који се налазе у формулацијама прашкастих детерџената су приказани у табели 3.1.6.

Табела 3.1.6. Фосфатна једињења у детерџентима

Назив хемијског једињења	Хемијска структура
Тетранатријум пирофосфат	$Na_4P_2O_7$
Натријум триполофосфат	$Na_5P_3O_{10}$
Натријум тетраполифосфат	$Na_6P_4O_{13}$
Натријум хексаметафосфат	$Na_6P_6O_{18}$
Натријум хептафосфат	$Na_9P_7O_{22}$

Од наведених сложених фосфата у индустрији детерџената се највише користи натријум триполифосфат. Натријум триполифосфат је чврсто неорганско једињење који се примењује у концентрованим детерџентима за машинско прање рубља, за прање посуђа, у тоалетним производима, итд. Има многобројне функције: секвистерацијом тврде воде омогућава ефикасно дејство PAS-и, има улогу пуфера, емулгатор је нечистоћа и спречава поновно таложење нечистоћа, хидролизује масти. У област pH 9-10 натријум триполифосфат се понаша као добар пуфер што је посебно значајно за одржавање pH раствора за прање који не сме бити ни сувише алкалан али ни сувише кисео. У реакцији са јонима метала, гради анјонске комплексне соли: $(CaNaP_3O_{10})^{2-}$, $(CaP_3O_{10})^{3-}$, $Ca_5(PO_3O_{10})_2$, $(FeP_3O_{10})^{2-}$, $(MgOHP_3O_{10})^{4-}$.

Реакција натријум триполифосфата са Ca^{2+} може се приказати на следећи начин:

$$Na_5P_3O_{10} \rightarrow NaP_3O_{10}^{4-} / P_3O_{10}^{5-} \rightarrow CaNaP_3O_{10}^{2-} / CaP_3O_{10}^{3-} \rightarrow Ca_5(P_3O_{10})_2$$

Крајњи производ реакције $Ca_5(P_3O_{10})_2$ је нерастворљив и преципитира. Особина фосфата да преципитира у присуству јона метала користи се у постројењима

за пречишћавање отпадних вода у којима се фосфати елиминишу хемијском преципитацијом са солима гвожђа или алуминијума. Због штетног утицаја фосфата по животну средину данас се производе нефосфатни детерџенти.

Јоноизмењивачи су поликарбоксилне киселине попут полиакрилне киселине и зеолита, који се примењују у циљу сузбијања штетног дејства поливалентних металних катјона. Зеолити су алумосиликати, јако добри измењивачи јона који потискују триполифосфате. Јонска измена код зеолита зависи од степена хидратисаности катјона и величине јона. Поред калцијума зеолити везују и Pb, Cu, Ag, Cd, Zn и Hg јоне. За измену јона потребно им је неко време, а најбољи су ако се примењују у облику кристала.

Данас се у индустријској производњи детерџената најчешће иде на комбинацију билдера јер се фосфати често не могу избацити из формулације, па се комбинују са карбонатима, Na-карбоксилатима, алкалијама, зеолитима и поликарбоксилним киселинама.

3.1.3. Антипенушавци

Додају се детерџентима за машинско прање где појава вишка пене смета. Они не смеју да угасе пену већ само треба да регулишу њену количину јер је она та која односи нечистоћу. Као антипенушавци се користе примарни, секундарни и терцијерни амини, масни алкохоли и њихови амиди, парафинско уље, амиди масних киселина а најчешће диметилполисилоксани (силикон) јер су потпуно инертни. То су течне компоненте, а да би се користиле у прашкастим формама морају се капсулирати. Зато се ствара матрикс са прашкастим зеолитом који се додаје поликарбоксилним киселинама. Они се накнадно умешавају у детерџенте. Основна улога им је да имају већу површинску активност од PAS-а у ламели пене и тако доведу до њеног пуцања.

3.1.4. Ензими

Ензими су адитиви који се примењују у детерџентима од 1959. године, увођењем протеаза изолованих из *Bacillus subtilis* у детерџенте, у Швајцарској. Протеазе хидролизују протеине у нечистоћама које потичу од хране (млеко, чоколада, и др.). Од 1973. године, захваљујући развоју поступка за индустријску производњу амилазе (ензим који хидролизује α-1,4 гликозидну везу) започиње његова примена у

детерџентима. Од 1988. године у детерџенте највишег квалитета уводи се и ензим липаза (хидролизује триглицериде).

Критеријуми које ензими треба да задовоље да би се користили у детерџентима су:

- Оптимум активности у базној средини.
- Ефикасност на нижим температурама 20-40°C.
- Стабилност на 60°C.
- Стабилност у присуству PAS-и, билдера и избељивача у току складиштења и процесу прања.
- Довољно широк опсег деловања на протеине, триглицериде и шећере.

Активност ензима зависи од температуре и pH у процесу прања. Целулаза се користи код осетљивих тканина да врати леп изглед аморфним подручјима која бубре током прања. Протеолитички ензими су прашкасти и раније су се мешали са детерџентима, међутим пошто су штетни у таквом облику, данас се и они капсулирају, боје и тек онда умешавају са детерџентима. Унутар обојене капсуле налази се матрикс ензима обложен са карбоксилним киселинама које га штите од распадања и омогућавају постепено ослобађање у току прања.

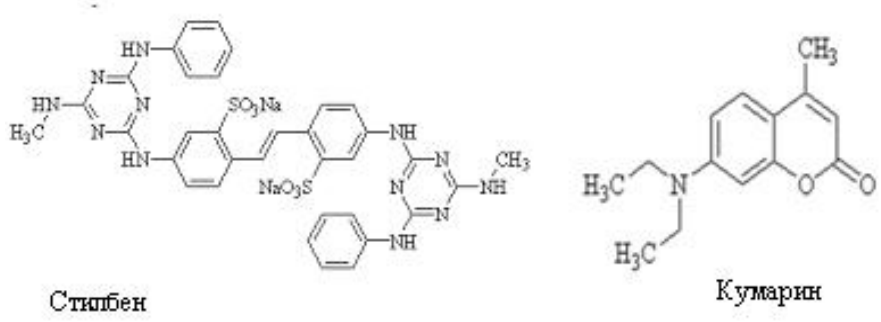
3.1.5. Антикорозиви

Додају се детерџентима за машинско прање рубља и детерџентима за прање металних површина. То су углавном Na-силикати и Na-метасиликати који се додају у малом проценту.

3.1.6. Активатори бељења

Највише се користи TEAD-тетраацетилендиамин, који реагује са перборатом и гради персирћетну киселину која има видљив оксидативни ефекат и на нижим температурама.

Оптичка средства за бељење су флуоресцентна једињења која УВ зраке претварају у зраке већих таласних дужина, најчешће у плаву боју видљивог дела спектра. Начешће се користе једињења кумарина и стилбена (Шема 3.1.6).



Шема 3.1.6. Хемијска структура оптичких белила

3.1.7. Средства против посивљења

Сива боја потиче од таложења металних јона или од поновног таложења отклоњених нечистоћа. То се спречава додавањем макромолекулских супстанци најчешће NaCMC или PAS, код природних тканина које обично имају неко наелектрисање. Код синтетичких тканина бољи ефекат имају нејоногене макромолекулске супстанце, попут PVP, HMC, MEC, MC и HPMC. Често се користи комбинација анјонских и нејонских макромолекула јер су и тканине комбинованог састава.

3.1.8. Средства против преношења боје

У ову сврху користи се поли(винилпиролидон) који делује на принципу комплексирајућих агенаса; боју која се испере са тканине уграђује у комплексе. Макромолекули се отклањају водом и боја се не таложи поново. У ову групу спада и поли (винилоксид).

3.2. Биодеградација детерџената

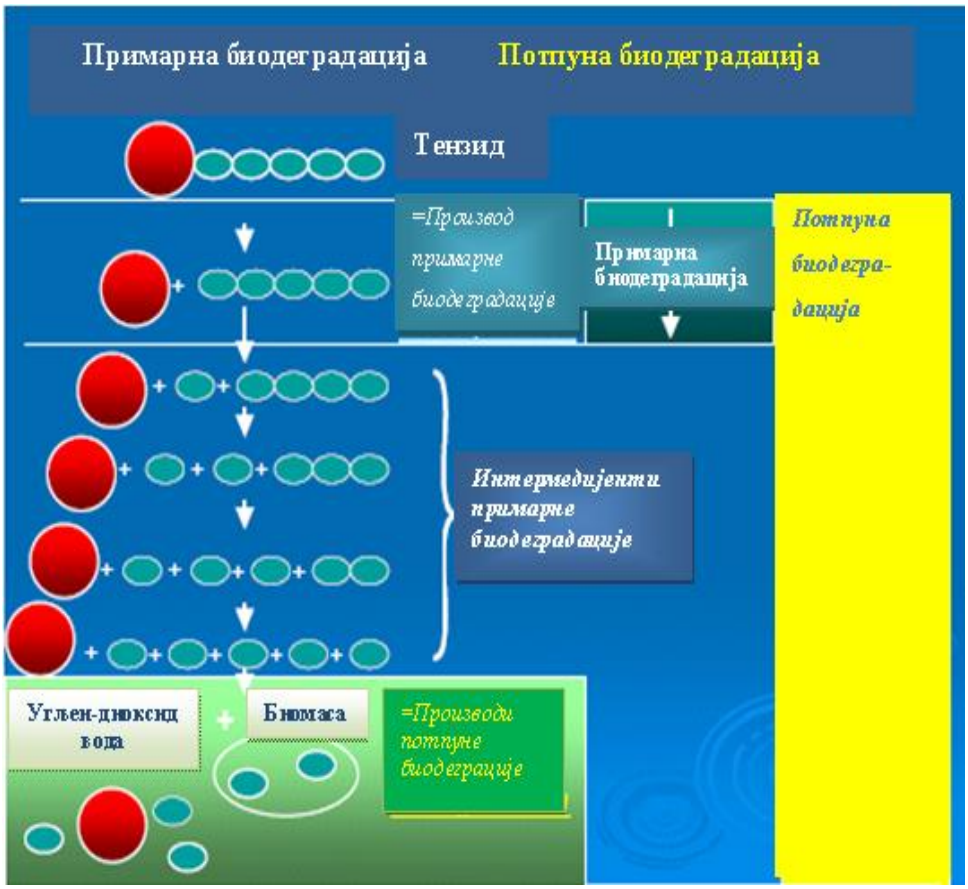
Биодеградација је јединствен природни процес којим се органска једињења разграђују биолошком активношћу живих организама (Rapaport *и сар.*, 1992). У овом процесу најважнију улогу имају микроорганизми (бактерије и гљиве), како у природним екосистемима тако и у постројењима за прераду отпадних вода. Они су способни да користе као храну и тако разграде велики број органских једињења у природи (Moreno *и сар.*, 1990). Биодеградација органских материја одвија се постепено, у две етапе: примарном и потпуном деградацијом (шема 3.2.1).

Примарна биодеградација започиње деловањем екстрацелуларних ензима микроорганизама на молекул тензида који се трансформише у интермедијенте

(Swisher, 1987). Долази до губитка повшински активних особина на граничној површини, као што је нпр. способност пенушања, услед структурних промена у молекулу тензида. Истовремено, смањује се токсичност ових тензида на акватичне организме (Kimerle *и сар.* 1977; Kimerle, 1989; Maenpaa и Kukkonen, 2006; Oya и Hisano, 2010).

Потпуна биодеградација резултира разградњом деградационих продуката (интермедијената) до крајњих продуката: воде, угљен диоксида и неорганског сулфата, и уградњом ових конституената у биомасу (Karsa и Porter, 1995). Ова реакција је позната као минерализација.

Swisher (1981) је указао да су за потпуну биодеградацију неопходни следећи услови: присуство мешовите микробиолошке популације, слободан приступ нових микроорганизама, аклиматизација, довољно хране и фактора раста, ограничена концентрација тензида у животној средини.



Шема 3.2.1. Приказ биодеградације тензида по фазама

3.2.1. Основни принципи аеробне деградације угљоводоника

Основне карактеристике аеробних микроорганизама у процесу биодеградације органских полутаната су (шема 3.2.2):

1. Метаболички процеси су неопходни за оптимизацију контакта између микробиолошке ћелије и органског полутанта. Хемикалије морају да буду приступачне (доступне) организмима који имају способност деградације. На пример, угљоводоници су нерастворљиви у воду и њихова деградација захтева продукцију биосурфактаната.

2. Иницијални интрацелуларни напад ензима на молекуле органских полутаната је оксидативни процес, активација и инкорпорација су кључне ензимске реакције катализоване оксигеназама и пероксидазама.

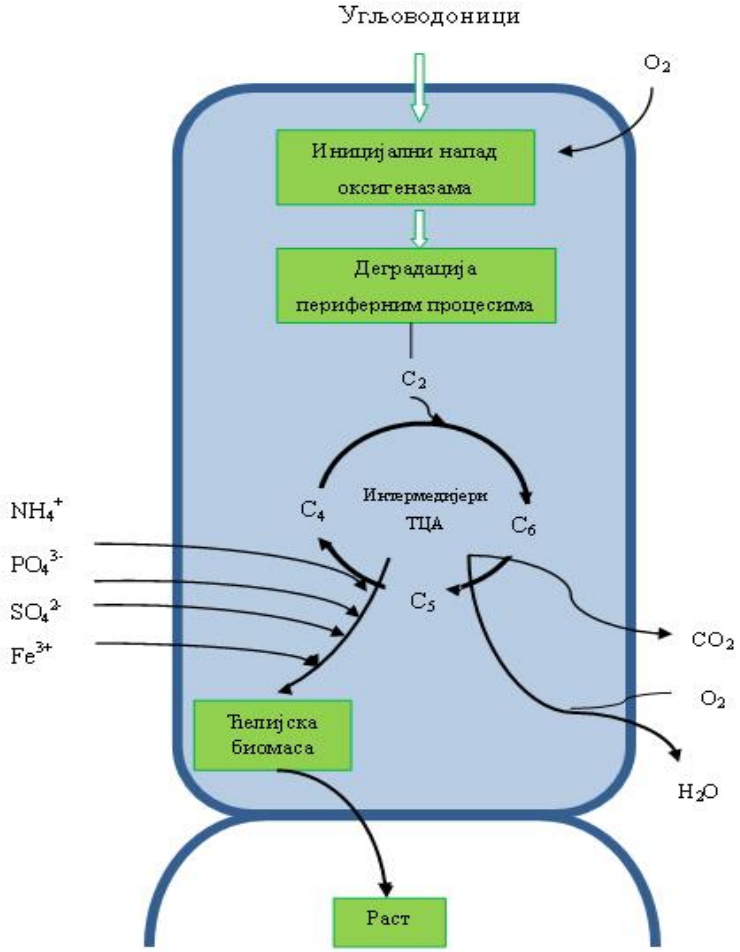
3. Периферни деградациони процеси конвертују органске полутанте корак по корак, у интермедијерне продукте који се укључују у централни интермедијерни метаболизам – TCA.

4. Биосинтеза ћелијске биомасе из централних метаболичких прекурзора: ацетил-CoA, сукцината, пирувата. Шећери неопходни за разне биосинтезе и раст морају се синтетисати глуконеогенезом.

Као што је у уводном делу поменуто, откривен је огроман број бактерија, квасаца и гљива које имају способност деградације органских полутаната (van Beilen *и сар.*, 2003; Wentzel *и сар.*, 2007). Биодеградација је дефинисана као биолошки катализована редукција комплексности (сложености) хемијских једињења. Заснива се на два процеса: расту и кометаболизму. У процесу раста, органски полутанти се користе као једини извор угљеника и енергије. Овај процес резултира у потпуној деградацији (минерализацији) органских једињења. Кометаболизам се дефинише као метаболизам органских једињења у присуству супстрата раста које се користе као примарни извор угљеника и енергије.

Ензимски кључне реакције у процесу аеробне биодеградације су оксидације, катализоване оксигеназама и пероксидазама. Оксигеназе су оксидоредуктазе које врше инкорпорацију кисеоника у супстрат. Организмима који врше деградацију полутаната присуство кисеоника је неопходно за два метаболичка процеса:

иницијални напад на супстрат и на крају респираторног ланца (Andreoni и Gianfreda, 2007; Fritsche и Hofrichter, 2008).



Шема 3.2.2. Основни принципи аеробне деградације угљоводоника

3.2.2. Механизми биодеградације анјонских PAS-и

Биодеградација површински активних супстанци тече уобичајеним биохемијским реакцијама које су ензимски катализоване а извесна одступања могу настати интеракцијом једне врсте PAS-е са неком другом органском супстанцом. Биодеградација PAS-и започиње реакцијом оксидације, стога је количина O_2 један од значајних фактора овог процеса. Оксидација може тећи на три начина:

1. Терминална или *ω*-оксидација са краја хидрофобне групе,

2. *β*-оксидација,

3. Оксидација ароматичног прстена.

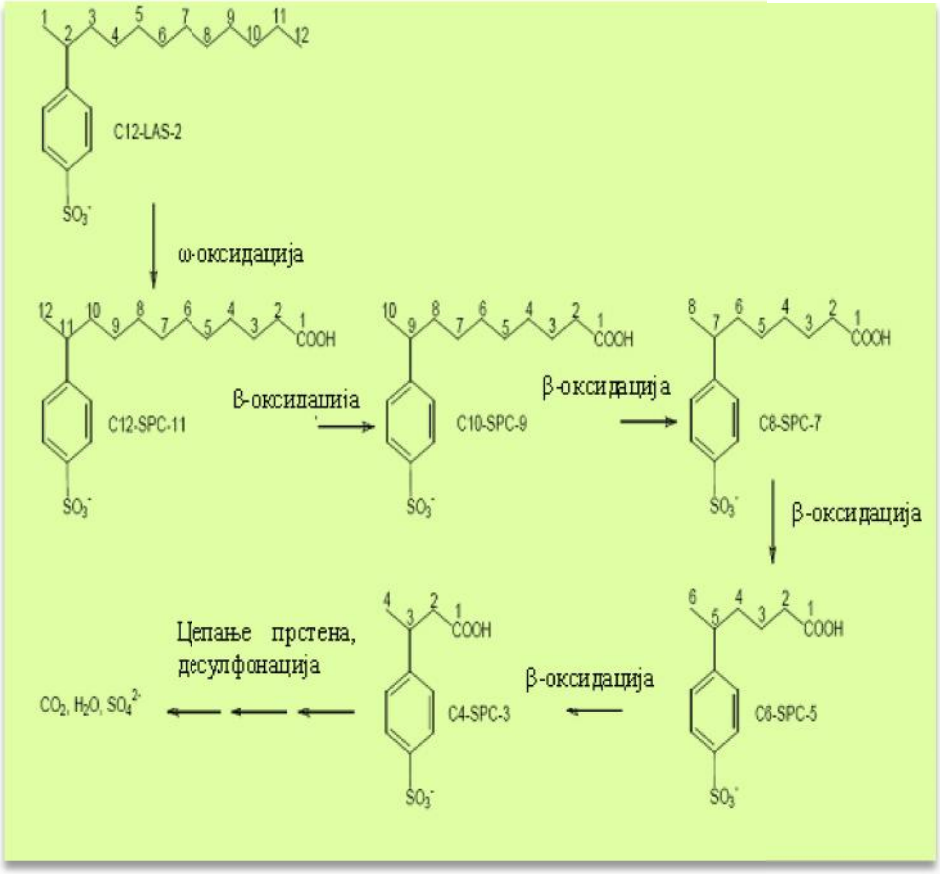
Биодеградацију LAS-а дејством микроорганизама су доказали Sawyer и Ryckman, 1957. године. Међутим, потпуне биодеградационе путање LAS-а, засноване на научним чињеницама, објашњене су много година након њиховог открића.

На брзину деградације комерцијалног LAS-а утиче структура молекула: дужина алкил ланца је у позитивној корелацији са степеном примарне биодеградације; фенол изомери у централном положају разлажу се много спорије у односу на изомере код којих је ова група на крају молекула (Setzkorn *и сар.*, 1964). Оба фактора су директна последица ензимског напада на хидрофобни део молекула. Однос између структуре PAS-е и биодеградације означен је као *"Swisher-ово правило даљине"*. Оно гласи: „повећање удаљености између ксенобиотичког арилсулфонатног дела молекула и хидрофобне групе повећава брзину примарне биодеградације" (Swisher, 1987).

Иницијална реакција биодеградације LAS-а у аеробним условима је *ω*-оксидација терминалне метил групе алкил ланца и стварање карбоксилне киселине. Деградација се наставља сукцесивним оксидативним скраћивањем алкил ланца одвајањем C_2 фрагмената (*β*-оксидација) (Huddleston и Allred, 1963; Swisher,1963, Divo и Cardini,1980, Swisher,1987, Schöberl, 1989, Steber и Berger. 1995). На овај начин настаје кратко-ланчана сулфофенил карбоксилна киселина, дужине од 4 до 5 C атома (Coon, 2005; Bengoechea *и сар.*, 2009). Овај интермедијент се даље деградира оксидацијом ароматичног прстена и издвајањем сулфонатне групе (Setzkorn и Huddleston, 1965; Swisher, 1967; León *и сар.*, 2002; Lara-Martín *и сар.*, 2006). Катаболити настављају да се оксидују и укључују се у централне метаболичке процесе: Кребсов циклус и глиоксалатни циклус (Schöberl, 1989; Sudip *и сар.*, 2002).

Такође, утврђено је да појединачне културе бактерија, нпр., *Pseudomonas* не могу да разграђују кратко-ланчану сулфофенил карбоксилну киселину (Leidner *и сар.*, 1976) за разлику од мешовитих култура бактерија: *Flavobacterium, Pseudomonas* и *Acinetobacter* (Gard-Terech и Palla, 1986). Отварање ароматичног прстена је ограничавајући фактор брзине потпуне биодеградације, након отварања прстена деградација се убрзава. За потпуну деградацију неопходно је присуство

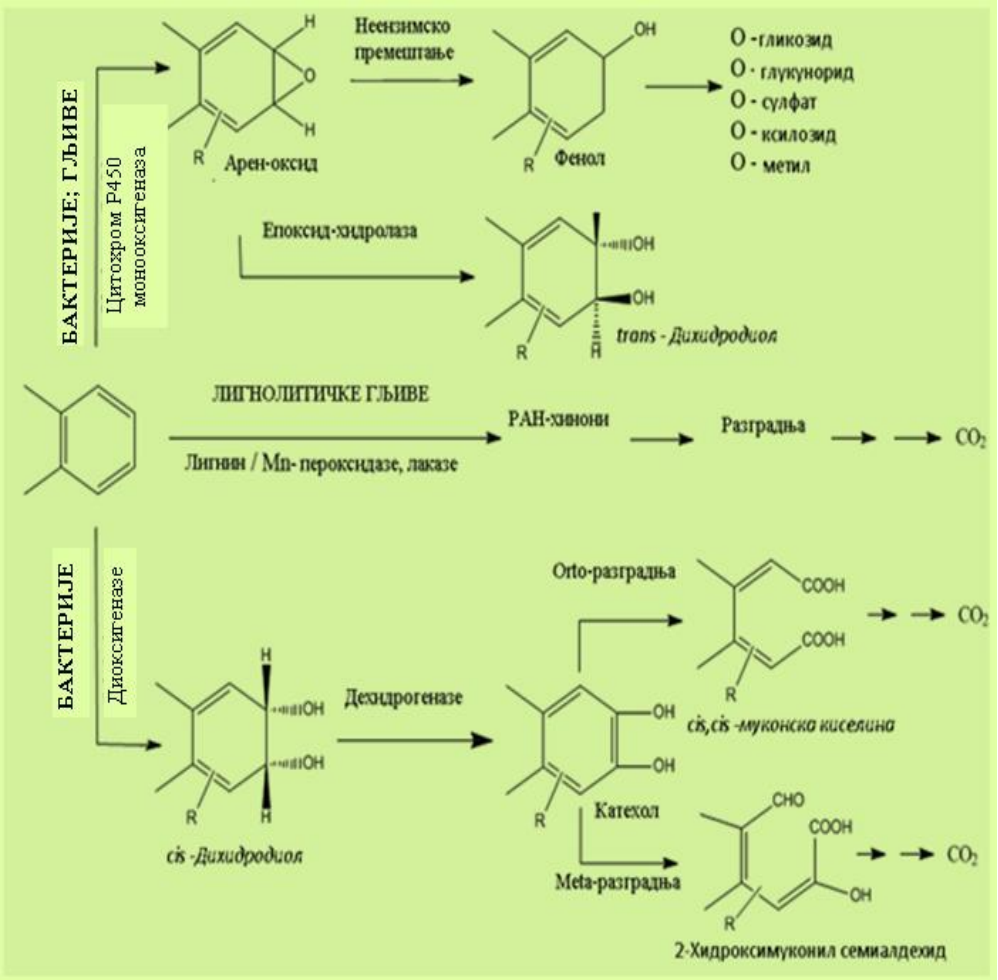
микробиолошке заједнице (Hrsák и Begonja, 1998; Schleheck *и сар.*, 2003c), чији су прелазни екстрацелуларни интермедијери веома разноврсни: сулфофенил карбоксилати (SPCs) (Schoberl, 1989), сулфофенил дикарбоксилати (SPdCs) (Di Corcia *и сар.*, 1999a; Dong *и сар.*, 2003) и *α,β*-незасићене SPCs (SPC-2H) (Eichhorn и Knepper, 2002; Schleheck *и сар.* 2003c). Прва чиста монокултура хетеротрофног организма (strain DS-1T) способна за деградацију LAS откривена је крајем 90-тих година (Hrsák и Begonja,1998; Schleheck *и сар.* 2000).



Шема. 3.2.3. Деградациона путања LAS-а

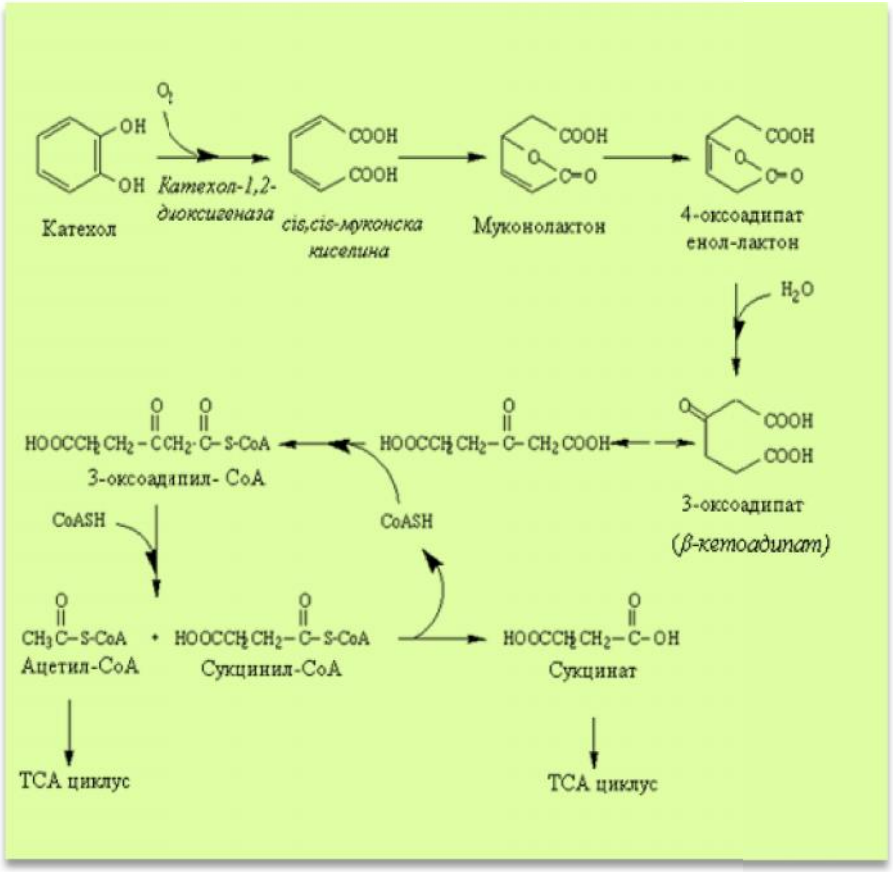
Систем за биодеградацију код микроорганизама организован је тако да се полазна једињења у већем броју периферних путања трансформишу до одређених централних међупродуката као што су: катехол, хомогентизат или протокахеут који се преводе до интермедијера TCA (Khomenkov *и сар.*, 2008; Beškoski *и сар.*, 2012; Gojgic-Cvijovic *и сар.*, 2012). Ензимским методама је показано да се реакције разлагања после отварања прстена одвијају преко катехола и његових деривата. Катехол је један од главних интермедијера у катаболизму ароматичних једињења.

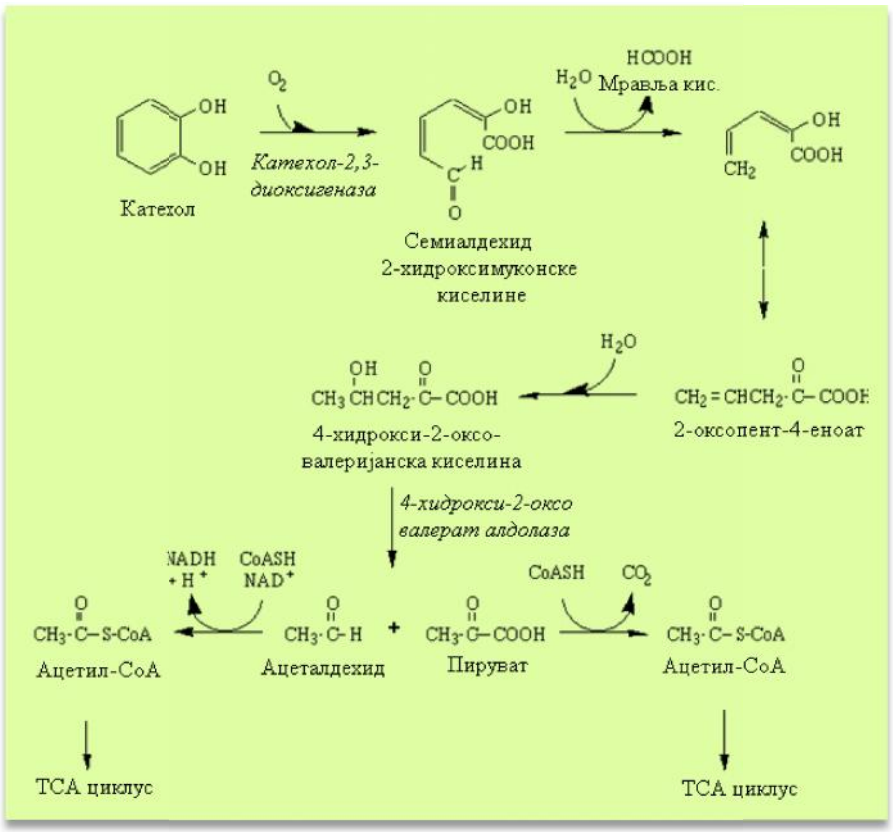
Код већине прокариота уграђивањем молекулског кисеоника помоћу диоксигеназа настаје најпре *cis*-дихидродиол, а потом катехол. Алтернативно, неки еукариоти као што су нелигнолитичке гљиве и неки прокариоти користе цитохром P450-монооксигеназу (Sekine *и сар.*, 2006; Funhoff *и сар.*, 2006). Гради се арен-диоксид, који се преводи у *trans*-дихидродиол пре грађења катехола.



Шема 3.2.4. Конверзија PAHs у катехол

Деградација катехола може се одвијати на два начина: *orto* разградњом, када се прстен отвара између два C-атома који носе OH групу и настаје *cis,cis*-муконска киселина, или *meta* разградњом, када се прстен отвара између хидроксилованог C-атома и суседног несатурисаног C-атома, при чему настаје семиалдехид муконске киселине (шема 3.2.5). Обе реакције су катализоване диоксигеназама. Наредне реакције деградације су различите али воде ка стварању интермедијената TCA (ацетата и сукцината) или супстрата који се лако конвертују у TCA интермедијенте (пируват и ацеталдехид) (Pakou *и сар.*, 2005; 2007; Khomenkov *и сар.*, 2008).





Шема 3.2.5. Механизми *orto* (горе) и *meta* (доле) разлагања катехола

Метаболизам алкил ланца краћег од 4 угљеника иницира је хидролизом или редуктивном десулфонацијом ароматичног прстена (Cain *и сар.,* 1971).

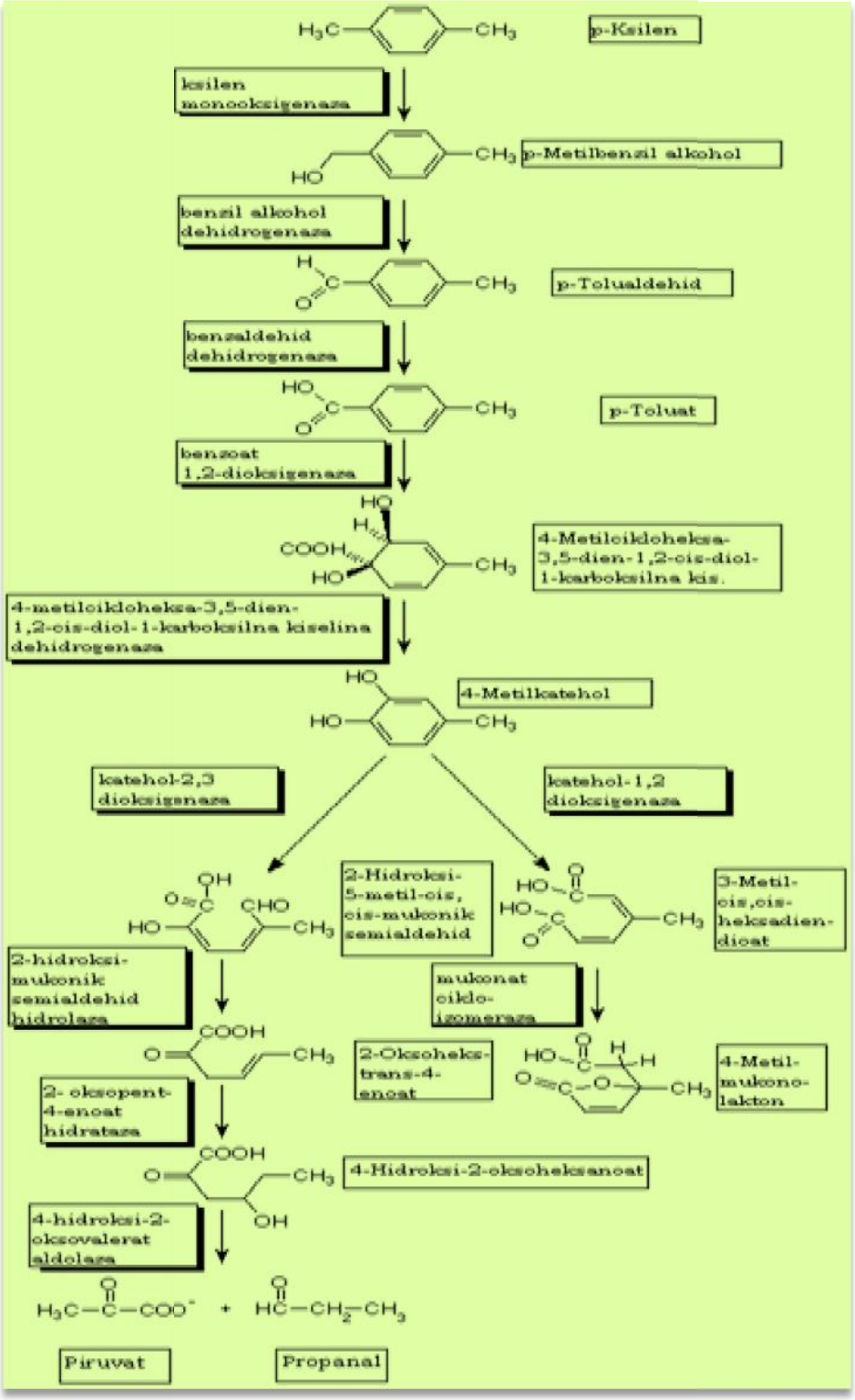
Врсте *Pseudomonas, Alcaligenes, Necromonas* и *Moraxella,* које су изоловане из активног муља и речне воде, разложиле су алкил ланац C_{12}-LAS, а група неидентификованих грам-негативних бактерија разложила је бензенов прстен. Смеша ове две групе микроорганизама потпуно је разложила LAS (Yoshimura *и сар.,* 1984b).

Сулфофенил карбоксилат настаје као инермедијент *β*-оксидације у чистим и мешовитим бактеријским културама на подлози са C_{12}-LAS2 и C_{12}-LAS3 (Хршак и Бегоња,1998; Dong *и сар.,* 2004). Механизам цепања овог интермедијента преко 4-сулфокатехола приказао је Schulc *и сар.,* (2000) и установио је да мешовите културе садрже високу концентрацију 4-сулфокатехол 1,2-диоксигеназе.

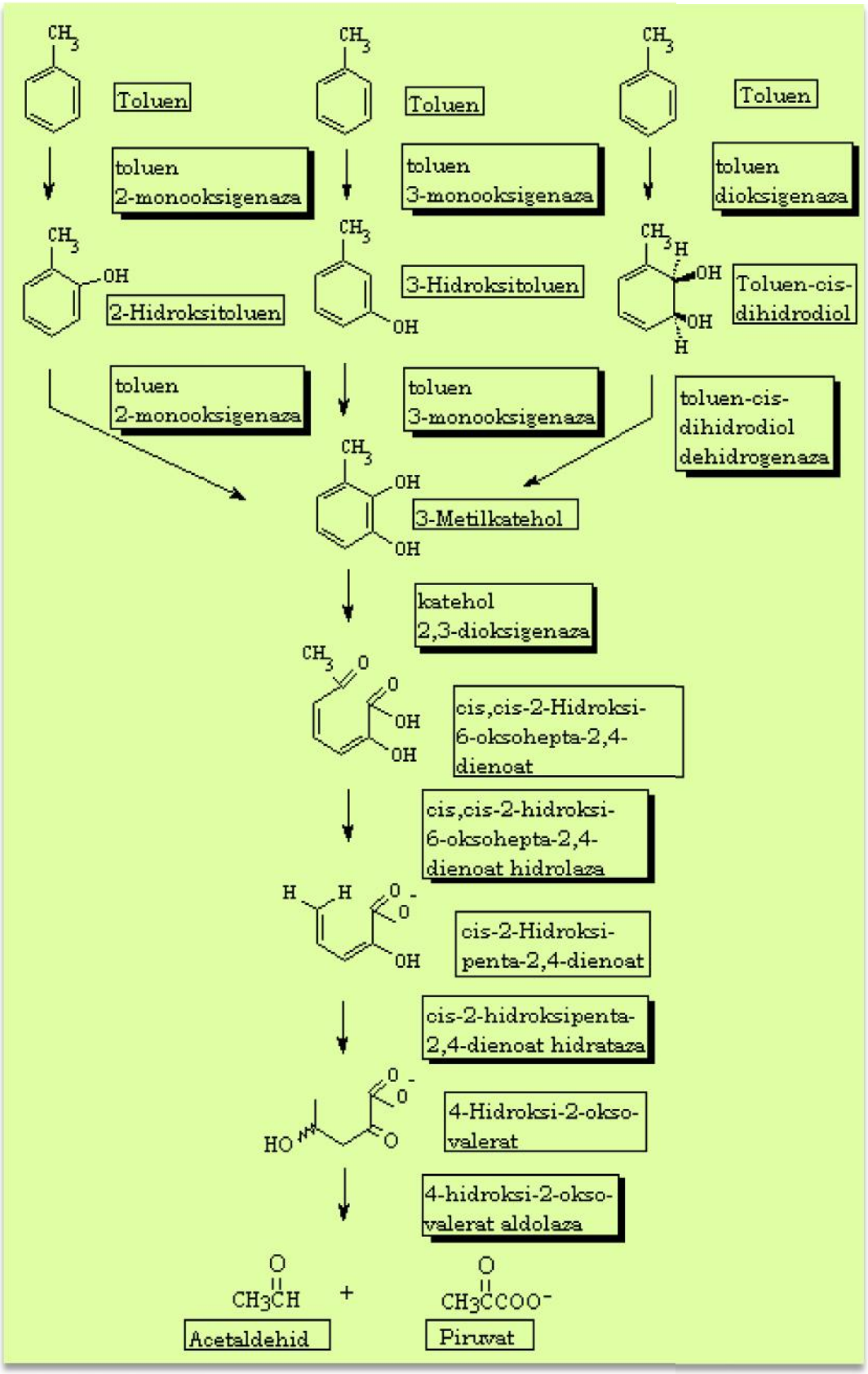
Сличну путању деградације има *p*-ксилен који се разлаже до 4-метилкатехола, а он је супстрат за деловање две диоксигеназе: *катехол 2,3-диоксигеназе* којом преко интермедијената настају пируват и пропанал, и *катехол 1,2-диоксигеназе* која доводи до стварања 4-метил-муконолактона (шема 3.2.6) (Wiegant и De Bont, 1980; Schick, 1987).

Толуен се разлаже до 3-метилкатехола као и *o*- и *m*- ксилени, а деловањем ензима *катехол 2,3-диоксигеназе* преко интермедијената настају пируват и ацеталдехид (шема 3.2.7) (Rubingh и Holli, 1991). Китагава (1956) је проучавајући механизме оксидације толуена у присуству бактерије *Pseudomonas putida* доказао да процес тече преко бензилалкохола, бензалдехида и бензоеве киселине до катехола. Врсте *Aspergillus niger, Rhodotorula graminis и Pseudomonas mendocina* успешно оксидују толуен до катехола преко инермедијената: 4-хидрокситолуена, 4-хидроксибензалдехида и 4-хидроксибензоеве киселине (Buestein и Hiliton, 1982). Harayama *и сар.,* (1999) су открили 5 различитих путања за деградацију толуена помоћу бактерија. Деградације толуена помоћу *P. putida* почиње увођењем 2 хидроксилне групе у толуен, и настаје *cis*-толуен дихидродиол, који се преводи у 3-метилкатехол. *P. mendocina* преводи толуен у крезол, дејством толуен 4-монооксигеназе, а затим се метил група крезола оксидује и настаје *p*-хидроксибензоат. *P. picketii* оксидује толуен помоћу толуен 3-монооксигеназе до *m*-

крезола, који се даље оксидује до 3-метилкатехола. *B. cepacia* претвара толуен у *o*-крезол дејством толуен 2-монооксигеназе, затим се овај интермедијент трансформише у 3-метилкатехол.

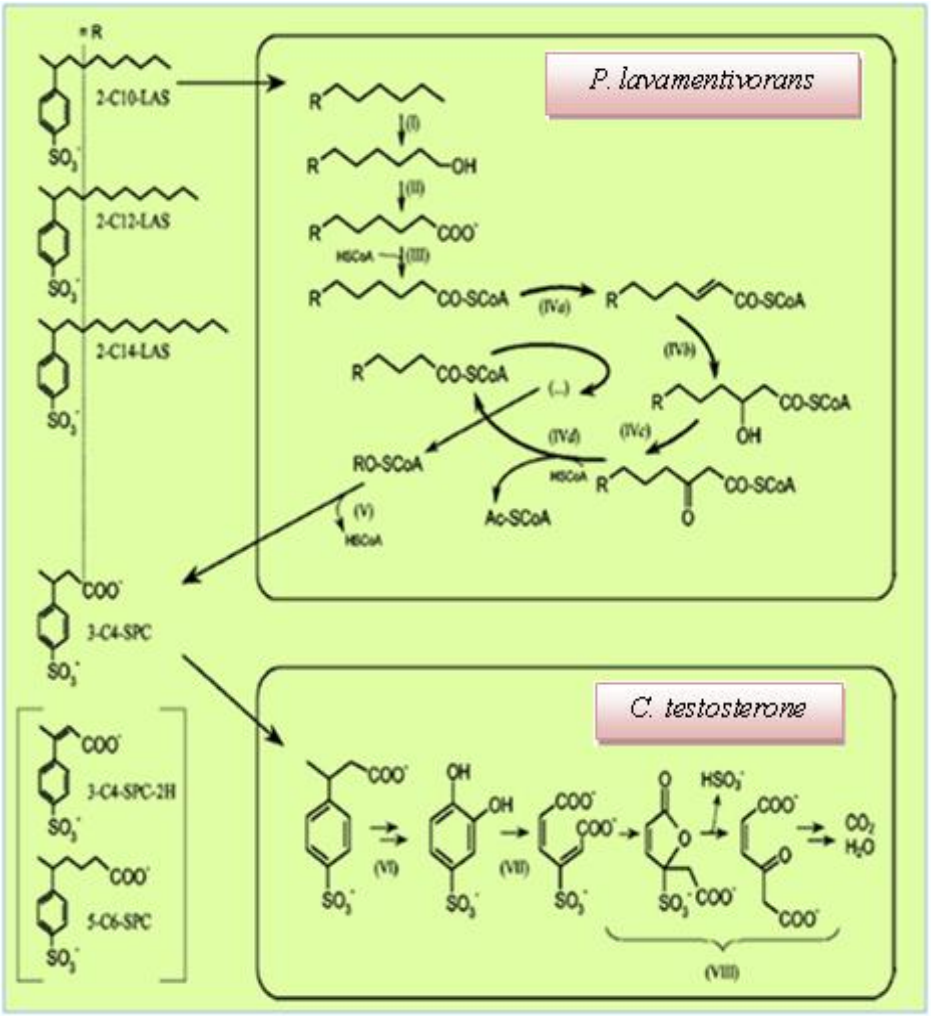


Шема 3.2.6. Путања деградације *p*-ксилена



Шема 3.2.7. Путања разлагања толуена

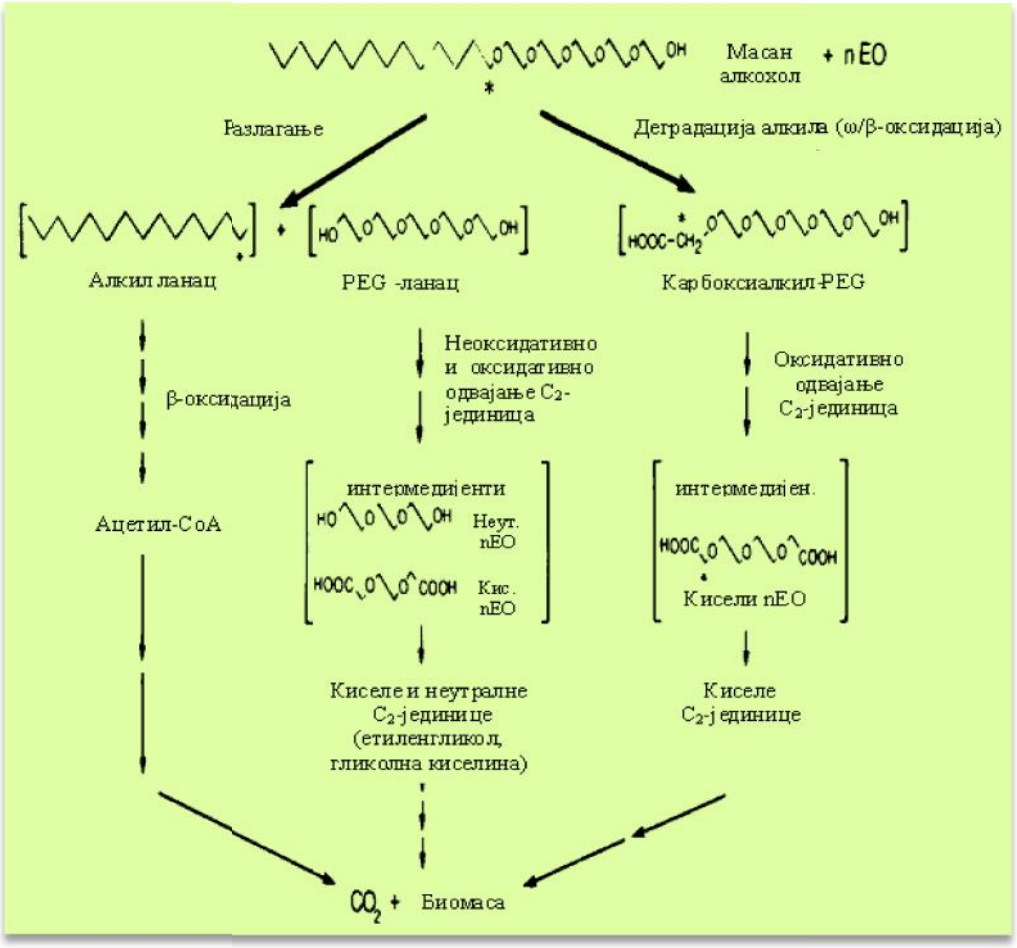
Schleheck *u cap.* (2004a) су дошли до открића да бактерија *Parvibaculum lavamentivorans*^{T} DS-1 катализује конверзију LAS изомера у око 50 сулфофенил карбоксилата. Поменути аутор је дао шему деградације LAS-а кометаболизмом 2 бактеријске врсте: *P. lavamentivorans* и *Comamonas testosterone* (шема 3.2.8). Деградацију започиње *P. lavamentivorans* *ω*-оксигенацијом (I) до алкохола, који се даље оксидује (II) до одговарајућег сулфофенолкарбоксилата; он се тиоестерификује (III) и подлеже спиралној *β*-оксидацији (IV*a*-IV*d*) повезаној са *α,β*-десатурацијом, адицијом воде, *β*-оксидацијом и *β*-кетотиолизом, до настанка 4-сулфофенил супституента. Затим следи тиоестарско цепање молекула (V) и екскреција. Врста *C. testosterone* наставља деградацију SPC која се оксигенише (реакција VI), вероватно преко 4-сулфофенола до 4-сулфокатехола; он подлеже *орто* разградњи (реакција VII) и деградацији до крајњих продуката: CO_2 и H_2O (реакција VIII).



Шема 3.2.8. Деградациона путања LAS-а дејством *P. lavamentivorans* и *C. testosterone*

3.2.3. Механизми биодеградације нејонских PAS-и

Линеарни алкохол полигликол етри (алкохол етоксилати) представљају економски најзначајнију групу нејонских тензида. Експериментални резултати проучавања биодеградације у системима за прераду отпадних вода показали су висок степен потпуне биодеградације ових тензида у животној средини. Patterson *и сар.*, (1970) су показали симултано деловање два различита процеса биодеградације: интрамолекулско цепање на алкил ланац и полиетилен гликолни ланац, и слично LAS-у, терминална оксидација алкил ланца (*ω*-оксидација) и постепено уклањање C_2 јединица (*β*-оксидација) (шема 3.2.9).



Шема 3.2.9. Могући начини деградације етоксилованих масних алкохола

Алкил ланац подлеже сукцесивној *β*-оксидацији до ацетил-CoA. Полиетилен гликолни ланац подлеже хидролитичком или оксидативном издвајању мономера C_2 јединица при чему настају неутрални и кисели интермедијенти који се разлажу до неутралних и киселих мономера: етилен гликола, гликолне киселине и димера:

диетилен гликола и дигликолне киселине (Patterson *и сар.*, 1970; Wickbold, 1972; Schoberl *и сар.*, 1981; Szymanski, 1984; Rodriguez *и сар*., 2005; Jurado *и сар*., 2007). Хидролитичким цепањем C_2 јединице из PEG ланца настаје етилен гликол, а оксидативним цепањем гликолна киселина (Wiegant и De Bont, 1980; Szymanski *и сар*., 2001; 2002). Етилен гликол може прећи у гликолну киселину оксидацијом. Marcomini *и сар*., (2000) су објаснили три различита механизма деградације етоксилованих алкохола:

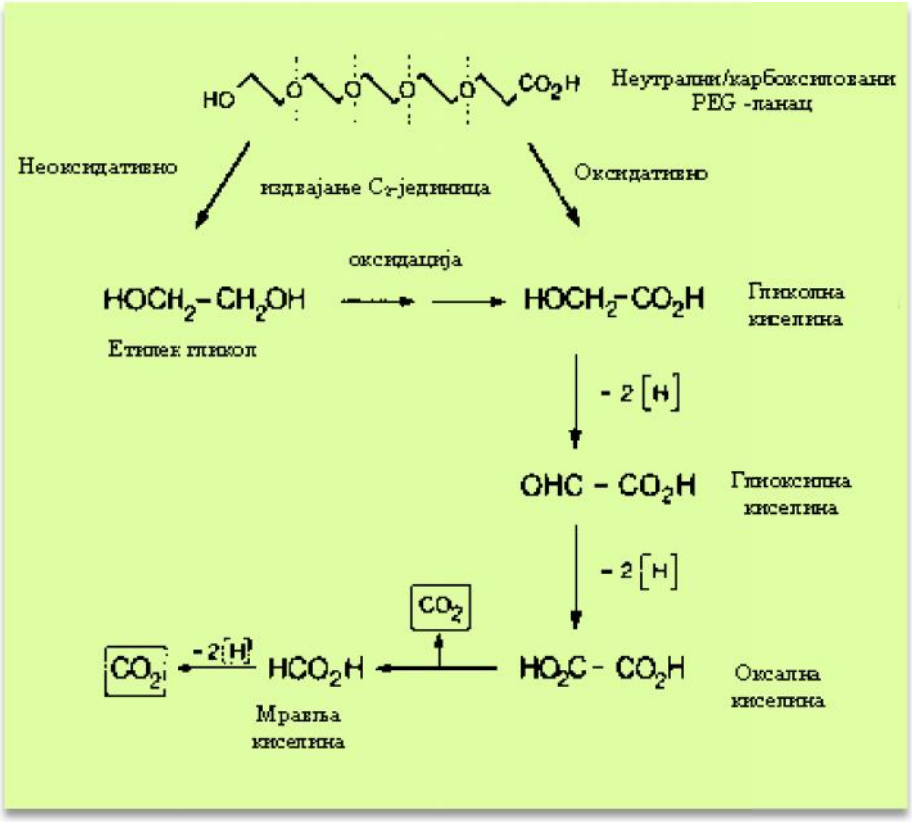
1. Централно цепање молекула (етра) које резултира стварањем масног алкохола и полиетилен гликола (PEG). Масан алкохол се даље трансформише до масних киселина *ω*-оксидацијом терминалног угљеника, а масне киселине се разлажу *β*-оксидацијом. PEG се разлаже неоксидативним скраћивањем ланца при чему се ослобађа једна гликолна јединица из терминалног PEG, или/и оксидативном хидролизом при чему настаје монокарбоксиловани PEG.

2. Микробиолошки напад на терминални угљеник алкил ланца *ω*-оксидацијом, након чега следи низ реакција *β*-оксидације. Овим механизмом алкохолни етоксилат се прво преводи у карбоксиловани алкохолни етоксилат (са карбоксилном групом у алкил ланцу) који се даље разлаже до монокарбоксилата и дикарбоксилованог PEG-а.

3. *ω*-оксидација терминалног угљеника у полиетоксиловани ланац. Овај механизам се одвија преко карбоксилованог алкохолног етоксилата (са карбоксилном групом у полиетоксилованом ланцу), а он се разлаже до дикарбоксилованог етоксилованог алкохола и дикарбоксилованог PEG-а.

Вишегодишња истраживања објаснила су везу између механизма биодеградације и структуре АЕ (Marcomini *и сар.*, 2000a; 2000b; Szymański *и сар*., 2001; 2002). PEG је идентификован као производ деградације само линеарног АЕ и оксо-АЕ (састављен од линеарног АЕ и једногранатог АЕ са кратким 2-алкил ланцем, нпр, 2-метил-, 2-етил-, 2-пропил- и 2-бутил-), док је карбоксиловани АЕ (са карбоксилном групом у полиетоксилном ланцу) идентификован једино за време биодеградације вишегранатог АЕ. Одсуство карбоксилованог АЕ у експерименту са линеарним и једногранатим (2-алкил гранатим) оксо-АЕ указује да централно цепање (механизам 1) представља примарни механизам за биодеградацију линерних и вишегранатих АЕ у испитиваној комерцијаној смеши, док се вишегранати АЕ разлаже *ω*-оксидацијом полиетоксилованог ланца (механизам 3)(Marcomini *и сар.*, 2000a).

Биодеградација оксо-2-бутил супституената АЕ доводи до стварања карбоксилованог АЕ, што указује да је *ω*-оксидација алкил ланца примарни механизам (механизам 2). Добијени резултати са 2-бутил-супституентима АЕ су показали да *ω*-оксидација замењује *β*-оксидацију када се у 2-алкил ланцу налази више од 3 атома угљеника (Marcomini *и сар*, 2000b; Rodriguez *и сар*., 2005; Federle и Itrich, 2006).



Шема 3.2.10. Деградација полиетилен гликолног ланца

Карбоксиалкил-PEG подлеже оксидативном издвајању C_2 јединица и преко настанка киселих интермедијената долази до стварања киселих C_2 јединица (Marcomini *и сар*., 2000a; 2000b; 2000c; Szymański *и сар*., 2001; 2002; Rodriguez *и сар*., 2005; Jurado *и сар*., 2007). Мономери се потпуно разлажу преко оксидативног циклуса дикарбонских киселина, глицератног циклуса или оба циклуса. Као крајњи продукти минерализације идентификоване су *глиоксална*, *мравља* и *оксална киселина* (шема 3.2.10). Оксал ацетат може настати као оксидациони производ ацеталдехида насталог дирекном деполимеризацијом PEG или дехидратацијом етилен гликола. *Сирћетна киселина* и *етилен гликол* и њихови оксидациони производи: *гликолна*, *глиоксална* и *оксална киселина* представљају финалне продукте биодеградације. Постојање синтетичког глицератног циклуса у микробиолошкој биоценози указује да се

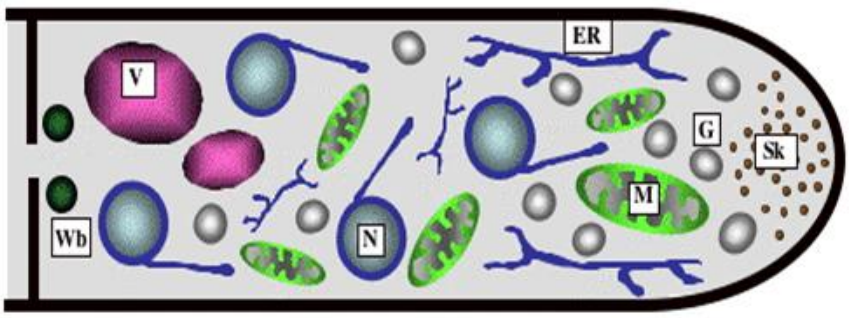
хидролизом протеина из биомасе добијају аминокиселине које се синтетишу из овог циклуса: *серин*, *глицин*, *леуцин*, *лизин* и *ароматичне аминокиселине*.

3.3. Одлике филаментозних гљива

3.3.1. Анатомско-морфолошке одлике филаментозних гљива

Гљиве су издвојене у посебно царство - Fungi, јер имају неколико особина по којима се разликују од осталих живих бића. Оне имају филаментозно разгранат систем ћелија са апикалним растом, бочним гранањем и хетеротрофном исхраном. Имају карактеристичан животни циклус који почиње клијањем споре, након тога следи период раста искоришћавањем супстрата и продукција биомасе. На крају долази период спорулације, образују се споре које се расејавају са родитељског мицелијума.

Основна јединица грађе филаментозних гљива је хифа (шема 3.3.1). То је тубуларна ћелија која је окружена чврстим, хитинским ћелијским зидом. Ћелијски зид одваја гљиву, физички и функционално, од спољашње средине. Он има улогу заштитног омотача и даје ћелији морфологију, али је истовремено и кључно место за размену и филтрацију јона и протеина у метаболизму (разградњи и синтези) сложених органских једињења.



V-вакуоле, N-језгро, ER-Ендоплазматични ретикулум, M-митохондрије,
G-Голџијев апарат, Sk-секреторне везикуле, Wb-Воронинова тела

Шема 3.3.1. Грађа хифе

Ћелијски зид је изграђен од различитих компонената. Он садржи фибриларне молекуле повезане функционалним групама: шећере, протеине, липиде и различите полисахариде. Док су фибриларне материје углавном инертне, састав везивног

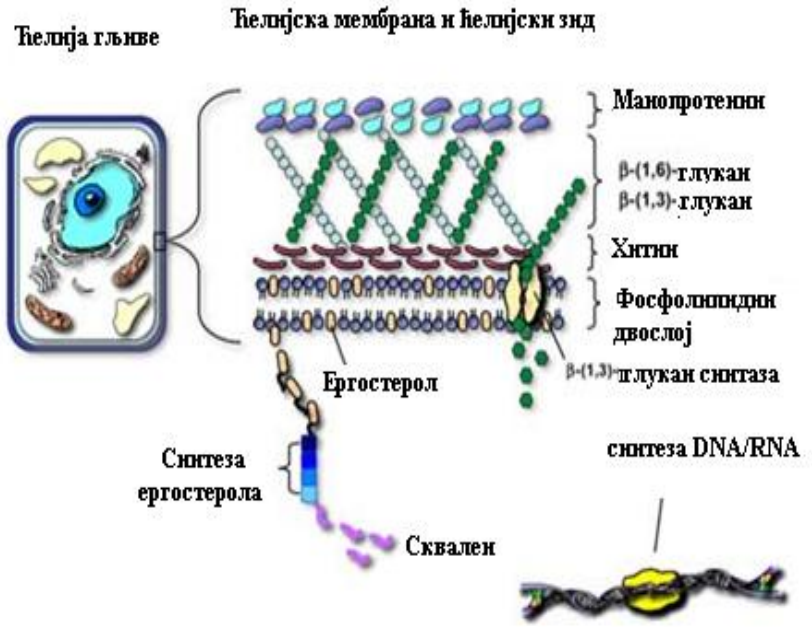
материјала временом се мења. Функционалне компоненте су важне за транспорт хранљивих материја, метаболизам непермеабилног супстрата и модификацију ћелијског зида.

Приближно 80% градивног материјала ћелијског зида чине полисахариди. Већина гљива има фибриларну структуру састављену од хитина, хитозана (само *Zygomycota*), *β*-глукана и различитих хетерополисахарида. Фибриле су урођене у сложен желатинозни матрикс. Протеини имају мали удео у грађи ћелијског зида, ретко он прелази 20%, најчешће су то гликопротеини. Немају сви протеини структурну улогу. Спајање, препознавање, модификацију и исхрану обављају специфични протеини везани у ћелијском зиду. Липиди су у грађи ћелијског зида заступљени у веома малом проценту. Липиди и воскови су распоређени дужином хидрофобног дела зида и функционишу у контроли прекомерног одавања воде, штитећи тако ћелије од исушивања. Зид садржи и низ других компонената које су заступљене у траговима, укључујући пигменте и соли (шема 3.3.2).

Ћелије гљива као и ћелије сисара садрже ћелијску мембрану која даје структуру ћелији и има значајну улогу у деоби и метаболизму. Сложени молекули липида, тзв. стероли, чине око 25% тежине ћелијске мембране. Док ћелије сисара у ћелијској мембрани садрже првенствено холестерол, ергостерол је доминантан стерол у многим патогеним гљивама. Ова разлика у саставу стерола искоришћена је као мета дејства антигљивичних лекова као нпр., полиена, азола и алиламина, за лечење површинских и инвазивних гљивичних инфекција.

Тубуле (цевчице) су најчешће подељене преградама у одељке. Преграда је означена као септум и она је непотпуна у раној фази живота хифе. Елонгација хифе се одвија на врху. Механизам који доводи до издуживања хифе јој увек није детаљно проучен и објашњен. Међутим, тургоров притисак се сматра покретачком снагом тог механизма и он се налази под контролом цитоскелета.

Конституенти ћелијског зида се синтетишу у цитоплазми, полимеризују се и повезују у зидни матрикс. Хитин и глукани се синтетишу у плазмамембрани у присуству ензима који су саставни део мембране. Прекурзори нуклеотидних шећера налазе се у цитоплазми, повезују се и уграђују у ћелијски зид. Зидни гликопротеини се синтетишу у ендоплазматичном ретикулуму, преносе се посредством Голџијевог апарата у плазмалему, где се из секреторних везикула ослобађају и уграђују у зид.



Шема 3.3.2. Структура ћелијске мембране и ћелијског зида гљива

Митохондрије имају двоструку мембрану и сложену унутрашњу структуру. Разликују се од осталих еукариотских организама по облику, више су издужене, орјентисане су у правцу уздужне осе хифе. У њима се одвијају најзначајнији метаболички процеси: Кребсов циклус, катаболизам масних киселина и липида, фосфорилација, трансформација амина, итд.

Гљиве се одликују присуством вакуола лоптастог до тубуларног облика. Тубуларне вакуоле се крећу дуж хифе, пролазе кроз поре преграда које међусобно повезују талус. Тубуларне вакуоле су откривене релативно скоро. Највише их има у вршном делу хифе. Крећу се различитом брзином у различитим правцима у - или од врха хифе. Вакуоле имају неколико улога. Могу учествовати у транспорту, складиштењу и рециклирању. Садрже резервне ензиме, макромолекуле, липиде, минералне материје као што су полифосфати и разне токсине. Контрола pH и хомеостаза јона су такође у њиховој надлежности. Приликом раста хифе компоненте ћелијског зида створене у вакуолама доспевају у врх хифе. У исто време, ензими за екстрацелуларно разлагање транспортују се од EPR-а до врха, а продукти разлагања се транспортују од врха до остатка талуса, укључујући градивне молекуле.

Филаментозне гљиве садрже инклузије сферног облика тзв. Воронинова тела. Оне су величине од 0,1 до 1 mm. Садрже протеине који су окружени мембраном.

Њихова улога није сасвим позната, претпоставља се да блокирају поре након оштећења одељака и штите садржај ћелије.

Везикуле означене као ломасоми (*lomasomi*) налазе се између плазмамембране и ћелијског зида. Њихова улога такође није сасвим јасна. Претпоставља се да имају улогу у синтези полимера и екскрецији јер су увек лоциране у зони активног издуживања хифе (елонгације).

3.3.2. Преглед биохемијских карактеристика гљива

Изоловане врсте гљива које су одабране као тест организми у овом истраживању, познате су по продукцији великог броја примарних и секундарних метаболита (табела 3.3.2.1. до 3.3.2.5).

Табела 3.3.2.1. Приказ примарних и секундарних метаболита ***T. harzianum***

Органске киселине	Ензими	Остало
Млечна киселина	Ксиланазе	6-пентил-α-пирон
Фумарна киселина	Хитиназа	γ-декалактон
Малонска киселина	β-1,3-глуканаза	
Линолеинска киселина	β-гликозидаза	
	Целулаза	
	Амилаза	
	Липаза	
	Протеазе	
	N-ацетилглукозоаминидазе	
	Гликолат дехидрогеназа	

Табела 3.3.2.2. Приказ примарних и секундарних метаболита ***A. niger***

Органске киселине	Ензими	Остало
Лимунска киселина	Амилазе	Jawaherene
Глуконска киселина	Амилоглукозидазе	(антибиотик)
Оксалну киселина	Каталазе	Аспергилин
Л-аскорбинска киселина	Гликозо-оксидазе	Асперенон
Л-ксилоаскорбинска	β-глукозидазе	Аурасперон А
киселина	Липазе	Асперазин
Олеинска киселина и	Танасе	Флавосперон
несатурисане масне киселине	Лауроил естераза	(asperxantone)
	Егзо- и ендоглуканаза	Асперубиол
	Ендо- и егзополигарактуроназе	Сидерамин
	Ксиланаза	Изомалтоза
	β-манозидаза	Којибиоза
	β-ксилозидаза	Малформин
	α- и β-галактозидазе	Ниграгилин
	Ендо- и егзоарабиназа	Ферихром
	Арабинофуранозидаза	Леуцин
	Фитаза	Валин
	Маназа	Лизин
	Пектин лиазе	Фенилаланин
	Пектат лиазе	
	Целобиохидролазе	

Табела 3.3.2.3. Приказ примарних и секундарних метаболита ***M. racemosus***

Органске киселине	Ензими	Остало
Млечна киселина	Пектиназа	Етанол
	Липаза	Хитозан
	Амилаза	
	Протеазе	
	В-гликозидаза	
	Фитаза	

Табела 3.3.2.4. Приказ примарних и секундарних метаболита ***P. chrysogenum***

Органске киселине	Ензими	Остало
Лимунска киселина	6-фосфат-дехидрогеназа	2-октен-1-ол
Глуконска киселина	Глукозо оксидаза	2-пирувил аминобентамид
Глутаминска киселина	Каталаза	3-октанол,3-метилбутанол
α-кетоглутарна киселина	Глутатион редуктаза	стеарил алкохол
α-метил-*n*-бутерна киселина	Лизофосфолипазе	Рибофлавин-α-глукозид
D-et-L-галактуронска киселина	Фосфодиестеразе и моноестеразе	Сорбицилин
Индол-3-сирћетна киселина	Рибонуклеазе	Солбицилактон А
Којична киселина	Пектиназе	Триходермин
Галактаринска киселина	Полигалакторуназе	Ксантоцилин
Пектинска киселина	ЕМП циклуса	Пирокалциферол
	Сулфатаденил трансферазе	Липиди
	Пектин метилестеразе	Афлатоксини B1и B2
	Малат дехидрогеназа	Алкалоид микотоксини
		Пеницилин
		Цефалоспорин
		Негапилин
		Рокефортин С
		Мелеагрин
		6-аминопеницилинска киселина
		Фузиген
		Хризогенин
		Церебрин
		Фунгистерол
		Детиобиотин
		Аланин
		Цистеин
		Валин

Табела 3.3.2.5. Приказ примарних и секундарних метаболита ***P. cyclopium***

Органске киселине	Ензими	Остало
Лимунска киселина	Триацилглицелор липаза	Етилен
Уронска киселина	Глицерид хидролаза	Конидиогенол
	Циклопептин систетаза	Конидиогенон
	Циклопенин *m*-хидролаза	Циклопенин
	B-циклопиазонат оксидоциклаза	Циклопенол
	Каталаза	Пеницилинска киселина
	Кисела протеиназа	Циклопиазонска киселина
	B-гликозидаза	Пубелурна киселина
	Пектиназа	Пубелуронска киселина
	Ксиланаза	Хуминска киселина
	Егзо- и ендоинулиназа	Фулвинска киселина
	Антранилат аденилилтрансфераза	
	Фенилаланин аденилилтрансфераза	

4.МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Огледи су изведени у лабораторији за Микробиологију и Биохемију у Институту за биологију и екологију, и у лабораторији за Биохемију у Институту за Хемију, Природно-математичког факултета у Крагујевцу, у периоду од 2010-2012 године. Квалитативни и квантитативни састав аминокиселина урађен је у лабораторији Соја протеин у Бечеју.

4.1. Микробиолошке и миколошке методе

4.1.1. Узорковање гљива из отпадних вода

За потребе истраживања сакупљене су гљиве које живе у отпадним водама које садрже детерџенте. Узети су узорци отпадних канализационих вода из домаћинстава и отпадних вода фабрике за производње детерџента (Хенкел, Крушевац), са три различита локалитета и из слива три реке, крајем маја 2010. године:

1. Из речног корита **Лепенице** (Крагујевац) на месту изливања канализационих отпадних вода у реку, у насељу Шест топола.
2. Из речног корита **Расине** (Крушевац), на месту изливања индустријских отпадних вода фабрике Хенкел у реку.
3. Из речног корита **Западне Мораве** (Чачак) на месту изливања канализационих отпадних вода у реку.

Узорци отпадних вода са мешовитим културама микроорганизама узети су стерилним стакленим боцама и пренети у микробиолошку лабораторију у којој су чувани у фрижидеру на 4°C.

4.1.2. Изоловање монокултура и идентификација гљива

У периоду од 24 h узорци су засејани на хранљивој подлози PDA са стрептомицином који спречава раст бактерија. pH подлоге је подешавана на 6,5-6,8 додавањем раствора 1 mol L^{-1} NaOH и 1 mol L^{-1} HCl. Реизолација култура гљива вршена је на стерилисаном PDA без стрептомицина. Реизоловане културе гљива идентификоване су на катедри за Алгологију, микологију и лихенологију, у Институту за биологију и екологију ПМФ-а у Крагујевцу, на основу морфолошких карактеристика и применом систематског кључа. Гљиве су одржаване на косом PDA, чуване на 4°C±0.5°C и пресејаване месечно у стерилним условима.

4.1.3. Припрема инокулума

Инокулум је припремљен гајењем изолованих гљива на косом PDA на собној температури (28 °C ± 3 °C) до спорулације (5-7 дана). У сваку епрувету додато је 10 mL стерилне дестиловане воде, епрувете су благо промешане да би се добила хомогена смеша спора. Број спора је одређен методом микроскопирања помоћу Noebauer-ове коморе на хемоцитометру. Вредност инокулума је 1×10^6 спора mL^{-1}.

4.1.4. Припрема течних хранљивих подлога за ферментацију

За потребе експеримента гљиве су гајене у стерилној Czapek Dox's (у даљем тексту Чапекову) течној хранљивој подлози модификованог хемијског састава (Табела 4.2.1.):

Табела 4.1. Састав течних хранљивих подлога у 1000 mL дестиловане воде

Хранљива подлога	**Ознака**	c / g dm^{-3}					
		$NaNO_3$	K_2HPO_4	$MgSO_4 x7H_2O$	$FeSO_4 x7H_2O$	Сахароза	Детерџент*
Контрола	К	3	1	0.5	0.01	30	-
К + 0.3% детерџент	Д3	3	1	0.5	0.01	30	3
К + 0.5% детерџент	Д5	3	1	0.5	0.01	30	5

*Мерикс, Хенкел, Крушевац

pH вредност свих течних хранљивих подлога је подешена на 4.70 са 1 mol L^{-1} HCl, а након тога је у подлоге са ознакама Д3, нкД3, Д5 и нкД5 додат детерџент и поново је измерена pH вредност подлога са детерџентом.

Течне хранљиве подлоге запремине 200 mL сипане су у Ерленмајер боце од 250 mL. Боце су затворене затварачима од газе и вате, покривени алуминијумском фолијом и стерилисане у аутоклаву на 121°C/20 min (0,14 MPa).

4.1.5.Инокулација течних подлога

Након хлађена стерилних течних подлога на собној температури извршена је инокулација течних подлога са 1 mL суспензије спора (припремљеног инокулума) у стерилним условима.

4.2. Физичко-хемијске и хемијске методе

4.2.1. Постављање експеримента и узорковање

У експерименту су постављена по 5 ерленмајера за сваку врсту гљиве: један без детерџента са спорама гљиве (позитивна контрола - К), две тест боце са детерџентом концентрација 0,3% и 0,5%, инокулисане спорама гљиве (ознаке Д3 и Д5), и две негативне контроле (абиотичке) са детерџентом концентрације 0,3% и 0,5% без спора (нкД3 и нкД5).

Ерленмајер боце су постављене на електичну тресилицу марке Кинетор-*m* која је подешена на 250 обртаја у минути током огледног периода од 16 дана, на собној температури, у условима алтернативне светлости. Узорковање је почело 3. дана и настављено 6., 9., 12. и 16. дана када је експеримент прекинут.

4.2.2. Припрема узорака за анализе

Након узимања узорака, узето је по 10 mL ферментационе течности из сваког ерленмајера за мерење pH вредности и редокс потенцијала, а затим су из остатка ферментационе течности уклоњени мицелијуми гљива филтрирањем кроз филтер папир Whatman No. 1. Мицелијуми су у експерименту коришћени за одређивање тежине суве биомасе. Ферментациона течност (филтрат) је центрифугирана на 10,000 обртаја/10 min (+4^{o}C) да би се уклонили трагови мицелијума и издвојени супернатант је коришћен као сирови ензимски екстракт. Из добијеног екстракта одређивани су следећи физичко-хемијски и биохемијски параметри: концентрација слободних и укупних органских киселина, концентрација протеина, квалитативно и квантитативно одређивање аминокиселина, одређивање степена биодеградације тестираног детерџента (анјонских конпоненти), активности алкалне и киселе инвертазе, алкалне протеазе, алкалне фосфатазе, фосфорилазе и активност нуклеаза (DNaza и RNaza).

4.2.3. Мерење pH вредности и редокс потенцијала

Мерење pH вредности ферментационе течности и редокс потенцијала вршено је помоћу дигиталног електричног pH метра (PHS-3BW Microprocessor pH/mV/Temperature Meter) тип Банте (Bante) са референтном платинастом електродом Ag/AgCl/3 mol kg^{-1} KCl (модел 65-1). Вредности су очитаване непосредно пре инокулације течних подлога спорама (0. дана), и у различитим фазама развоја мицелије: 3., 6., 9., 12. и 16. дана. Вредности редокс потенцијала су изражене у mV, и

израчунате су применом следеће формуле: $E = E_{ems} + E_{ref}$, где је E_{ref} – потенцијал референтне електроде (+210 mV, на 25°C), E_{ems} – измерени потенцијал.

4.2.4. Одређивање концентрације слободних и укупних органских киселина

Реагенси

Концентровани етанол, активни угаљ, 0,1 mol L^{-1} NaOH, HCl, фенолфталеин, 4 mol L^{-1} NH_4OH, катјонске и анјонске смоле Amberlite IR-120.

Протокол

Да би се одредила концентрација органских киселина присутних у ферментационој течности потребно је припремити алкохолни екстракт. Отпипетирати 10 mL течне хранљиве подлоге и додати 50 mL концентрованог етанола, смешу миксирати док не постане хомогена. Екстракт се потом пребаци у ерленмајер и инкубира у воденом купатилу на 70°C/60-90 min. Након инкубације, алкохолни екстракт се профилтрира кроз гуч 6-3 или 6-4, гуч се испира 2-3 пута са по 10 mL дестиловане воде. Екстракт се концентрује до запремине 40-50 mL упаравањем на температури 50-60°C, под притиском од 25 mm Hg. Концентровани екстракт се пребаци у нормални суд од 100 mL у који се претходно сипа 1-2 кашичице активног угља. Упарени алкохолни екстракт се поново инкубира у воденом купатилу на 70°C/30-40 min. Након инкубације алкохолни екстракт се профилтрира кроз филтер папир са плавом траком у нормални суд од 100 mL, а активни угаљ се испира дестилованом водом све док се нормални суд не допуни до 100 mL (до ознаке на суду).

За одређивање концентрације слободних органских киселина потребно је отпипетирати 10 mL екстракта у посебан ерленмајер, додати 2-3 капи фенолфталеина и вршити титрацију са 0,1 mol L^{-1} NaOH до појаве ружичасте боје. На основу количине утрошеног 0,1 mol L^{-1} NaOH израчунава се количина слободних органских киселина у екстракту.

Преостала запремина екстракта (90 mL) пропушта се кроз активирану катјонску јоноизмењивачку колону и хвата у нормални суд запремине 250 mL. Испирањем смоле дестилованом водом нормални суд се допуни до ознаке. Кроз

катјонску колону пролазе органске киселине и угљени хидрати а на смоли остају везане аминокиселине.

Да би се одредила концентрације укупних органских киселина потребно је отпипетирати 25 mL екстракта из нормалног суда, додати 2-3 капи фенолфталеина и вршити титрацију са 0,1 mol L^{-1} NaOH до појаве ружичасте боје. На основу количине утрошеног 0,1 mol L^{-1} NaOH израчунава се количина укупних органских киселина у екстракту.

Аминокиселине које су остале везане на катјонској смоли елуирају се са 4 mol L^{-1} NH_4OH до алкалне реакције, тј до појаве плаве боје на индикатору. Добијени елуат се концентрује под сниженим притиском на *t*=60°C до запремине 1-2 mL.

4.2.5. Одређивање концентрације протеина

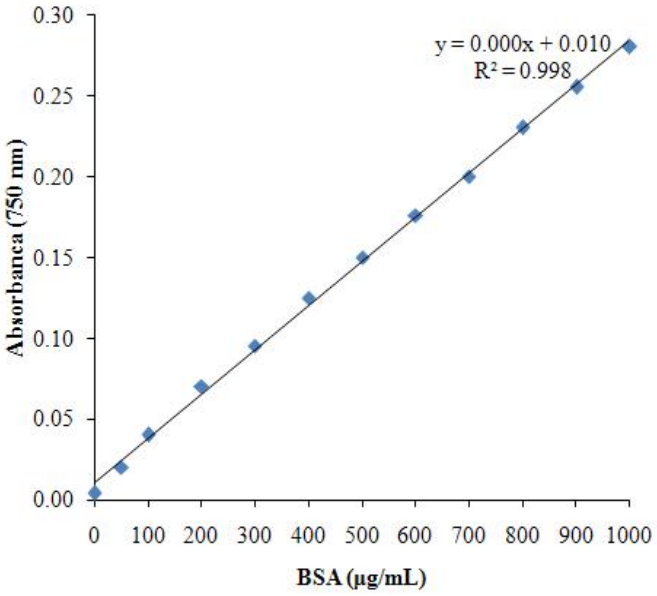
Реагенси

1% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 2% калијум натријум тартарат, 2% Na_2CO_3, 0.1 mol L^{-1} NaOH, Folin-Ciocalteu, стандард протеина (BSA) (Sigma Chemical, St. Louis, MO).

Протокол

Укупна концентрација протеина у ферментационој течности гљива одређена је методом по Lowry-jy. Потребно је припремити алкални реагенс који садржи 2% (w/v) Na_2CO_3 растворен у 0,1 mol L^{-1} NaOH, 1% (w/v) $CuSO_4 \times 5\ H_2O$ и 2% (w/v) раствор K-Na-тартарата. У једну епрувету (проба) отпипетира се 0,2 mL ферментационе течности и дода се 3 mL припремљеног алкалног реагенса. У другу епрувету (контрола) додаје се 0,2 mL дестиловане воде и 3 mL алкалног реагенса. Обе епрувете се промешају и оставе на собној t^oC/15 min. Након тога у епрувете се додаје 0,6 mL Folin-Ciocalteu реагенса (разблажен у дестилованој води у односу 1:2). Епрувете се поново промешају и оставе на собној t^oC/30 min. Концентрација протеина у узорку одређује се спектрофотометријски очитавањем апсорбанце на 750 nm. За конструисање стандардне криве користи се стандардни раствор бовин серум албумина (BSA) концентрације 1 mg mL^{-1}. У девет епрувета отпипетирати 0,10, 0,20, 0,30, 0,40, 0,50, 0,60, 0,70, 0,85, и 1 mL стандардног раствора и епрувете допунити до

1 mL дестилованом водом. Једна епрувета са дестилованом водом служи као бланк стандарда. Даљи поступак је исти као за одређивање концентрације протеина у узорку. Након конструисања стандардне криве за BSA, у графикон унети добијене вредности апсорбанце и израчунати количину протеина у узорку из једначине регресионе праве.



Графикон 4.2.5. Стандардна крива за протеин (BSA)

4.2.6. Одређивање садржаја аминокиселина у ферментационој течности

Аминокиселински садржај ферментационе течности гљива у контролној подлози и подлози са детерџентом анализиран је на крају експерименталног периода (16. дана), јонском хроматографском методом, у Лабораторији Сојапротеин, Бечеј.

Јонски хроматограф са електрохемијским детектором ISC 5000, (Termo Scientific), са сребрном референтном електродом (Ag/AgCl) и златном (Au) радном електродом. Колона Dionex AminoPac PA10 (2x250 mm) и предколона AminoPac PA10 guard (2x50 mm).

Узорци су припремљени по процедури која је претходно описана, и пре анализе су профилтрирани кроз мембрански филтер 0,2 µm.

Програм методе:

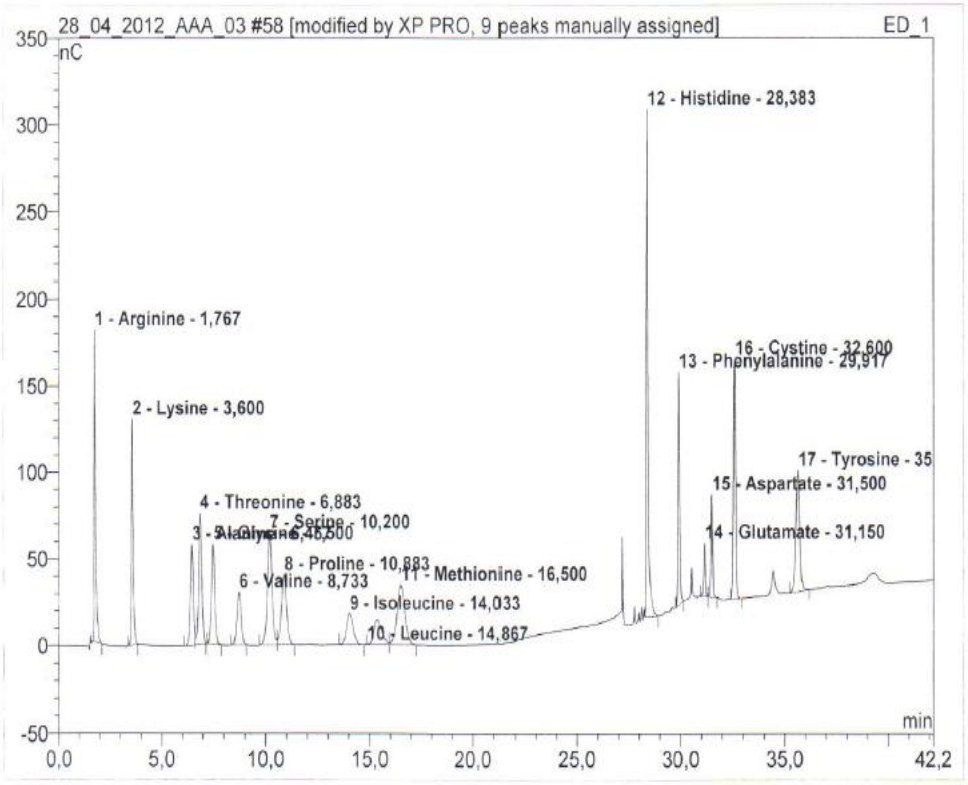
Мобилна фаза: 0,250 mol L^{-1} NaOH, 1 mol L^{-1} CH_3COONa, dH_2O

Температура: 30°C

Проток: 0,25 mL min^{-1}.

Детектор: амперометријски са сребрном референтном електродом (Ag/AgCl) и златном (Au) радном електродом.

Трајање анализе: 90 min.



Графикон 4.2.6. HPLC хроматограм смеше стандарда аминокиселина

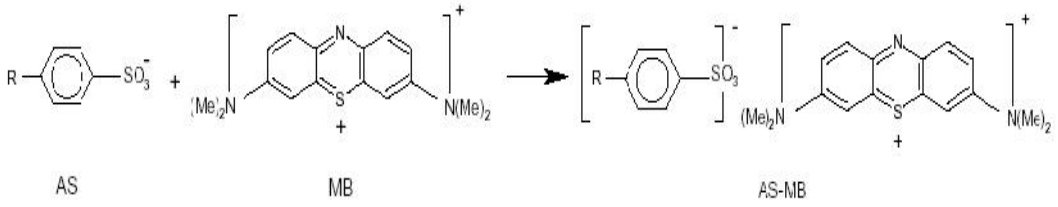
4.2.7. Одређивање концентрације анјонских компоненти у детерџенту и процента биодеградације

Реагенси

1 mol L^{-1} NaOH, 1% фенолфталеин, конц. H_2SO_4, хлороформ, метилен плаво, фосфатни пуфер (pH 7.1), SDS (Sigma Chemical, St. Louis, MO), комерцијални прашкасти детерџент "Merix" (Хенкел, Крушевац).

Протокол

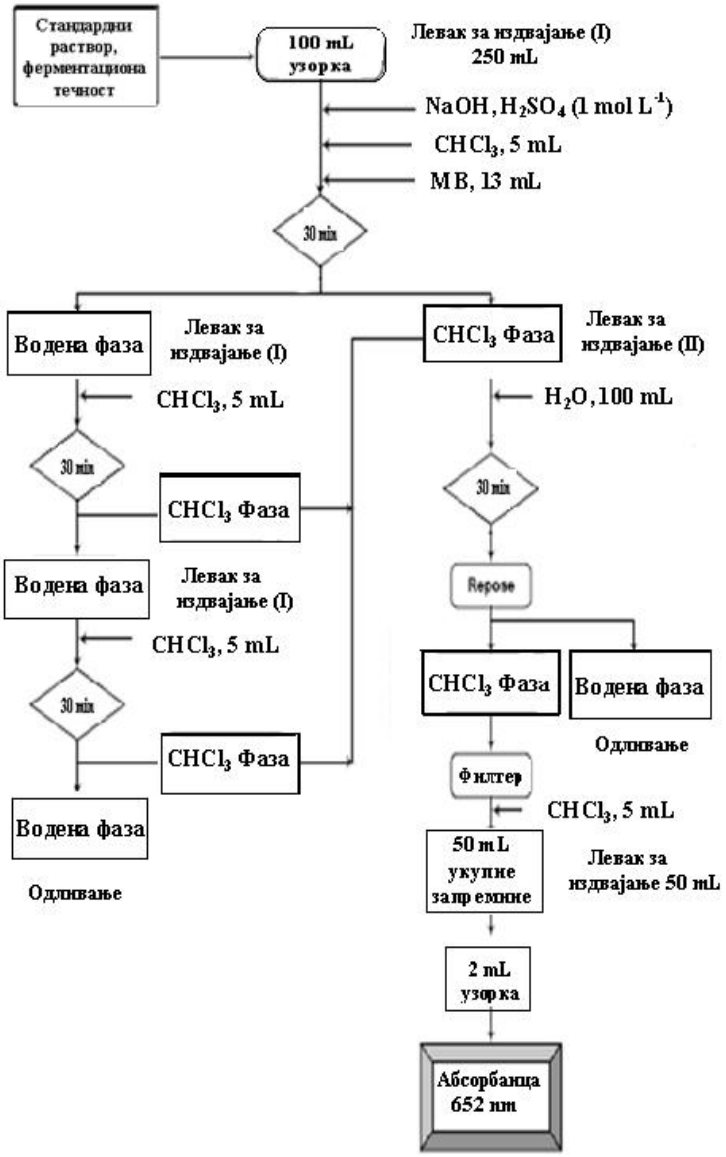
Концентрација анјонских компоненти детерџента детерминисана је спектрофотометријском методом помоћу реагенса метилен плаво. Концентрација јонског пара метилен плаво - активна супстанца (MBAS) у детерџенту је одређена Стандардном методом за испитивање вода и отпадних вода. Метода се заснива на следећој реакцији (Шема 4.12.1):



Шема 4.2.7. Механизам стварања јонског пара активна супстанца-метиленско плаво (AS-MB)

За утврђивање процента биодеградације анјонских компоненти детерџента узима се 1 mL фермантационе течности и разблажи се дестилованом водом 20 пута, (сваког дана када је вршено мерење) у левку за одвајање. Раствор детерџента у левку за одвајање теба да буде алкалан што се постиже додавањем 1 mol L^{-1} NaOH помоћу 1 капи 1% фенолфталеина као индикатора, до промене боје из безбојне у ружичасту. Затим се додаје 1 mol L^{-1} H_2SO_4 док раствор не постане кисео, тј до преласка боје раствоја из ружичасте у безбојну. Након тога се у сваки левак за одвајање додаје 5 mL хлороформа и 13 mL метилен плавог реагенса (0.35 g метилен плавог раствори се у 500 mL редестиловане воде и дода се 6.5 mL конц. H_2SO_4), левак се благо меша око 30 s. Левак се остави на сталку око 30 min, да би одвојиле фазе. Хлороформски слој се одлије у Ерленмајер запремине 100 mL. Екстракција се понавља 3 пута додавањем 5 mL хлороформа при свакој екстракцији. Сви екстракти се сакупљају у исти Ерленмајер од 100 mL. Након тога екстракт се пребаци у левак за одвајање и додаје се 25 mL раствора пуфера (6.7×10^{-3} mol L^{-1} фосфатни пуфер, pH 7.1). Левак се благо промеша око 30 s и остави се на сталку око 30 min док се слојеви не одвоје. Хлороформски слој се процеди кроз левак са стакленом вуном у 50 mL Ерленмајер боцу. Хлороформски слој се на крају промеша да би се добила хомогена смеша. Мерење апсорбанце екстраката вршено је на спектофотометру Perkin-Elmer Lambda 25 UV-Vis, на 652 nm. Као бланк је коришћен хлороформ. Концентрација анјонских

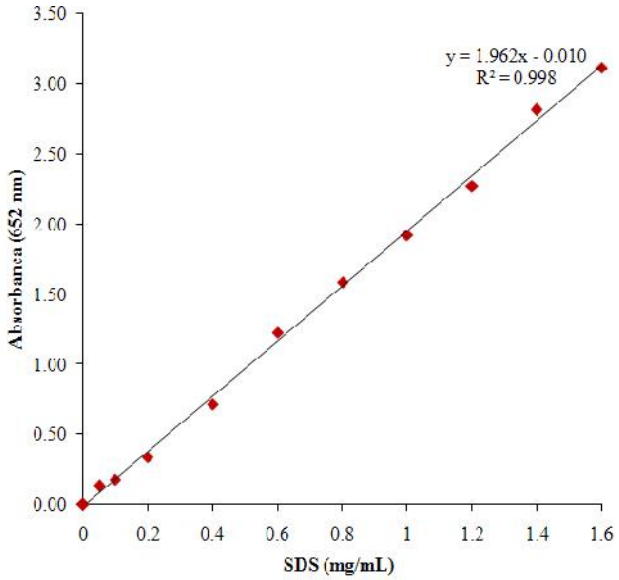
компоненти у тестираном детерџенту праћена је у огледном периоду од 3. дана до 16. дана.



Шема 4.2.8. Поступак екстракције анјонких компоненти MBAS методом

За утврђивање концентрације анјонских компоненти у тестираном детерџенту коришћен је SDS као стандард. Потребно је припремити серије разблажења стандардног раствора SDS-а и тестираног детерџента Истовремено се припреми стандардни радни раствор SDS-а (растварањем 1 g SDS-а у 1000 mL дестиловане воде). Направе се различите серије разблажења SDS-а тако да се након додавања дестиловане воде до 50 mL добију следеће концентрације: 0,05, 0,10, 0,20, 0,40, 0,60,

0,80, 1,00, 1,20, 1,40, 1,60 mg mL^{-1}. За тестирани детерџент узети различите запремине радног раствора детерџента (10 mg mL^{-1}). Отпипетирати 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 3,5, 4,0, 4,5, и 5,0 mL радног раствора детерџента и сваки левак допунити дестилованом водом до 50 mL, да би се добиле концентрације од 0,1-1,0 g mL^{-1}. На основу добијених вредности абсорбанце конструисати стандардну криву за SDS и тестирани детерџент.



Графикон 4.2.7. Стандардна крива за SDS

Концентрација анјонских компоненти у детерџенту израчуната је на основу стандардне криве, применом формуле (1):

(1)

Проценат деградације детерџента (анјонских компоненти) у ферментационој течности је израчунат применом формуле (2):

(2)

A_{625} exp - апсорбанца тест узорка

A_{625} blank - апсорбанца бланк узорка

A_{625} std - апсорбанца стандардног узорка.

4.2.8. Одређивање суве биомасе мицелијума

Мицелијум гљиве је издвојен из ферментационе течности филтрирањем кроз филтер папир Whatman No. 1 чија је тежина претходно измерена. Мицелијум је пажљиво испиран благим млазом стерилне дестиловане воде, и заједно са филтер папиром стављен у сушницу на t = 80ºC у времену од 24 h. Сушење филтер папира и мицелијума је настављено у ексикатору изнад концентроване H_2SO_4. Сушење је прекинуто када је мерењем утврђено да се маса више не мења. Сува биомаса мицелијума израчуната је одузимањем масе сувог филтер папира од укупне масе филтер папира са мицелијумом гљиве. Биомаса је изражена у g L^{-1}.

4.3. Биохемијске методе

4.3.1. Одређивање активности киселе и алкалне инвертазне (β-fruktofuranozidaza) (EC 3.2.1.26)

Реагенси

1% Сахароза, стандард глукозе (Sigma, Aldrich), динитросалицилни реагенс, фосфатни пуфер (pH 8.0), натријум-ацетатни пуфер (pH 4.5).

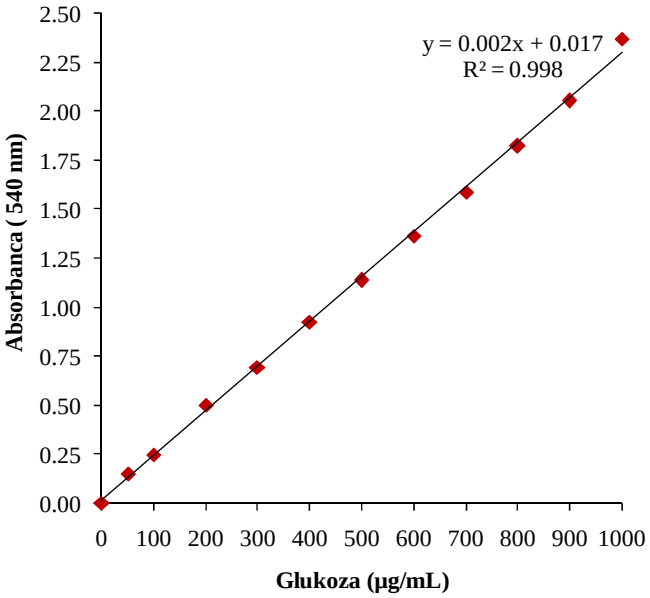
Протокол

Инвертазна ензимска активност одређена је методом Sumner и Howell (1935). За одређивање активности алкалне инвертазе у ферментационој течности гљива потребно је направити реакциону смешу која садржи 0,5 mL сировог ензимског екстракта, 0,5 mL 0,02 mol L^{-1} фосфатног пуфера (pH 8.0) и 1 mL 1% (w/v) сахарозе. Садржај епрувете (проба) се промеша и инкубира у воденом купатилу на 37°C/15 min. У другој контролној епрувети додати све састојке као у пробној епрувети и епрувету ставити на лед док се не заврши инкубација пробе. Узети по 1 mL садржаја обе епрувете и додати по 2 mL динитросалицилног реагенса. Пробне епрувете се инкубирају на 100°C/5 min. Епрувете се охладе на собној температури и након тога се спектрофотометријски одређује количина ослобођених редукујућих шећера на 540 nm (Miller, 1959).

Ензимска активност киселе инвертазе одређена је на исти начин; у реакционој смеши која садржи 0,5 mL сировог ензимског екстракта, 0,5 mL 0,01 mol L^{-1} натријум-ацетатног пуфера (pH 4.5) и 1 mL 1% (w/v) сахарозе. Садржај епрувете (проба) се

промеша и инкубира у воденом купатилу на 55°C/20 min. У другој контролној епрувети додати све састојке као у пробној епрувети и епрувету ставити на лед док се не заврши инкубација пробе. Узети по 1 mL садржаја обе епрувете и додати по 2 mL динитросалицилног реагенса. Пробне епрувете се инкубирају на 100°C/5 min. Епрувете се охладе на собној температури и након тога се спектрофотометријски одређује количина ослобођених редукујућих шећера на 540 nm.

За конструисање стандардне криве потребно је направити 1 mg mL^{-1} раствора 5.56 $\times 10^{-3}$ mol L^{-1} глукозног стандарда (Sigma Aldrich). У шест епрувета отпипетирати 0,05, 0,10, 0,20, 0,30, 0,40 и 0,50 mL стандардног раствора глукозе и епрувете допунити дестилованом водом до запремине од 1 mL. Као бланк стандарда треба узети 1 mL дестиване воде. Садржај епрувета се промеша и епрувете се инкубирају на 55°C/20 min. Даљи поступак је исти као за одређивање инвертазне активности.



Графикон 4.3.1. Стандардна крива за глукозу

Јединица инвертазне активности (IU) је дефинисана као количина ензима који катализује продукцију 1 µmol глукозе у минути на 37 °C.

$$IU/ml = \frac{(\mu mol\ glukoze)(df)}{(20)(0.5)(2)}$$

df-дилуциони фактор

20-време инкубације (у минутима)

0.5-запремина ензимског екстракта (у милилитрима)

2-фактор конверзије 1 μmol сахарозе која хидролизује на глукозу и фруктозу.

4.3.2. Одређивање активности алкалне протеазе (EC 3.4.21-24)

Реагенси

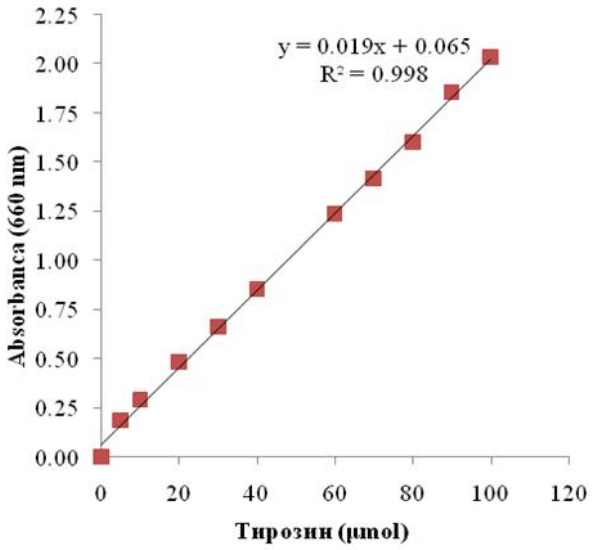
2% казеин, 5% TCA, 6% Na_2CO_3, Folin-Ciocalteu, стандардни раствор L-тирозина (Sigma, Aldrich).

Протокол

Протеолитичка активност ферментационе течности одређена је на основу присуства ензима у 1 mL течне подлоге Ансоновом методом, на основу количине тирозина који се ослобађа хидролизом казеина под дејством протеолитичких ензима. Протеолитичка активност ферментационе течности одређује се на следећи начин: у једну епрувету отпипетирати 1 mL ферментационе течности а у другу 5 mL 2% (w/v) раствора казеина. Обе епрувете се загревају у воденом купатилу на 37ºC/15 min. Након тога у епрувету са ферментационом течношћу (проба) додати 2 mL загрејаног казеина, промешати и вратити је на инкубацију још 10 min. Ензимска реакција се прекида додавањем 5 mL хладне 5% (w/v) трихлорсирћетне киселине (TCA). Смеша се промућка и потом процеди кроз филтер папир. У другој контролној епрувети отпипетирати 1 mL ферментационе течности и одмах додати 2 mL хладног казеина и 5 mL 5 % (w/v) TCA, садржај епрувете промешати и процедити кроз филтер папир. Узети по 2 mL филтрата из пробне и контролне епрувете, додати 5 mL 6% (w/v) Na_2CO_3 и 1 mL Folin-Ciocalteu реагенса. Садржај епрувета промућкати и оставити на собној *t*ºC/30 min док се не развије плава боја. У посебној епрувети (бланк) отпипетирати 1 mL дестиловане воде уместо тирозина и додати све остале састојке. Вредност апсорбанце је очитавана на спектрофотометру на 660 nm.

За одређивање количине тирозина потребно је конструисати стандардну криву. Потребно је направити $1{,}1\times10^{-3}$ mol L^{-1} стандардног раствора тирозина (спремити 100 mL у дејонизованој води, загревати пажљиво до растварања и охладити на собној температури). У шест епрувета отпипетирати 0,05, 0,10, 0,20, 0,30, 0,40 и 0,60 mL стандардног раствора тирозина и епрувете допунити дестилованом водом до запремине од 2 mL. Као бланк стандарда треба узети 2 mL дестиване воде. Све

епрувете се инкубирају на 37ºC/10 минута, и даљи поступак је исти као за одређивање активности протеолитичких ензима.



Графикон 4.3.2. Стандардна крива за тирозин

Након конструисања стандардне криве за тирозин, треба унети вредности апсорбанце тирозина који се налази у филтрату пробе (а) и филтрату контроле (б).

$$IU/ml = \frac{(\mu\text{mol тирозина})(8)(\text{df})}{(1)(10)(2)}$$

8-укупна запремина узорка (у милилитрима)

10-време инкубације узорка (у минутима)

1-запремина ензима (у милилитрима)

2-запремина узета за колориметријску детерминацију (у милилитрима)

df-дилуциони фактор

4.3.3. Одређивање активности алкалне фосфатазе (ortofosfat-monoester-fosfohidrolaza) (EC 3.1.3.1)

Реагенси

β-глицерофосфат (Sigma, Aldrich), гликолни пуфер (pH 9,0), 10% TCA, амидол, 60% PCA, NH_4-молибдат.

Протокол

Ензимска активност алкалне фосфатазе одређена је на основу количине неорганског фосфора Allen-овом методом. Ензимска активност је мерена у реакционој смеши која садржи 1 mL гликолног пуфера (pH 9,0) са Mg^{2+}, 1 mL ензимског екстракта и 1 mL *β*-глицерофосфата (супстрата). Епрувете са реакционом смешом су инкубиране на 37ºC/30 min. Након инкубације, ензимска реакција је прекинута додавањем 3 mL 10% TCA. Епрувете су стављене на лед 15 min после чега је садржај епрувета филтриран и филтрат сакупљен. Контролне епрувете су припремљене на исти начин али без инкубације већ се одмах додаје TCA, епрувете се држе на леду 15 min и филтрирају. Да би се одредила концентрација фосфора у узорку потребно је урадити Аленову реакцију. Отпипетира се по 1 mL филтрата пробе и контролне пробе у две епрувете, додаје се 0,4 mL амидола, 0,4 mL 60% PCA, 0,2 mL NH_4-молибдата и 3 mL дестиловане воде. Епрувете се инкубирају на собној *t*ºC/11min. Истовремено се припремају серије разблажења стандардног раствора фосфора и понавља се поменута процедура, које служе за конструисање стандардне криве за фосфор. Мерење апсорбанце раствора врши се на 720 nm.

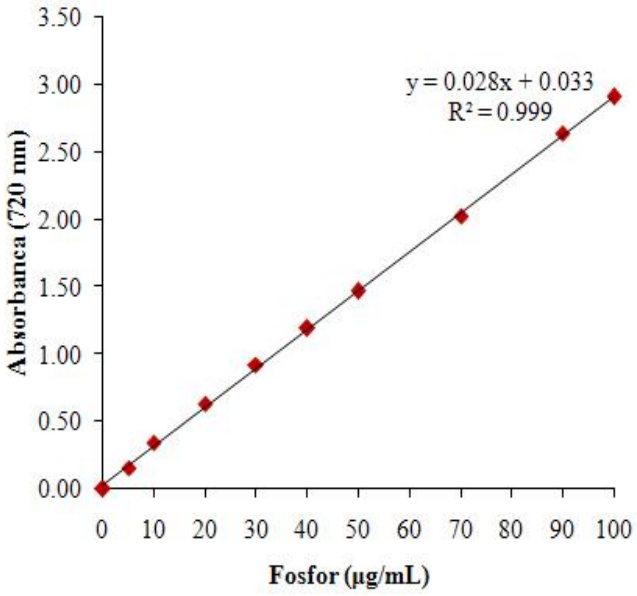


График 4.3.3. Стандардна крива за фосфор

Јединица ензимске активности:

6-запремина реакционе смеше (у милилитрима)

df-дилуциони фактор

1-запремина ензимског екстракта (у милилитрима)

30-време инкубације (у минутима)

5- запремина узета за колориметријску детерминацију (у милилитрима).

4.3.4. Одређивање фосфорилазне активности ((1→4)-alfa-D-glukan:fosfat alfa-D-glukoziltransferaza) (EC 2.4.1.1)

Реагенси

Фосфатни пуфер (pH 6,7), 4% скроб, $MgNH_4Cl$ реагенс, конц. HNO_3, 60% PCA, амидол, NH_4-молибдат, стандарни фосфатни раствор (Sigma, Aldrich).

Протокол

Одређивање ензимске реакције фосфорилазе вршено је основу количине неорганског фосфора Allen-овом методом. Ензимска активност је мерена у реакционој смеши која садржи 0,5 mL фосфатног пуфера (pH 6,7), 0,5 mL ензимског екстракта и 0,5 mL 4% (w/v) раствора скроба (супстрата). Епрувете са реакционом смешом су инкубиране на 37^{o}C/15 min и држане на леду. Да би дошло до преципитације фосфора, потребно је отпипетирати 0,2 mL садржаја епрувете, додати 3,8 mL дестиловане воде, 0,5 mL $MgNH_4Cl$ реагенса и 0,5 mL конц. HNO_3. Епрувете се оставе на собној t^oC/5 min а затим се филтрирају и филтрат се сачува. У филтрату се одређује количина укупног и неорганског фосфора, применом Allen-ове методе. За одређивање количине укупног фосфора потребно је отпипетирати 0,2 mL филтрата, додати 3,8 mL дестиловане воде и 0,4 mL 60% PCA, садржај епрувете благо промешати и инкубирати на 100^{o}C/10 min. Епрувете охладити на собној t^oC, додати 0,4 mL амидола и 0,2 mL NH_4-молибдата. Инкубацију наставити на собној t^oC/11 min. Да би се одредила количина неорганског фосфора потребно је отпипетирати 0,2 mL филтрата и додати истим редоследом све састојке као у претходном случају, и епрувете одмах инкубирати на собној t^oC/11 min. Ензимска активност се одређује на исти начин као активност алкалне фосфатазе.

4.3.5. Одређивање активности рибонуклеазе (purin-nukleozidna ribohidrolaza)(EC 3.2.2.1)

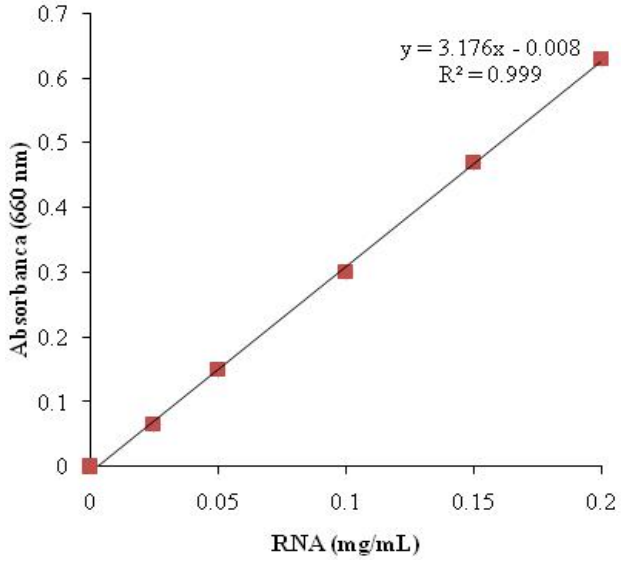
Реагенси

RNA (Serva, Feinbiochemica, Heildelberg), фосфатни пуфер (pH 7,8), 10% TCA, орцинол.

Протокол

Ензимска активност одређена је на основу количине рибозе орцинолском реакцијом по Schneider-y. Ензимска активност је мерена у реакционој смеши (проба) која садржи 0,25 mL фосфатног пуфера (pH 7,8), 1,25 mL супстрата (RNA 1 mg mL^{-1}) и 0,25 mL ферментационе течности. Епрувете су инкубиране 15 min на 37°C, а затим је реакција прекинута додавањем 1,5 mL 10% (w/v) TCA, епрувете су инкубиране 15 min на 0°C. Након инкубације епрувете су центрифугиране 10 min на 3,000 обртаја, а супернатант је сачуван. У контролну епрувету прво се додаје 1,5 mL 10% (w/v) TCA, а затим 0,25 mL фосфатног пуфера (pH 7,8), 1,25 mL супстрата (RNA 1 mg mL^{-1}) и 0,25 mL ферментационе течности. Епрувете су инкубиране 15 min на 0°C, центрифугиране 10 min на 3,000 обртаја, и супернатант сачуван. Од сачуваних супернатанта отпипетирано је по 2 mL контроле и пробе и додато је 2 mL орцинолног реагенса, затим су епрувете инкубиране 20 min на 100°C и охлађене. Мерење апсорбанце је вршено на 660 nm. Концентрација продуката-олигонуклеотида који су настали као резултат хидролитичке активности RNaza на RNA одређена је помоћу стандардне криве.

За конструисање стандардне криве потребно је направити 1 mg mL^{-1} раствора RNA. У шест епрувета отпипетирати 0,05, 0,10, 0,20, 0,30, 0,40 и 0,50 mL стандардног раствора и епрувете допунити дестилованом водом до запремине од 2 mL. У случају високих вредности апсорбанце разблажити стандарде дестилованом водом. Као бланк стандарда треба узети 2 mL дестиване воде. У све епрувете додато је по 2 mL орцинолног реагенса. Садржај епрувета се промеша и епрувете се инкубирају на 100°C/20 min.



Графикон 4.3.5. Стандардна крива за RNA

4.3.6. Одређивање активности деоксирибонуклеазе (deoksiribonukleat oligonukleotido hidrolaza)(EC 3.1.21.1)

Реагенси

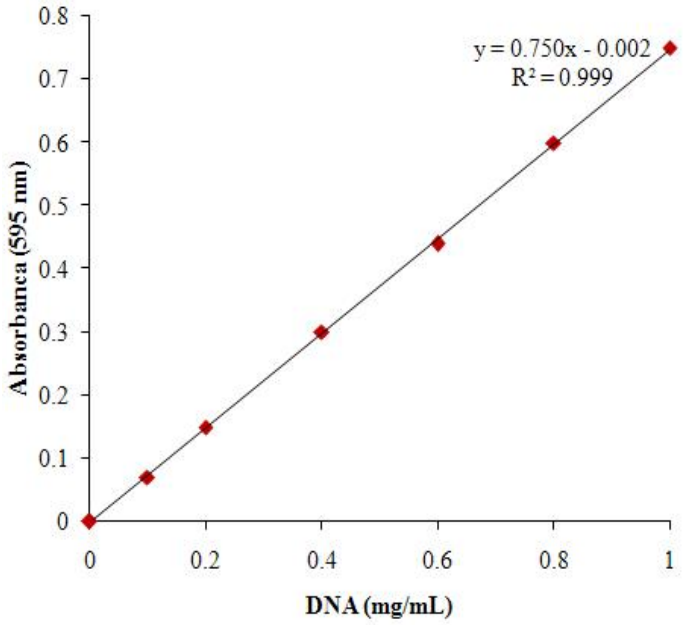
DNA (Serva, Feinbiochemica, Heildelberg), фосфатни пуфер (pH 7,6), TCA, дифениламински реагенс (2,5 g дифенил амина помешати са 250 mL глацијалне сирћетне киселине и 6,25 mL конц. H_2SO_4).

Протокол

Ензимска активност одређена је на основу количине деоксирибозе дифениламинском реакцијом по Dische-у. Ензимска активност је мерена у реакционој смеши (проба) која садржи 1 mL 0,1 mol L^{-1} фосфатног пуфера (pH 7,6) са Mg^{2+}, 1 mL супстрата (DNA 2 mg mL^{-1}) и 1 mL ферментационе течности. Епрувете су инкубиране 30 мин. на 37°C, а затим је реакција прекинута додавањем 1 mL 3 mol L^{-1} TCA, епрувете су инкубиране 15 min на 0°C. Након инкубације епрувете су центрифугиране 10 min на 2,000 обртаја, а супернатант је сачуван. У контролну епрувету прво се додаје 1 mL 3 mol L^{-1} TCA, а затим 1 mL фосфатног пуфера (pH 7,6), 1 mL супстрата (DNA 2 mg mL^{-1}) и 1 mL ферментационе течности. Епрувете су инкубиране 15 min на 0°C, центрифугиране 10 min на 2,000 обртаја, и супернатант сачуван. Од сачуваних супернатанта отпипетирано је по 1 mL контроле и пробе и

додато је 2 mL дифениламинског реагенса, затим су епрувете промешане и инкубиране 10 min на 100°C. Мерење апсорбанце је вршено на 595 nm.

За конструисање стандардне криве потребно је направити 1 mg mL^{-1} раствора DNA. У шест епрувета отпипетирати 0,05, 0,10, 0,20, 0,30, 0,40 и 0,50 mL стандардног раствора и епрувете допунити дестилованом водом до запремине од 1 mL. Као бланк стандарда треба узети 1 mL дестиване воде. У све епрувете додато је по 2 mL дифениламинског реагенса. Садржај епрувета се промеша и епрувете се инкубирају на 100°C/10 min, након хлађења мерена је апсорбанца на 595 nm.



Графикон 4.3.6. Стандардна крива за DNA

4.4. Статистичке методе

Сви резултати мерења су приказани као средња вредност са стандардном девијацијом (MS±SD) три независна мерења. Да би се утврдило дејство детерџента на испитиване биохемијске параметре за сваку гљиву тестиране су средње вредности резултата унутар подлога (К, Д3 и Д5) и између подлога (К и Д3, К и Д5, Д3 и Д5) применом: Mann-Whitney и Wilcoxon теста. Применом Kruskal-Wallis теста испитано је да ли постоје разлике у биодеградацији тестираног детерџента између гљива. Корелација између испитиваних биохемијских параметара и линеарна регресија тестиране су са прагом значајности 0.05 и 0.01. За статистичку обраду резултата коришћен је SPSS (Chicago, IL) статистички софтвер (SPSS for Windows, ver. XIII, 2004). Резултати су приказани графички и табеларно.

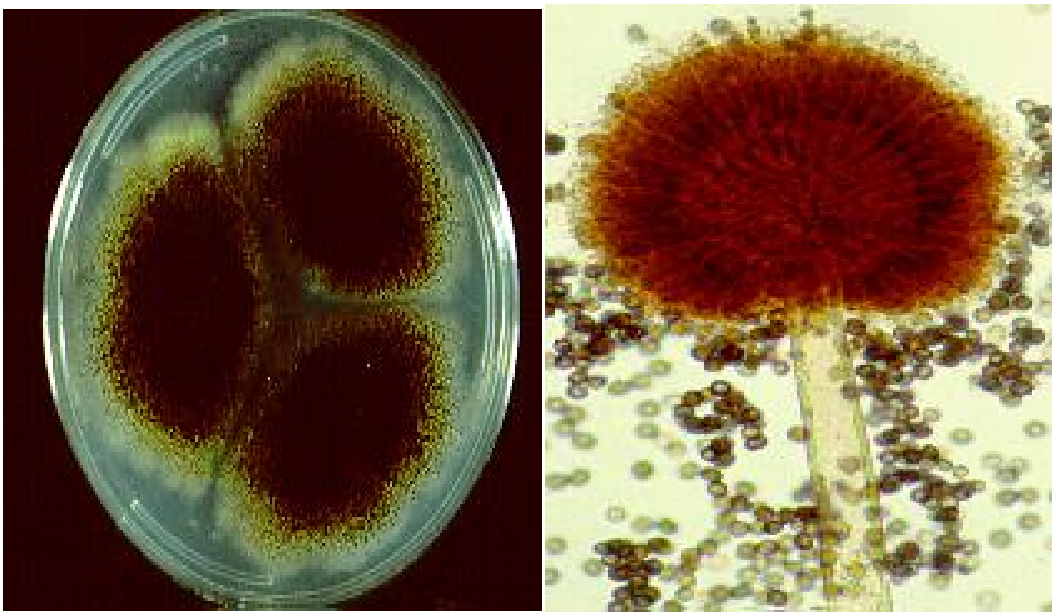
5.РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

5.1. Таксономске и морфолошке карактеристике изолованих гљива

Из узорака отпадних вода идентификоване су следеће врсте гљива: ***Aspergillus niger, Penicillium chrysogenum*** (изоловане су из канализационих отпадних вода Лепенице), ***Trichoderma harzianum, Mucor racemosus*** (из индустријских отпадних вода фабрике за производњу детерџента Хенкел, Крушевац, које се уливају у Расину) и ***Penicillium cyclopium*** (из канализационих отпадних вода Западне Мораве).

Царство: *Fungi*, Раздео: *Ascomycota*, Класа: *Ascomicetes*, Субкласа: *Euromycetidae*, Ред: *Eurotiales*, Фамилија: *Trichocomaceae*, Род: *Aspergillus*, Суброд: *Circumdati*, Врста: ***Aspergillus niger*** **Van Tieghem** (1867).

Aspergillus niger је једна од најчешћих и лако препознатљивих врсте рода *Aspergillus*. За ову врсту карактеристична је добро развијена колонија која се састоји од компактне основе, безбојне до бледо-жућкасте боје покривене густим слојем тамно-браон до црних конидијских глава које се формирају на усправним конидиофорама. Макроскопски, широка колонија се одликује брзим растом, са белим мицелијумом и развијеним светло-жутим зонама, продукцијом тамно-браон до црних или пурпурно-браон конидијских глава. Микроскопски, конидиофоре се издижу из супстрата, различите дужине од 200 μm до неколико μm и пречника 10-20 μm. Конидиофоре су једноћелијске, негранате, хијалине, са глатким зидом, проширене су на врху у тамне везикуле. Везикуле су лоптасте, безбојне до жућкасто-браон, фертилне преко целе површине. Преко везикуле се налазе радијално распоређене фијалиде у облику флаше које се везују за везикуле преко кратких гранчица профијалида или метула. Метуле су дужине од 10-15 μm. На фијалидама се налазе једноћелијске конидије распоређене у радијалним низовима. Конидије су лоптасте до елипсасте или хоризонтално спљоштене, тамно-браон до црне боје, са храпавим зидом, пречнику 4-5 μm, некада могу бити и мање. Везикула, фијалиде, метуле и конидије формирају конидијску главу. Конидијске главе су пречника 3-20 μm, лоптасте, временом се деле у неколико лабавих колона. Главе се разликују у боји од тамно-браон преко пурпурно-браон до црне, али су обично црне када се посматрају голим оком на дневној светлости (слика 5.1).



Слика 5.1. Изглед колоније *Aspergillus niger* (макроскопски и микроскопски)
(http://fungi.myspecies.info/non-lichenized-ascomycota/aspergillus-niger)

Царство: *Fungi*, Раздео: *Ascomycota*, Подраздео: *Pezizomycotina*, Класа: *Ascomycetes*, Субкласа: *Eurotiomicetidae*, Ред: *Eurotiales*, Фамилија: *Trichocomaceae*, Род: *Penicillium*, Секција: *Chrysogena*, Врста: ***Penicillium chrysogenum*** **Thom** (1910)

Penicillium chrysogenum (1910) је веома распрострањена гљива у природи, често живи на хранљивим наминирницама и у кућама.

Макроскопски, колоније расту брзо на кромпир декстрозном агару, након 7 дана инкубације достижу пречник 4-5 cm. Колоније су широке, баршунасто глатке, плаво-зелене до јарко-зелене боје, са многобројним спорама и белим рубом по ободу ширине 2-3 mm, у периоду раста (слика 5.2). Старењем постаје сивкаста или љубичасто-браон са прекомерним белим или ружичастим хифама, а наличје колоније је жуто-беле боје. Микроскопски, мицелијум стварају једноставне, дуге, усправне конидиофоре, које се гранају у близини врха, у карактеристичне метличасте облике (пеницилусе). Конидиофоре су са глатким зидом, величине 200-1000 µm. Пеницилуси су асиметрични и сложени, са дивергентним гранама, у свим деловима глатки. Стипе је пречника 2.5-4 µm. Постоје 4 метуле величине 8-12 x 2-4 µm. Фијалиде су у облику

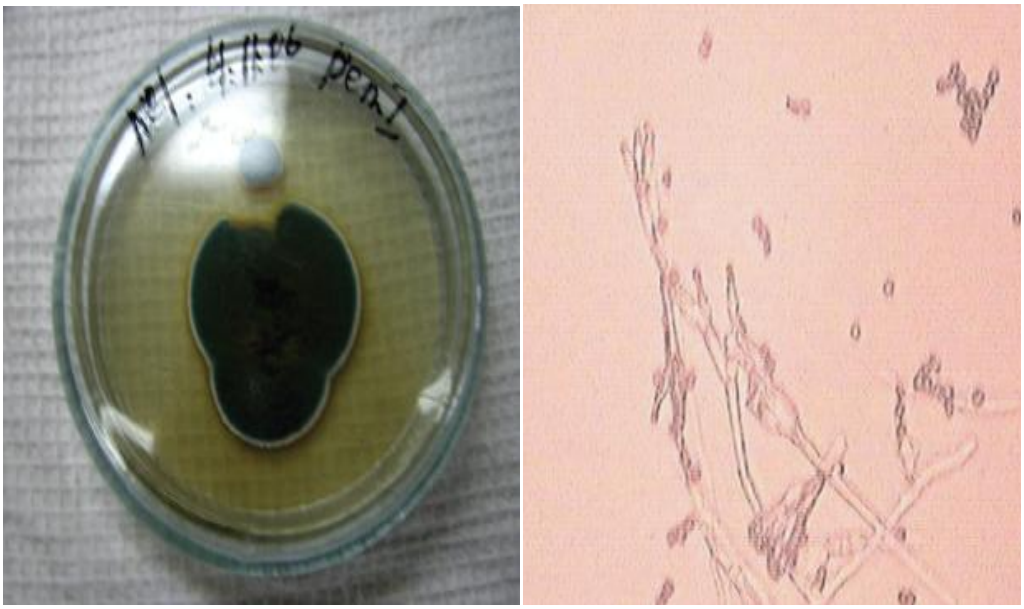
флаше, са редукованим вратом, величине су 7-10 x 2-2.5 µm. Фијалиде (стеригмате) су груписане у кластере (4-7). Конидије су полулоптасте до елипсасте, са глатким зидом, распоређене у дугим неправилним ланцима. Величине су 2-4 x 2-3.5 µm (Frisvald и Samson, 2004, Houbraken и Samson, 2011).

Слика 5.2. Изглед колоније *Penicillium chrysogenum* (макроскопски и микроскопски)(http://mycota-crcc.mnhn.fr/site/specie.php?idE=106)

Царство: *Fungi*, Раздео: *Ascomycota*, Подраздео: *Pezizomycotina*, Класа: *Ascomycetes*, Субкласа: *Eurotiomicetidae*, Ред: *Eurotiales*, Фамилија: *Trichocomaceae*, Род: *Penicillium*, Секција: *Fasciculata*, Врста: ***Penicillium cyclopium* Westling** (1911)

Penicillium cyclopium се одликује брзим растом на кромпир декстрозном агару**.** Макроскопски, колонија је мутна, плаво-зелена, са светлијим зонама унутар белог руба, скоро баршунаста са јасно израженим фасцикулацијама у млађим областима. Наличје незреле колоније је жућкасте боје али старењем наличје добија наранџасто-браон боју. Микроскопски, пеницилуси су обично двотруко или троструко гранати, често се гране и метуле образују на истом нивоу, стипе храпаво, дугачко100-400 x 2.5-4 µm. Фијалиде су у облику флаше, димензија 7-10 x 2.2-2.8 µm, груписане су у кластере 4-8, са заобљеним врхом. Конидије су мање или више сферног облика,

понекада су елипсасте у фази формирања, глатке до фино храпаве, пречника 3.5-4 µm (слика 5.3).



Слика 5.3. Изглед колоније *Penicillium cyclopium* (макроскопски и микроскопски)

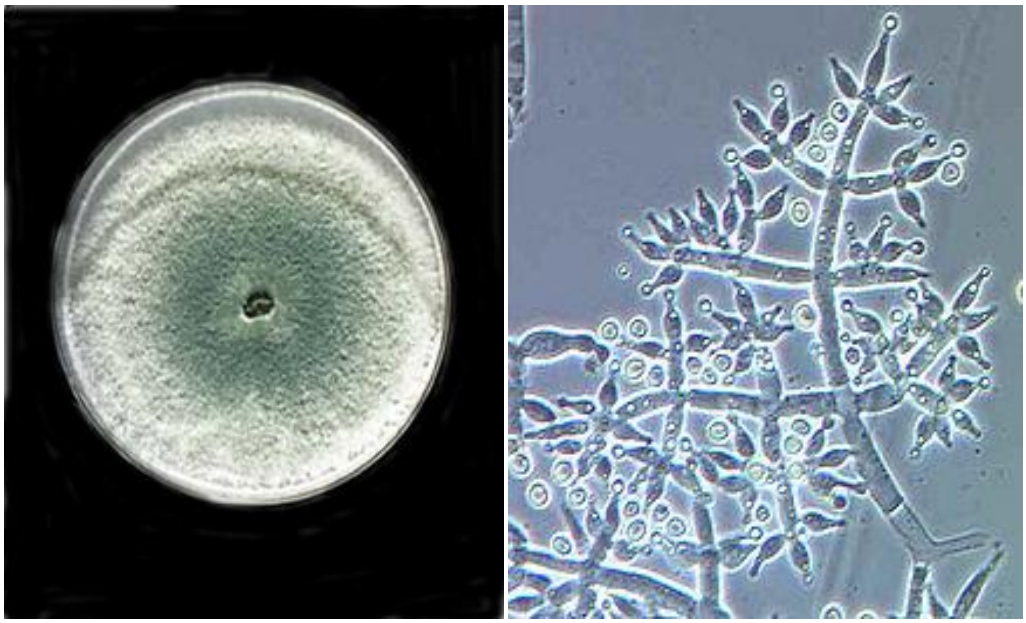
(www.studiesinmycology.org)

Царство: *Fungi*, Раздео: *Ascomycota*, Подраздео*: Pezizomycotina*, Класа: *Sordariomycetes*, Ред: *Hypocreales*, Фамилија**:** *Hypocreaceae*, Род: *Trichoderma*, Врста: ***Trichoderma harzianum*** **Rifai** (1969)

Trichoderma harzianum је космополитска, филаментозна гљива која је углавном изолована из земљишта или трулог дрвећа.

Макроскопски, род *Trichoderma* је карактеристичан по брзо растућим колонијама које су у почетку глатке и прозирне или воденасто-беле, а касније постају флокулиране, са изразитим чуперцима конидиофора које често формирају концентричне зоне у облику прстена, постепено мењајући боју из беличасто-зелене у светло-маслинастозелену током сазревања. Наличје колоније је беличасте, светло-браон или жућкасте боје. Микроскопски, колонија се састоје од септираних хијалиних хифа, конидиофора, фијалида и конидија. Конидиофоре су хијалине, вишеструко разгранате, повремено могу имати пирамидални облик. Фијалиде су хијалине, гранате, у облику флаше, појединачне или груписане у кластере. Конидије су

једноћелијске, несептиране, округлог или елипсастог облика, са скраћеном основом, зелене боје, глатких или грубих зидова, пречника око 3 μm (слика 5.4).

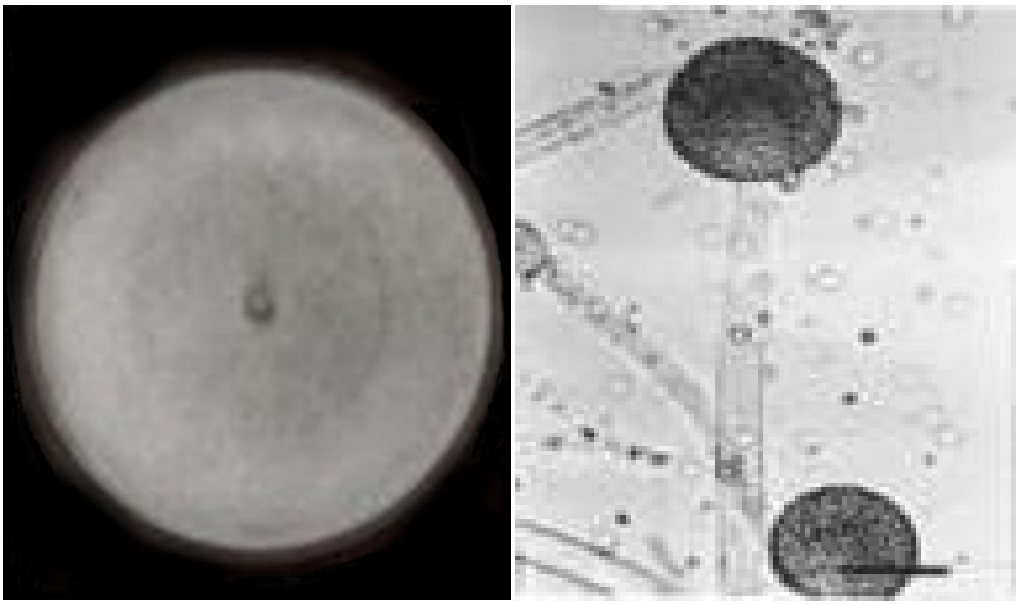


Слика 5.4. Изглед колоније *Trichoderma harzianum* (макроскопски и микроскопски) (http://www.biocontrol.entomology.cornell.edu/pathogens/trichoderma.html)

Царство: *Fungi*, Раздео: *Zygomycota*, Ред: *Mucorales*, Фамилија: *Mucoraceae*, Род: *Mucor*, Врста: ***Mucor racemosus*** **Fresenius** (1976)

Гљиве из рода *Mucor* су филаментозне гљиве које обично живе у земљишту, а могу се наћи и на биљкама, трулом воћу и поврћу. ***Mucor racemosus*** је једна од првих земљишних гљива која је откривена и изолована 1886. год. То је диморфна, факултативно анаеробна гљива, која се може наћи у два различита облика, филаментозном или квасоликом. Макроскопски, гљива се одликује брзим растом на температури од 25-30°C и за кратко време прекрива површину агара. Гљива слабо расте или уопште не расте на 37°C. Колонија је густа и памучинаста, висине је до 2 cm. Обично је тамно-сива или светло-маслинастосива на типичним хранљивим подлогама. Микроскопски, несептиране или слабо септиране хифе ширине 6-15 μm, спорангиофоре, спорангије и споре су јасно уочљиве. Спорангиофоре су усправне, кратке, конусне на крајевима, и формирају симподијалне кратке гране, пречника 5.0-

10.0 µm. Спорангије су лоптасте, беле или бледо-жућкасте. Веће спорангије су пречника 70-80 µm, а мање око 40-45 µm. Зид спорангија је благо проширен, отпоран (перзистентан), покривен омотачем, колумеле су лоптасте до елипсасте, или јајасте, обично са скраћеном основом и оковратником (крагном), пречника 10-25 x 15.5-27.5 µm, спорангиоспоре су лоптасте или јајасте, 3.9-4.9 x 3.9-5.9 µm (слика 5.5).



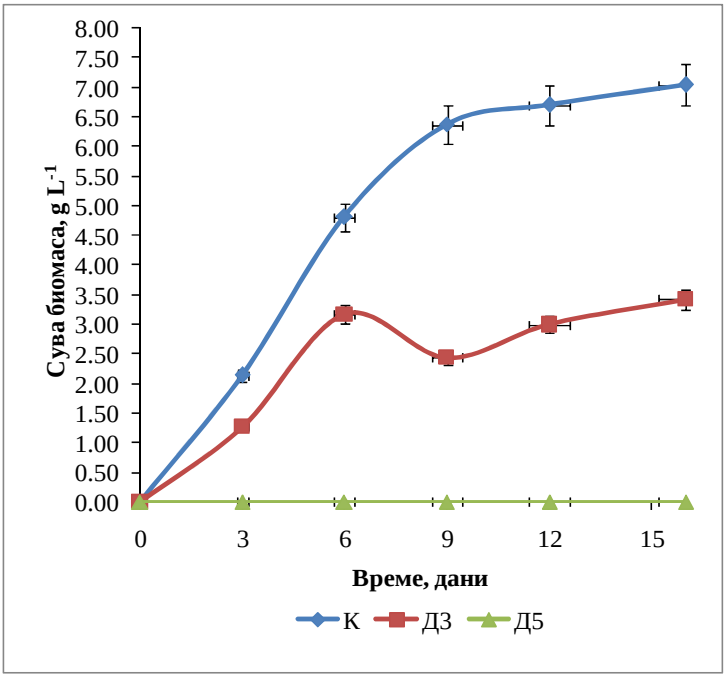
Слика 5.5. Изглед колоније *Mucor racemosus* (макроскопски и микроскопски) (http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp?id=FU200802070052)

5.2. Утицај детерџента на раст и развој гљива и укупну суву биомасу

Познато је да хемијски састав хранљиве подлоге и експериментални услови утичу на раст и развој гљива и укупну биомасу. Многа истраживања су показала да Чапекова подлога има добра хемијска својства за култивацију гљива и велику продукцију биомасе (Prasertsan, *и сар.*, 1997; Mehta *и сар.*, 2012). Такође, утврђено је да детерџент као и неке његове компоненте, додати у течну хранљиву подлогу утичу инхибиторно или стимулативно на раст и развој гљива у зависности од врсте детерџента, врсте гљива и примењене концентрације (Јаковљевић, 2009). У овом истраживању је испитиван утицај комерцијалног детерџента анјонског типа на раст и развој изабраних врста гљива у односу на позитивну контролу (без детерџента)

мерењем суве биомасе и конструисањем криве раста. Резултати су приказани на графиконима од 5.2.1. до 5.2.6.

Крива раста и укупна сува биомаса гљиве *Aspergillus niger* током експерименталног периода приказана је на графикону **5.2.1**.

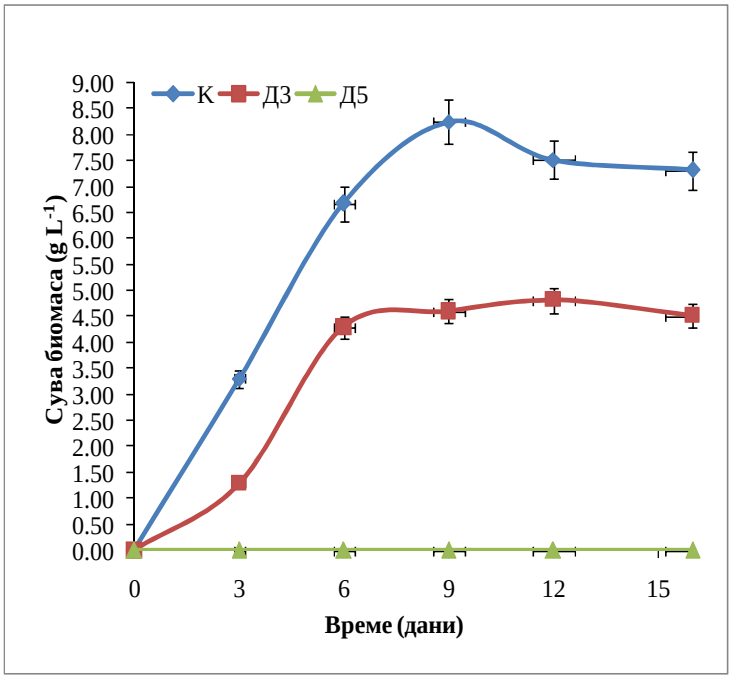


Графикон 5.2.1. Крива раста *Aspergillus niger*

Гљива је имала монофазни експоненцијални раст у контролној подлози и двофазни експоненцијални раст у подлози са детерџентом 0,3% концентрације. Крива раста гљиве у контролној подлози имала је веома изражену фазу експоненцијалног раста која је трајала од инокулације до 9. дана. Стационарна фаза је била продужена и трајала је од 9. до 16. дана, када је измерена максимална вредност суве биомасе. У подлози са 0,3% детерџентом примарни експоненцијални раст био је изражен у периоду од инокулације до 6. дана. У периоду од 6. дана до 9. дана забележена је аутолиза и редукција биомасе. Међутим, након аутолизе уследила је секундарна експоненцијална фаза раста која је трајала од 9. до 16. дана. На крају експерименталног периода укупна сува биомаса гљиве износила је 7,04 g L^{-1} у контроли и 3,42 g L^{-1} у подлози Д3. Детерџент 0,3% концентрације инхибирао је

51,42% суве биомасе гљиве *A. niger*. Детерџент 0,5% концентрације деловао је фунгицидно и није дошло до развоја мицелијума у подлози Д5.

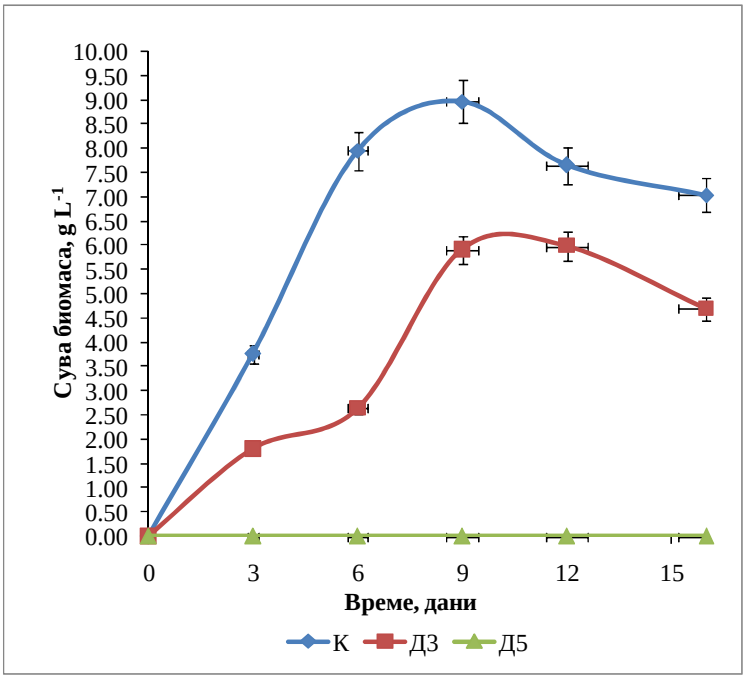
На графикону **5.2.2** приказана је крива раста и укупна сува биомаса гљиве *Penicillium chrysogenum*.



Графикон 5.2.2. Крива раста *Penicillium chrysogenum*

Гљива је имала монофазни експоненцијални раст и у контроли и у подлози са 0,3% детерџентом, који је забележен од момента инокулације до 6. дана. Од 6. дана до 9. дана гљива је прошла кроз кратку стационарну фазу у контролној подлози када је остварила максималну суву биомасу. Међутим, стационарна фаза раста је била продужена у подлози Д3 од 6. дана до 16. дана, када је измерена максимална сува биомаса. Након стационарне фазе започела је аутолиза и смањење биомасе у К подлози (12. дана). На крају огледа (16. дана) укупна сува биомаса гљиве износила је 8,35 g L^{-1} у контроли и 4,52 g L^{-1} у подлози Д3. На основу добијених резултата израчунато је да је детерџент 0,3% концентрације инхибирао 50% суве биомасе гљиве *P. chrysogenum*.

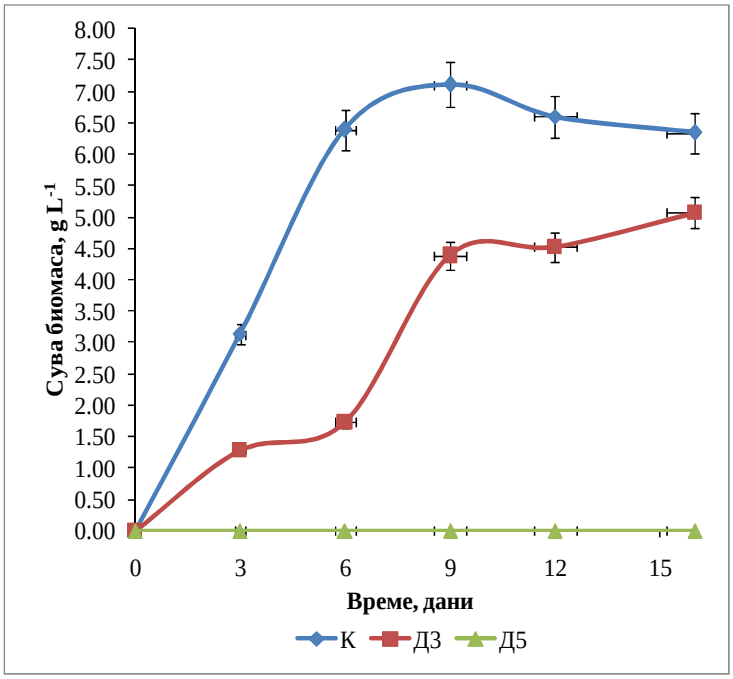
Крива раста и укупна сува биомаса гљиве *Penicillium cyclopium* током експерименталног периода приказана је на графикону **5.2.3**.



Графикон 5.2.3. Крива раста *Penicillium cyclopium*

Гљива је имала монофазни експоненцијални раст и у контроли и у подлози са 0,3% детерџентом. Фаза експоненцијалног раста била је веома изражена у контроли и трајала је до 6. дана, затим је уследила стационарна фаза од 6. дана до 9. дана, када је измерена максимална вредност суве биомасе. Након 9. дана започела је аутолиза која се одразила на значајније смањење биомасе, посебно 12. дана. Гљива гајена у подлози Д3 имала је експоненцијални раст који је забележен од момента инокулације до 9. дана, са стационарном фазом од 3. дана до 6. дана. Највећи раст биомасе је забележен од 6. дана до 9. дана. У периоду од 9. дана до 12. дана гљива је прошла кроз другу стационарну фазу, након које је започела аутолиза (од 12. дана до 16. дана). На крају експерименталног периода укупна сува биомаса гљиве износила је 7,04 g L^{-1} у контроли и 4,69 g L^{-1} у подлози Д3. Детерџент 0,3% концентрације инхибирао је 33,38% суве биомасе гљиве *P. cyclopium*.

На графикону **5.2.4.** приказана је крива раста и укупна сува биомаса гљиве *Trichoderma harzianum*.

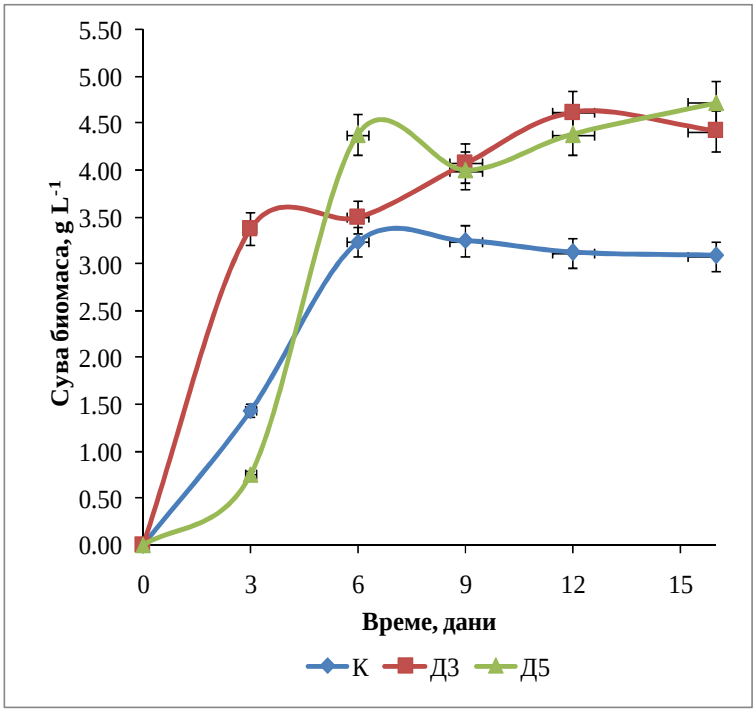


Графикон 5.2.4. Крива раста *Trichoderma harzianum*

Гљива гајена контролној подлози имала је монофазни експоненцијални раст који је трајао од момента инокулације до 6. дана. Од 6. дана до 9. дана гљива је прошла кроз стационарну фазу када је остварила максималну суву биомасу. Након стационарне фазе започела је аутолиза и смањење биомасе у К подлози (12. дана). У подлози са 0,3% детерџентом, гљива је такође имала монофазни експоненцијални раст али са израженимим стационарним фазама и одсуством аутолизе. У подлози Д3, рана фаза експоненцијалног раста трајала је од момента инокулације спора до 3. дана, након које је уследила стационарна фаза до 6. дана. Фаза експоненцијалног раста је настављена од 6. дана до 9. дана, када је дошло до наглог повећања биомасе. Друга стационарна фаза је започела 9. дана и трајала је до 16. дана у подлози Д3, када је постигнута максимална сува биомаса. Међутим, сува биомаса гљиве у подлози Д3 била је незнатно мања у односу на контролу и износила је 6,34 g L^{-1} у контроли и 5,07 g L^{-1} у подлози Д3. Детерџент 0,3% концентрације инхибирао је 20% суве биомасе гљиве *T. harzianum*. Детерџент 0,5% концентрације деловао је фунгицидно и није дошло до развоја мицелијума у подлози Д5.

На графикону **5.2.5.** приказана је крива раста гљиве *Mucor racemosus* у зависности од састава хранљиве подлоге и концентрације детерџента.

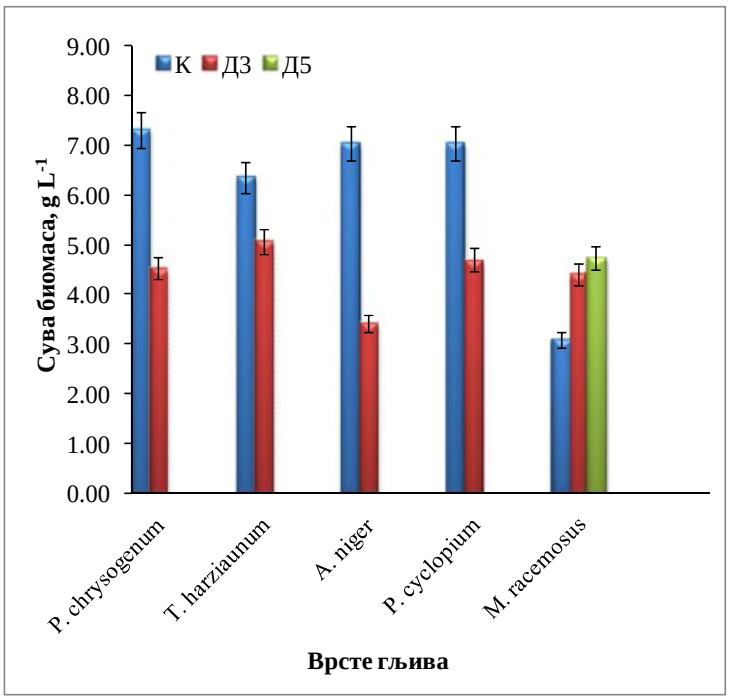
У контролној Чапековој подлози гљива *M. racemosus* је имала монофазни експоненцијални раст од момента инокулације до 6. дана. У периоду од 6. дана до 9. дана забележена је стационарна фаза, након које је уследила аутолиза (12. дана), која је резултирала незнатним смањењем биомасе. У подлози са 0,3% детерџентом гљива је такође имала монофазни експоненцијални раст, али са другачијом динамиком раста у односу на контролу. Нагли експоненцијални раст је забележен од инокулације до 3. дана, затим је уследила стационарна фаза од 3. дана до 6. дана, током које је биомаса остала скоро непромењена. Након стационарне фазе поново је уследио експоненцијални раст од 6. дана до 12. дана, а затим аутолиза и благо смањење биомасе (16. дан). У подлози са 0,5% детерџентом, гљива је имала двофазни експоненцијални раст. Рана фаза раста је забележена од инокулације до 3. дана, а примарна фаза експоненцијалног раста забележена је од 3. до 6. дана. Након тога, уследила је аутолиза и смањење биомасе 9. дана, затим секундарна фаза експоненцијалног раста која је трајала од 9. дана до 16. дана. Обе тестиране концентрације детерџента стимулисале су раст и суву биомасу гљиве у поређењу са контролом. Интересантно је да је већа концентрација детерџента стимулисала продукцију веће количине суве биомасе. На крају огледног периода (16. дана) сува биомаса гљиве била је 53% већа у подлози Д5 и 43% већа у подлози Д3 у односу на контролу.



Графикон 5.2.5. Крива раста *Mucor racemosus*

На графикону **5.2.6.** приказана је количина суве биомасе (g L^{-1}) тестираних гљива у хранљивим подлогама на крају експерименталног периода (16. дана).

Количина суве биомасе у контролној подлози кретала се у следећем правцу: *Penicillium chrysogenum* > *Aspergillus niger* > *Penicillium cyclopium* > *Trichoderma harzianum* > *Mucor racemosus*. Контролна (Чапекова) подлога се показала оптималном за раст гљива, изузев за раст гљиве *M. racemosus*. Детерџент 0,3% концентрације испољио је инхибиторно дејство на продукцију биомасе гљива у различитом проценту. Највећи проценат инхибиције забележен је код гљиве *A. niger* 51,42% , затим *P. chrysogenum* 50%, *P. cyclopium* 33,38%, а најмањи код *T. harzianum* 20%. Стимулативно дејство детерџента 0,3% и 0,5% концентрације било је испољено једино на раст и развој гљиве *M. racemosus*, при чему је виша концентрација детерџента имала веће стимулативно дејство (53%).



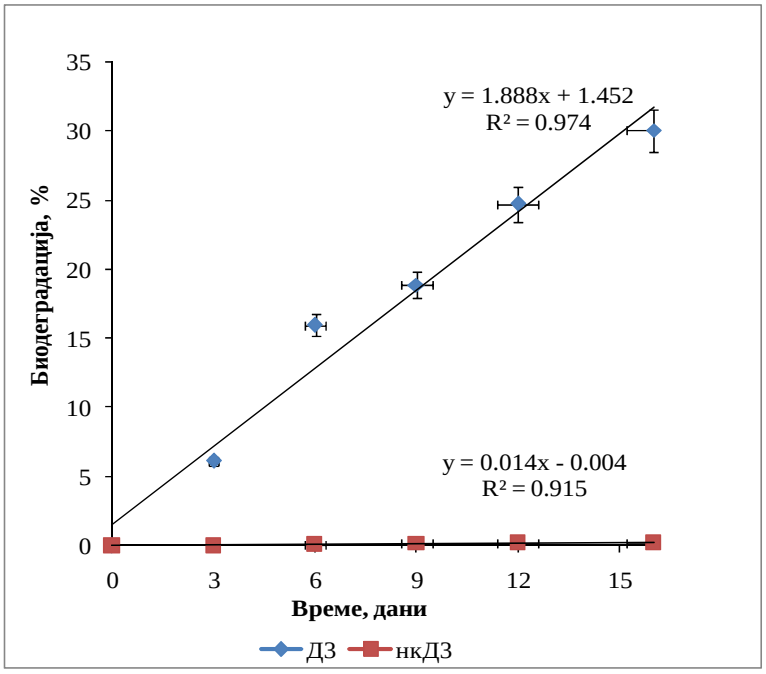
Графикон 5.2.6. Биомаса гљива у подлогама 16. дана

5.3. Проценат биодеградације анјонских компоненти детерџента и однос према укупној сувој биомаси

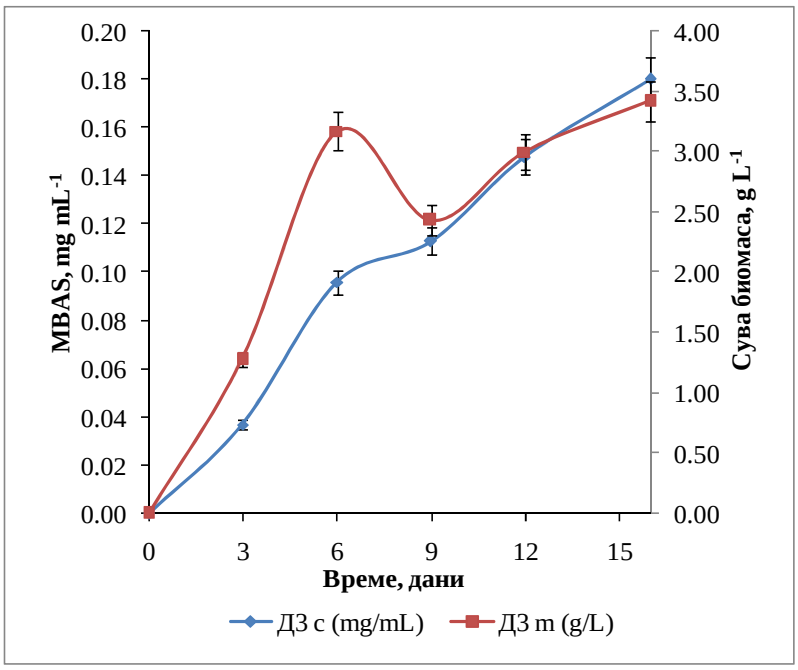
Многобројна истраживања су показала да гљиве имају способност биодеградације различитих ксенобиотичких једињења и да се успешно примењују у процесима биоремедијације контаминираних екосистема. Поред тога, биомаса гљива се показала ефикасном у адсорпцији различитих отпадних материја које се налазе у природи и бројна истраживања су усмерена у том правцу (Das *и сар*., 2008). У овом раду је испитивана способност разградње анјонских активних компоненти детерџента дејством гљива изолованих из канализационих и индустријских отпадних вода. Проценат смањења концентрације анјонских компоненти у подлози са детерџентом праћен је у односу на негативну контролу (абиотичку) да би се пратила стабилност детерџента током експеримента и процес адсорпције детерџента на зидове стакла (ерленмајера). Резултати су приказани на графиконима од 5.3.1. до 5.3.6.

Проценат биодеградације анјонских компоненти детерџента (а) и однос концентрације разграђених анјонских компоненти и суве биомасе гљиве (б) *Aspergillus niger* приказани су на графикону **5.3.1**.

Проценат биодеградације анјонских компоненти детерџента праћен је у подлози ДЗ. Почетна концентрација детерџента у подлози (3 mg mL^{-1}) смањивала се линеарно са растом и развојем мицелијума, тако да је 16. дана износила 2,1 mg mL^{-1}. То значи да је на крају експерименталног периода гљива разградила 30% укупне концентрације детерџента у подлози. Током прва 3 дана гљива је разградила најмању количину детерџента (6%). Међутим, значајно повећање процента биодеградације забележено је од 3. дана до 6. дана, када је гљива разградила 15,93% детерџента. У даљем току експеримента, од 6. дана до 16. дана проценат биодеградације се веома благо повећавао, и кретао се у следећем правцу: од 6. дана до 9. дана 18,34%, од 9. дана до 12. дана 24,75%, од 12. дана до 16. дана 30%. Укупна концентрација анјонских компоненти коју је гљива разградила на крају експерименталног периода износила је око 180,2 μg mL^{-1}. Из једначине регресионе криве, израчунато је да би гљива могла да разложи 80% почетне концентрације детерџента 0,3% за 41,6 дана.



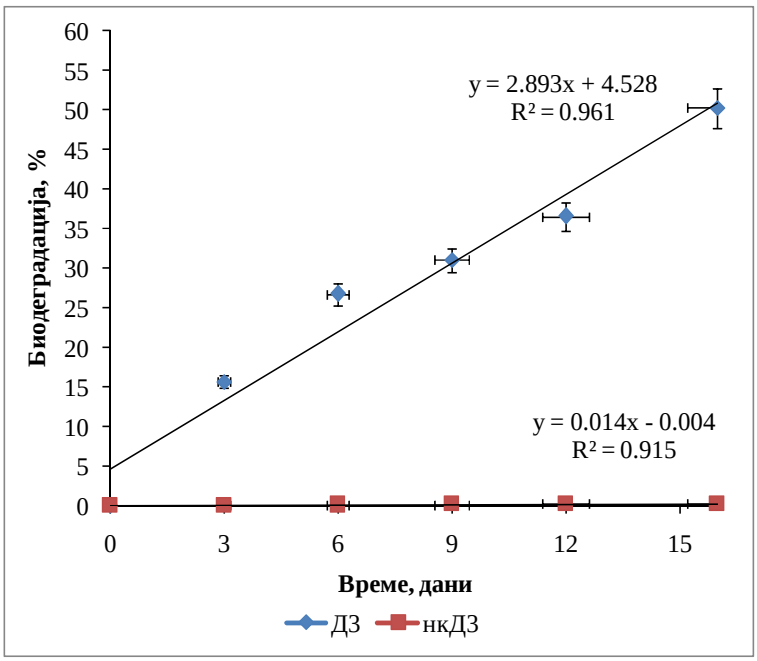
Графикон 5.3.1а. Биодеградација анјонских компоненти гљивом *A. niger*



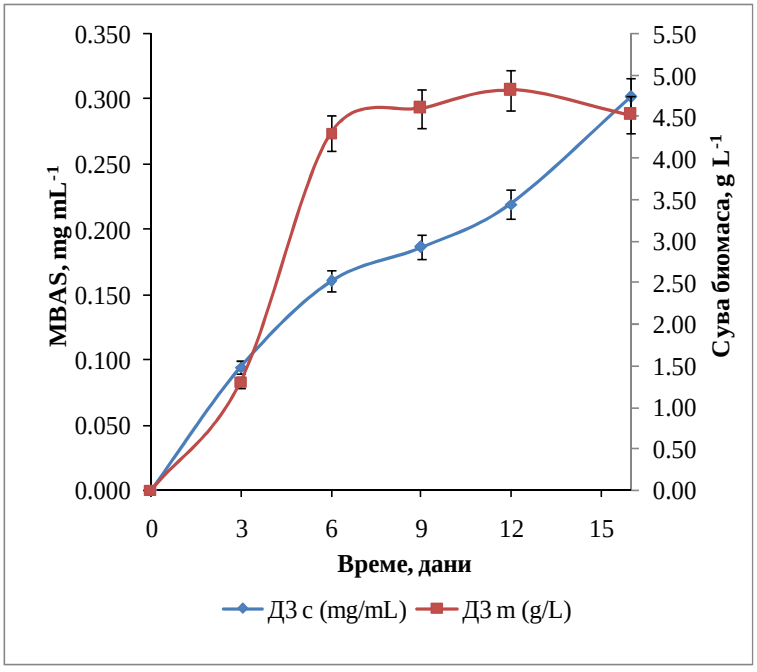
Графикон. 5.3.1б. Однос концентрације разграђених анјонских компоненти и суве биомасе *A. niger*

Проценат биодеградације анјонских компоненти детерџента (а) и однос концентрације разграђених анјонске компоненти и суве биомасе гљиве (б) *Penicillium chrysogenum* приказани су на графикону **5.3.2**.

Почетна концентрација детерџента у подлози ДЗ (3 mg mL^{-1}) смањивала се линеарно са растом и развојем мицелијума, тако да је 16. дана износила 1,51 mg mL^{-1}. На крају експерименталног периода гљива разградила 50,2% укупне концентрације детерџента у подлози. Током прва 3 дана гљива је разградила 15,63% детерџента, а старењем културе до 12. дана проценат биодеградације се благо повећавао. Од 3. дана до 6. дана гљива је разградила 26,73%, од 6. дана до 9. дана 31%, од 9. дана до 12. дана 36,57%. Међутим, у периоду од 12. дана до 16. дана забележено је знатно повећање процента деградације детерџента (од 36,57% до 50,2%). На крају експерименталног периода гљива је разградила око 301 μg mL^{-1} анјонских компоненти тестираног детерџента. Из једначине регресионе криве, израчунато је да би гљива могла да разложи 80% почетне концентрације детерџента 0,3% за 26,1 дан.



Графикон 5.3.2а. Биодеградација анјонских компоненти гљивом *P. chrysogenum*



Графикон 5.3.2б. Однос концентрације разграђених анјонских компоненти и суве биомасе *P. chrysogenum*

Проценат биодеградације анјонских компоненти детерџента (а) и однос концентрације разграђених анјонских компоненти детерџента и суве биомасе гљиве (б) *Penicillium cyclopium* приказани су на графикону **5.3.3.**

Проценат биодеградације анјонских компоненти детерџента праћен је у подлози ДЗ. Почетна концентрација детерџента у подлози (3 mg mL^{-1}) смањивала се линеарно са растом и развојем мицелијума, тако да је 16. дана износила 1,65 mg mL^{-1}. То значи да је на крају експерименталног периода гљива разградила 46,97% укупне концентрације детерџента у подлози. Током прва 3 дана раста гљива је разградила 9,63% детерџента, док је у развојном периоду од 3. дана до 6. дана разградила 21,40% детерџента. Значајније повећање процента биодеградације забележено је у експоненцијалној фази раста од 6. дана до 9. дана када је гљива разградила око 39,33% детерџента. Проценат биодеградације се незнатно повећавао старењем гљиве и кретао се у следећем правцу: од 9. дана до 12. дана 41,30 %, од 12. дана до 16. дана 46,97%.

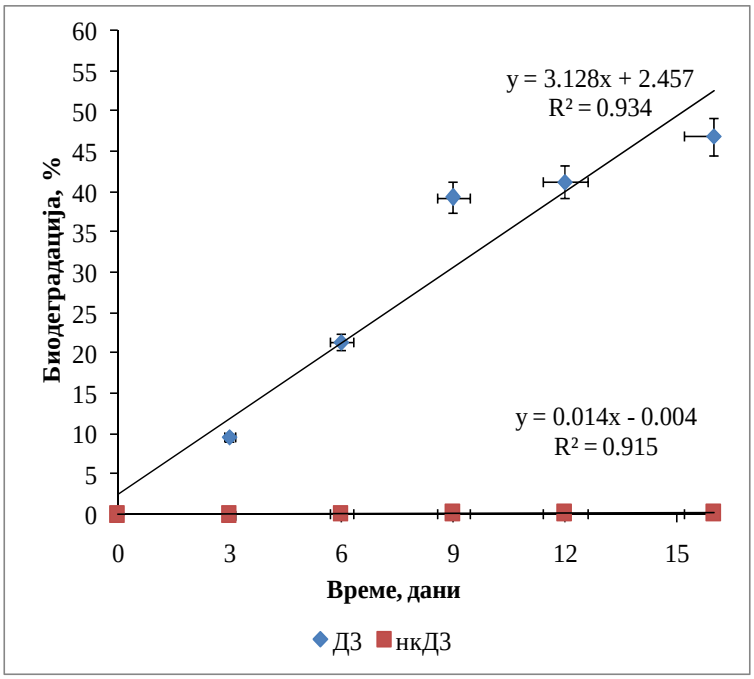
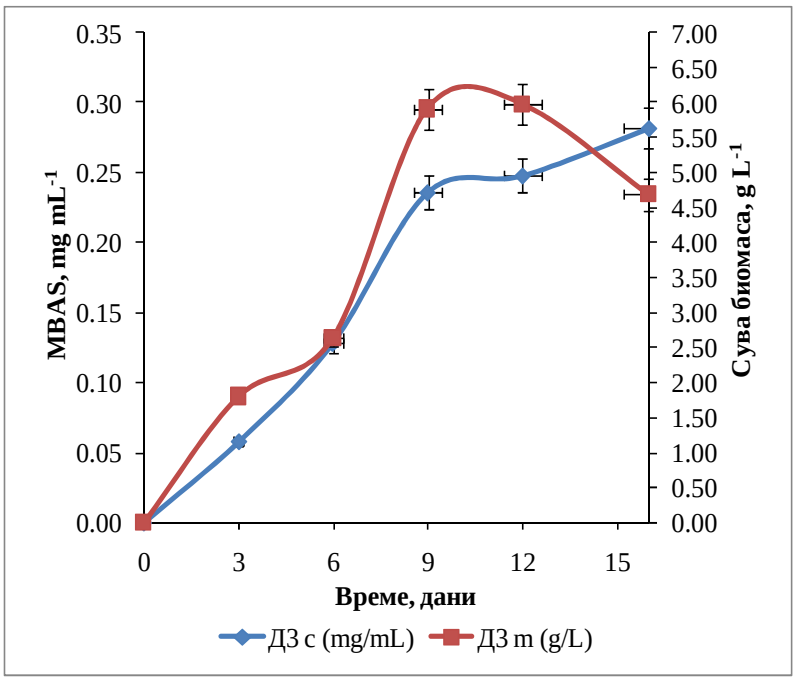


График 5.3.3а. Биодеградација анјонских компоненти гљивом *P. cyclopium*



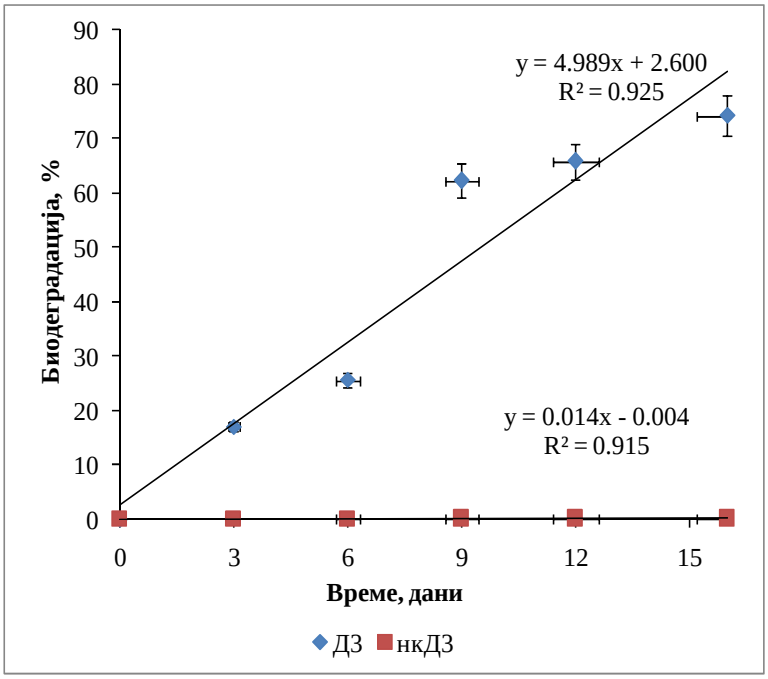
Графикон. 5.3.3б. Однос концентрације разграђених анјонских компоненти и суве биомасе *P. cyclopium*

Укупна концентрација анјонских компоненти коју је гљива разградила на крају експерименталног периода износила је 281,80 μg mL^{-1}. Из једначине регресионе криве, израчунато је да би гљива могла да разложи 80% почетне концентрације детерџента 0,3% за 24,8 дана.

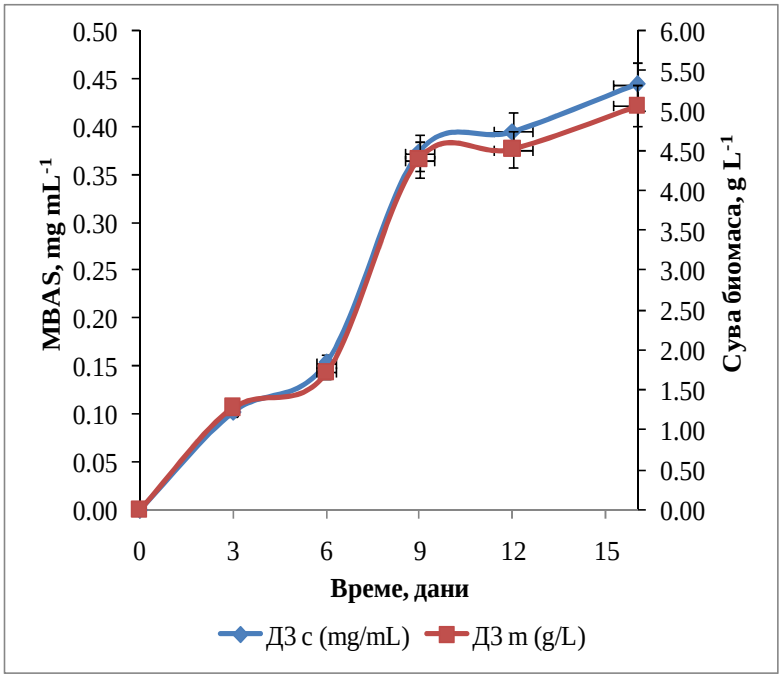
Проценат биодеградације анјонских компоненти детерџента (а) и однос концентрације разграђених анјонских компоненти детерџента и суве биомасе гљиве (б) *Trichoderma harzianum* приказани су на графикону **5.3.4**.

Почетна концентрација детерџента у подлози (3 mg mL^{-1}) смањивала се линеарно са растом и развојем мицелијума, тако да је 16. дана износила 800 mg mL^{-1}. На крају експерименталног периода гљива разградила 74,27% укупне концентрације детерџента у подлози. Током прва 3 дана гљива је разградила 17% детерџента, док је у периоду од 3. дана до 6. дана гљива разградила 25,62% детерџента. Значајније повећање процента биодеградације забележено је у експоненцијалној фази раста од 6. дана до 9. дана када је гљива разградила 62,23% детерџента. Проценат биодеградације

се веома благо повећавао старењем гљиве и кретао се у следећем правцу: од 9. дана до 12. дана 65,87%, од 12. дана до 16. дана 74,27%. Укупна концентрација анјонских компоненти коју је гљива разградила на крају експерименталног периода износила је око 445 μg mL^{-1}. Из једначине регресионе криве, израчунато је да би гљива могла да разложи 80% почетне концентрације детерџента 0,3% за 16,8 дана.



Графикон 5.3.4а. Биодеградација анјонских компоненти гљивом *T.harzianum*



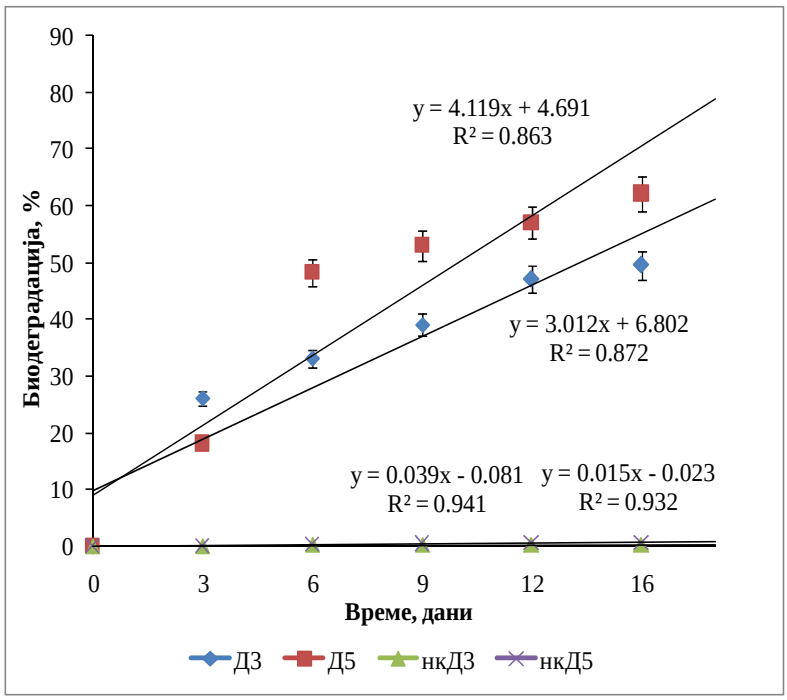
Графикон. 5.3.4б. Однос концентрације разграђених анјонских компоненти и суве биомасе *T. harzianum*

Проценат биодеградације анјонских компоненти детерџента (а) и однос концентрације разграђених анјонских компоненти детерџента и суве биомасе гљиве (б) *M. racemosus* приказани су на графикону **5.3.5**.

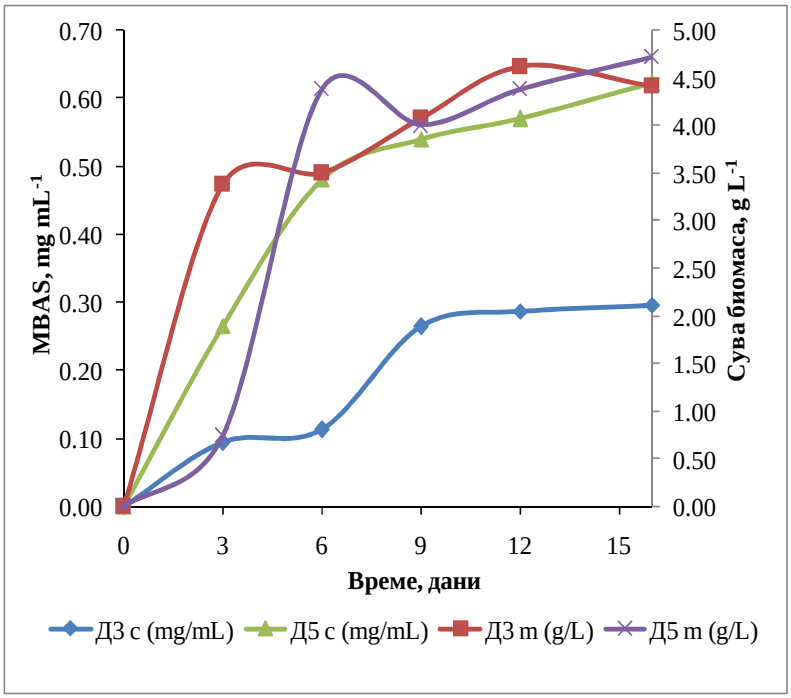
Биодеградација је праћена у течним хранљивим подлогама са додатком детерџента у концентрацији 0,3% (Д3) и 0,5% (Д5) које су инокулисане спорама гљиве. Истовремено су праћене две негативне контроле са детерџентом (нкД3 и нкД5) без спора (абиотичке). Обе негативне контроле су показале да је тестирани детерџент задржао хемијску стабилност у експерименталним условима. Разлике у проценту биодеградације између подлога биле су најизраженије у фази примарног експоненцијалног раста гљиве. Током прва 3 дана развоја мицелијума, гљива је разградила 26% и 18% почетне концентрације детерџента у подлогама Д3 и Д5. Међутим, од 3. дана до 6. дана, гљива је разложила само 7% детерџента у подлози Д3 и 30,16% детерџента у подлози Д5. Старењем културе, проценат биодеградације између подлога се благо повећавао, али су разлике између подлога биле мање изражене. На крају експерименталног периода (16. дана) гљива је разградила 49,50% и 62,20% детерџента у односу на негативне контроле (нкД3 и нкД5). У раној фази

раста, гљива *M. racemosus* разложила је мањи проценат детерџента у подлози Д5 (18%) али већу количину анјонских компоненти, у односу на подлогу Д3. Међутим, тежина суве биомасе мицелијума у подлози Д5 била је мања него у подлози Д3. Највероватније су токсични продукти деградације детерџента дошли у интеракцију са липидним компонентама ћелијске мембране, нарушавајући њену структуру и редукујући биомасу (Kagalwala и Kavitha, 2012). Упоредо са смањивањем концентрације детерџента у подлози Д5 биомаса се повећавала и знатна количина суве биомасе мицелијума измерена је 6. дана. Међутим, токсично дејство детерџента и смањење тежине биомасе поново је испољено 9. дана. Иако је гљива разложила двоструко већу количину анјонских компоненти у подлози Д5, укупна сува биомаса била је већа само 10% у односу на подлогу Д3, услед токсичног дејства детерџента на раст мицелијума.

Из једначине регресионе криве, израчунато је да би гљива могла да разложи 80% почетне концентрације детерџента 0,3% за 24,3 дана, односно 80% почетне концентрације детерџента 0,5% за 18,3 дана. Тестирани детерџент садржи око 20% анјонских компоненти. Када се концентрација анјонске компоненте изрази у mg mL^{-1} добија се да почетна концентрација ове компоненте износи 600 μg mL^{-1} и 1000 μg mL^{-1} у подлогама Д3 и Д5. У експерименталном периоду од 16 дана гљива је разградила око 300 μg mL^{-1} анјонске компоненте у подлози Д3 и око 620 μg mL^{-1} у подлози Д5. Већа концентрација разложених анјонских компоненти је у корелацији са већом сувом биомасом гљиве у подлози Д5.



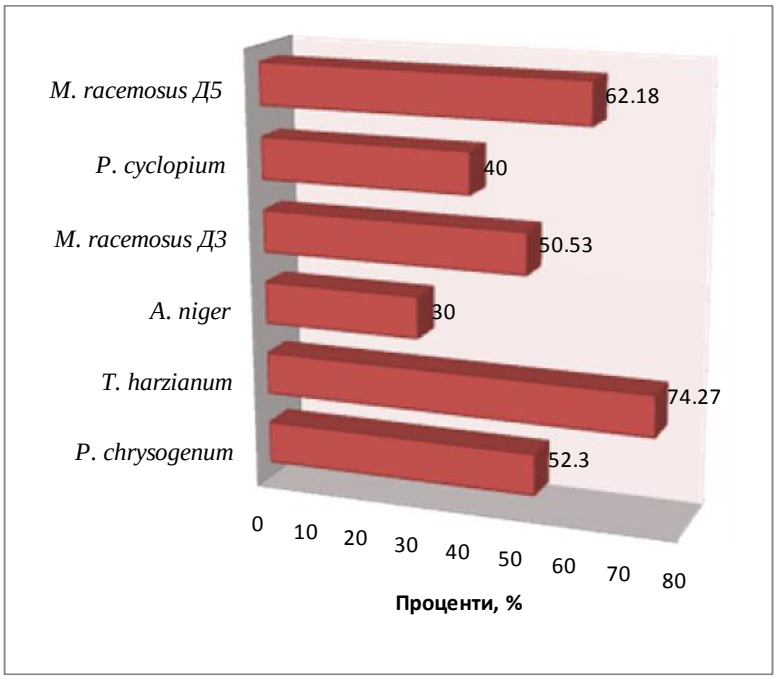
Графикон 5.3.5а. Биодеградација анјонских компоненти гљивом *Mucor racemosus*



Графикон. 5.3.4б. Однос концентрације разграђених анјонских компоненти и суве биомасе *Mucor racemosus*

На графикону **5.3.6** приказана биодеградациона способности изолованих врста гљива у подлогама са тестираним детерџентом. Биодеградациона способност гљива разликовала се у зависности од врсте гљиве и локалитета узорковања отпадних вода. Проценат биодеградације детерџента (0,3%) кретао се у следећем правцу: *Trichoderma* harzianum (74,27%) > *Penicillium chrysogenum* (50,2%) > *Mucor racemosus* (49,5%) > *Penicillium cyclopium* (46,97%) > *Aspergillus niger* (30%). Гљива *Mucor racemosus* је била веома ефикасна у биодеградацији тестираног детерџента 0,5% у огледном периоду од 16 дана (62,2%).

Гљиве *M. racemosus* и *T. harzianum,* изоловане из индустријских отпадних вода фабрике Хенкел, показе су се најотпорнијим на дејство детерџента вероватно као резултат адаптације на високе концентрације детерџента. Способност гљиве *Mucor racemosus* да расте и да се развија у подлози са 0,5% детерџентом, који је имао фунгицидно дејство на остале гљиве, вероватно је резултат морфо-физиолошких карактеристика спора и диморфизма гљиве.



Графикон 5.3.6. Биодеградациона способност гљива

Приказани резултати у овом истраживању слажу се резултатима других аутора који су потврдили да је проценат биодеградације сурфактаната у корелацији са

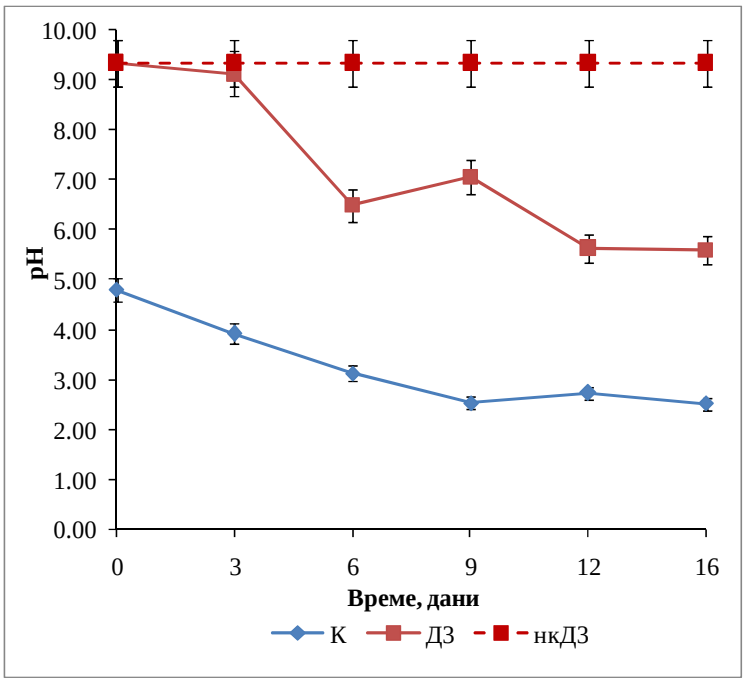
ћелијским растом (Velan *u cap*. 2012; Schleheck и Cook, 2005). Резултати биодеградације детерџента гљивом *M. racemosus* су компаративни са резултатима до којих су дошли Jerebkova *u cap.,* (1999). Поменути аутори су утврдили да културе *Pseudomonas* у континуираним биореакторима могу да смање ниво анјонских сурфактаната за 70% након 20 дана. Са друге стране, Schleheck *u cap*., (2003) дошли су до открића да *Citrobacter spp*. може да разгради око 90% анјонских компоненти након 35 h раста. Hosseini *u cap.,* (2007) су показали да врста *Acinetobacter johnsoni* може да искористи око 94% почетне концентрације SDS-а за време 5 дневног раста у подлози. Према Ojo и Oso (2008), две врсте бактерија MH1 и MH2 гајене на алкалној pH и собној температури разградиле су 93.6% и 84.6% почетне концентрације LAS-а за 5 дана. Amirmozafari *u cap.,* (2007) утврдили су да се највећи проценат деградације LAS-а поклапа са логаритамском фазом раста тестираних бактеријских врста. Резултати Garon *u cap.*, (2002) показали су да *Penicillium chrysogenum* добро подноси нејонске сурфактанте као што је Tween 80 (0.324×10^{-3} mol L^{-1}) и у његовом присуству гљива убрзава разградњу других полутаната попут флуорена са 28% на 61% након 2 дана. Резултати деградације сурфактаната дејством различитих бактерија који су описани у литератури су далеко бољи у поређењу са приказаним резултатима деградације детерџента у овом истраживању. Међутим, тестиране концентрације сурфактаната примењене у истраживањима на бактеријама су далеко мање. У овом истраживању коришћен је комерцијални детерџент анјонског типа, чији је састав веома сложен и садржи разне токсичне материје за разлику од чистих анјонских и нејонских компоненти примењених у студијама деградације са бактеријама.

5.4. Утицај детерџента на промене pH вредности хранљивих подлога

pH вредност хранљиве подлоге је веома важан параметар који заједно са редокс потенцијалом утиче на правилан раст и развој, морфо-физиолошке карактеристике и биохемијска својства микроорганизама. Оптимална спољашна pH вредност за раст гљива је у киселом интервалу, између 4,5 и 5, док је за клијање спора неопходно да pH буде изнад 5. Гљиве мењају pH средине у којој расту услед усвајања анјона или катјона из подлоге (Moore-Landecker, 1996; Griffin, 1994). Стога, промене pH вредности хранљивих подлога су резултат искоришћавања хранљивих материја из

подлоге и излучивања примарних и секундарних метаболита (Orlowski, 1991). Смањење pH подлоге је уобичајена одлика многих врста гљива као што су *Glomus intraradices* (Bago и *cap*., 1996), *Fusarium oxysporum* (Srivastava *и cap*., 2011) и др., током интензивног развоја мицелијума. У овом истраживању праћене су промене pH вредности течних подлога у којима су гљиве гајене од момента инокулације до краја огледа, а резултати су приказани на графиконима од 5.4.1. до 5.4.5.

Графикон **5.4.1.** приказује промене pH вредности ферментационе течности хранљивих подлога током раста и развоја гљиве *Aspergillus niger*.

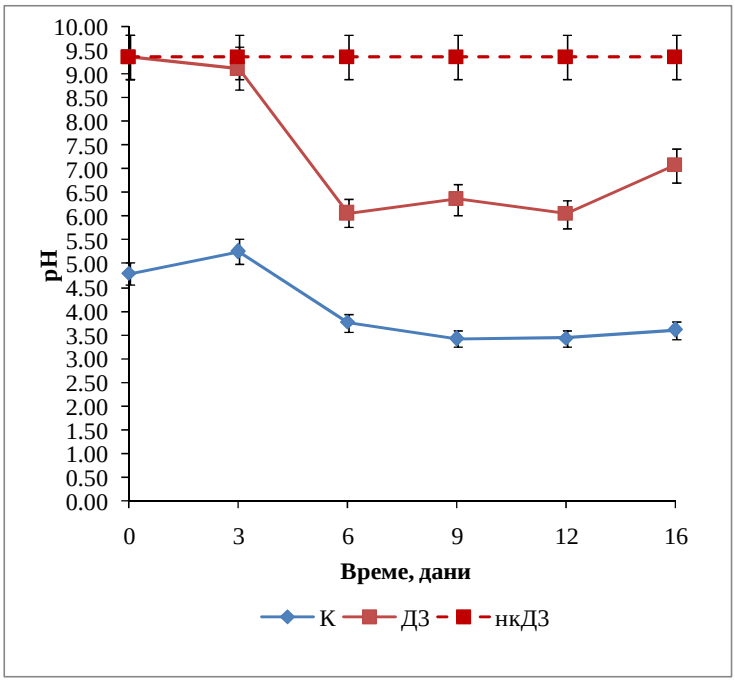


Графикон 5.4.1. Промене pH вредности ферментационе течности *A. niger*

Почетна pH вредност подлога пре инокулације спорама износила је 4,80 у контроли, 9,35 у подлози ДЗ. pH вредност течне Чапекове подлоге (К) смањивала се током раста и развоја гљиве и кретала се ка јако киселој средини. Највеће смањење pH вредности (са 4,80 на 2,53 јединице) забележено је у периоду од инокулације до 9. дана, а најмање промене су забележене у периоду од 9. до 16. дана. У подлози ДЗ, pH вредност се смањивала током развоја мицелијума, изузев у фази аутолизе када се pH вредност незнатно повећала. Највеће смањење pH вредности забележено је у примарној експоненцијалној фази раста (са 9,13 на 6,49 јединица) од 3. дана до 6.

дана, а нешто мање промене су забележене у секундарној експоненцијалној фази раста (са 7,06 на 5,63 јединица) од 9. дана до 12. дана. Уношењем детерџента у хранљиву подлогу дошло је до статистички значајних промена pH средине.

Промене pH вредности ферментационе течности током раста и развоја мицелијума *Penicillium chrysogenum* од момента инокулације до 16. дана, приказане су на графикону **5.4.2**.

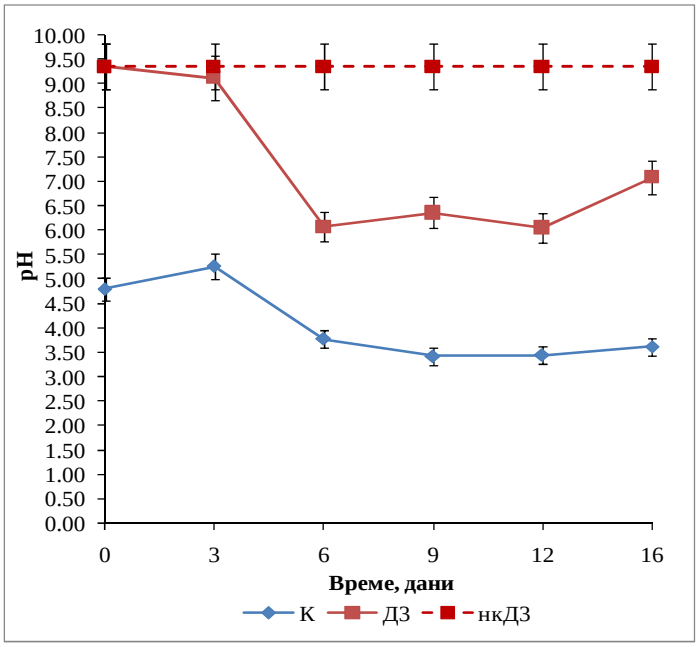


Графикон 5.4.2. Промене pH вредности ферментационе течности *P. chrysogenum*

Промене pH вредности течних подлога током раста гљиве мерене су у контролној Чапековој подлози (К), у подлози са детерџентом 0,3% концентрације (ДЗ) и у негативној контроли са детерџентом (нкДЗ). pH вредност К подлоге повећавала се од тренутка инокулације до 3. дана, а смањивала се током фазе експоненцијалног раста и стационарне фазе. Највеће смањење pH вредности (са 5,26 на 3,77 јединице) забележено је у периоду од 3. дана до 6. дана. Од почетка аутолизе до краја експеримента, pH вредност се није значајније мењала. pH вредност подлоге са детерџентом (ДЗ) смањивала се од момента инокулације до 6. дана. Највеће смањење pH вредности (са 9,12 на 6,06 јединице) забележено је током

експоненцијалне фазе раста (од 3. дана до 6. дана). Уласком у стационарну фазу промене pH су биле мање изражене. Међутим, почетком аутолизе pH вредност се повећавала и кретала се ка неутралној средини. Уношењем детерџента у хранљиву подлогу дошло је до статистички значајних промена pH средине.

Графикон **5.4.3.** приказује промене pH вредности ферментационе течности током раста и развоја гљиве *Penicillium cyclopium* од момента инокулације до 16. дана.

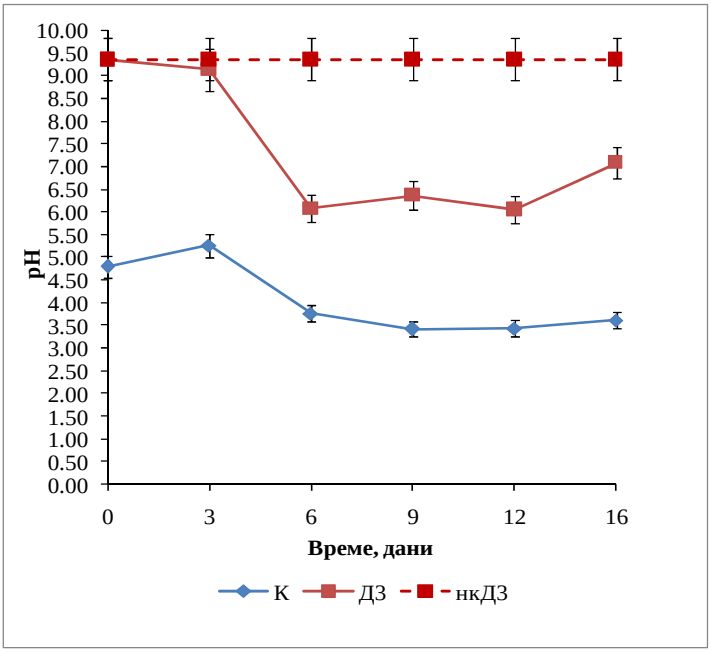


Графикон 5.4.3. Промене pH вредности ферментационе течности *P. cyclopium*

pH вредност течне Чапекове подлоге (К) повећавала се током раста и развоја гљиве и кретала се ка неутралној или слабо киселој средини. Најзначајније повећање pH вредности (са 4,80 на 6,68 јединица) забележено је у периоду експоненцијалног раста, од инокулације до 6. дана. Уласком у стационарну фазу ове промене су биле незнатне, а највеће промене pH у правцу смањења забележене су почетком аутолизе (са 6,92 на 5,63 јединица). У подлози ДЗ, pH вредност се смањивала током читавог експерименталног периода. Најмање промене pH вредности су забележене у почетној фази развоја мицелијума, а највеће у фази експоненцијалног раста (са 8,75 на 6,33 јединица), од 6. дана до 9. дана. Преласком у стационарну фазу промене су биле мање

изражене. У периоду од 9. дана до 16. дана, pH вредности обе хранљиве подлоге биле су веома уједначене.

Промене pH вредности ферментационе течности током раста и развоја мицелијума *Trichoderma harzianum* од момента инокулације до 16. дана, приказане су на графикону **5.4.4**.

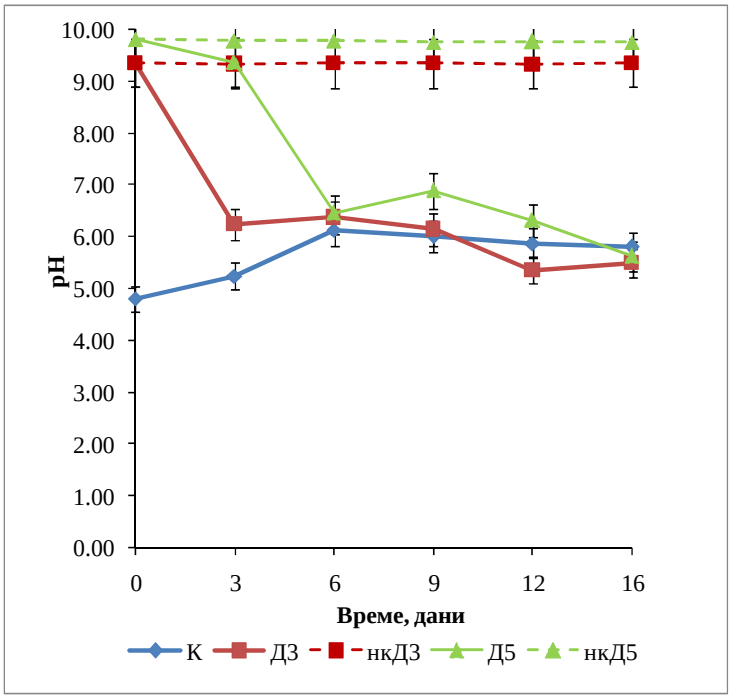


Графикон 5.4.4. Промене pH вредности ферментационе течности *T. harzianum*

pH вредност течних подлога мерена је у контролној Чапековој подлози (К), у подлози са детерџентом 0,3 % концентрације (ДЗ) и у негативној контроли са детерџентом (нкДЗ). Највеће промене pH вредности у К подлози забележене су током фазе експоненцијалног раста; највеће повећање pH вредности регистровано је током прва 3 дана развоја мицелијума (са 4,80 на 5,40 јединице), а највеће смањење у периоду од 3. дана до 6. дана (са 5,40 на 4,82 јединице). Мање промене pH вредности у овој подлози су регистроване током стационарне фазе и аутолизе. pH вредност течне подлоге ДЗ смањивала се током читавог експерименталног периода. Најмање промене pH вредности у овој подлози су забележене у почетној фази развоја гљиве, од инокулације до 6. дана. Међутим, највеће промене pH вредности измерене су у

фази експоненцијалног раста, од 6. дана до 9. дана (са 9,05 на 6,07 јединица). Уласком у стационарну фазу, промене pH вредности су биле минималне.

Графикон **5.4.5.** приказује промене pH вредности ферментационе течности током раста и развоја гљиве *Mucor racemosus* од момента инокулације до 16. дана.



Графикон 5.4.5. Промене pH вредности ферментационе течности *M. racemosus*

Почетна pH вредност подлога пре инокулације спорама износила је 4,80 у контроли, 9,35 у подлози Д3 и 9,80 у подлози Д5. pH вредност хранљивих подлога мењала се током експеримента у зависности од састава подлоге, концентрације детерџента у подлози и фаза раста гљиве. pH вредност контролне подлоге (К) повећавала се од тренутка инокулације до 6. дана, а смањивала се благо током стационарне фазе и аутолизе. Супротно, pH вредност подлога са детерџентом смањивала се током експоненцијалне фазе раста. Највеће смањење pH вредности забележено је у подлози Д3, у периоду од инокулације до 3. дана (са 9,35 на 6,24 јединице) и у подлози Д5 у периоду од 3. дана до 6. дана (са 9,36 на 6,46 јединице), што је у корелацији са примарном експоненцијалном фазом раста. Промене pH вредности биле су мање изражене у секундарној експоненцијалној фази раста.

Интересантно, крајње pH вредности различитих подлога биле су веома сличне упркос томе што су почетне pH вредности биле значајно различите. Ови резултати указују да гљива има добро развијен механизам регулације pH средине.

5.5.Утицај детерџента на промене редокс потенцијала хранљивих подлога

Као и pH вредност, редокс потенцијал такође утиче на активност ензима и укупну биомасу гљива. Познато је да редокс потенцијал регулише неке ензиме укључене у метаболизам скроба, нпр, тиоредоксин контролише активност ADP-глукозо пирофосфорилазе (Ballicora *и сар.,* 2000; Hendriks *и сар.*, 2003), активност и везивање *α*-глукана, дикиназе (SEX1) у гранулама скроба (Mikkelsen *и сар.,* 2005) и највероватније активност *β*-амилазе (Balmer *и сар.,* 2003). Сахароза у контролној подлози хидролизује дејством инвертаза на глукозу и фруктозу. Ове хексозе се најчешће транспортују у ћелију фосфотрансферазним системом и катаболизују до пирувата чија даља судбина зависи од присуства кисеоника. Са акцептором електрона, NADH створен у гликолизи и TCA циклусу може да се оксидује оксидативном фосфорилацијом (Clark, 1989). Алтернативно, у одсуству кисеоника или другог погодног акцептора електрона, ферментација је одговорна за продукцију ATP супстратним нивоом фосфорилације (Farmer и Lio, 1997). Многобројна истраживања су показала да се највеће промене редокс потенцијала дешавају током експоненцијалне фазе раста, када се одвијају најинтензивнији метаболички процеси (Kukec *и сар*., 2002). Праћење редокс потенцијала током раста микроорганизама даје јасну слику о оксидативном статусу у подлози, у којој се дешавају различите метаболичке реакције.

На графикону **5.5.1.** приказане су промене редокс потенцијала у ферментационој течности хранљивих подлога током раста гљиве *Aspergillus niger* од транутка инокулације до 16. дана.

Почетне вредности редокс потенцијала течних подлога пре инокулације износиле су 340 mV у контроли, и 80 mV у подлогама ДЗ и нкДЗ. У контролној подлози вредности редокс потенцијала кретале су се у правцу смањења од момента инокулације до краја експеримента, са изузетком од 3. дана до 6. дана. Најзначајније

промене редокс потенцијала забележене су од момента инокулације до 3. дана и од 6. дана до 12. дана. За разлику од контролне подлоге, вредности редокс потенцијала у подлози ДЗ кретале су се у правцу повећања од момента инокулације до 9. дана. Статистички најзначајније промене редокс потенцијала забележене су у фази екпоненцијалног раста.

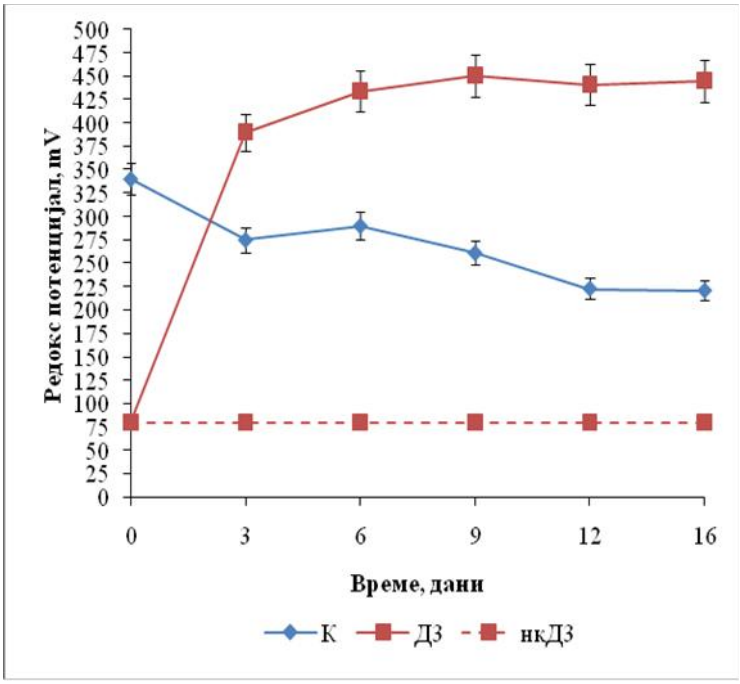


График 5.5.1. Промене редокс потенцијала *A. niger*

На графикону **5.5.2.** приказане су промене редокс потенцијала у ферментационој течности током раста гљиве *Penicillium chrysogenum* у контролној подлози и у подлози са детерџентом 0,3% концентрације.

Током експерименталног периода није било промена редокс потенцијала у негативној контроли. У контролној Чапековој подлози и подлози ДЗ, вредности редокс потенцијала мењале су се у зависности од састава подлоге и периода култивације гљиве, слично променама pH. Највеће промене редокс потенцијала у контролној подлози забележене су у периоду од инокулације до 6. дана. У почетној фази раста гљиве дошло је до благог пада редокс потенцијала (3. дана) а затим до наглог повећања у еспоненцијалној фази раста (6. дана). Током стационарне фазе и аутолизе дошло је благих промена редокс потенцијала али оне нису биле статистички значајне. У подлози ДЗ, вредности редокс потенцијала су се кретале у правцу

повећања од инокулације до 16. дана. Изузетак је забележен само у периоду од 9. дана до 12. дана, када је дошло до смањења вредности редокс потенцијала. Највеће промене редокс потенцијала у овој подлози десиле су се у периоду од 3. дана до 6. дана и од 12. дана до 16. дана.

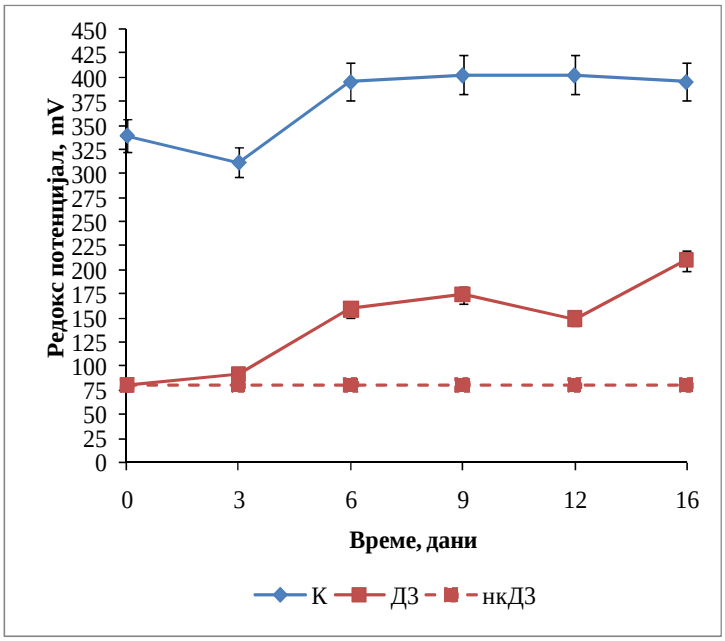


График 5.5.2. Промене редокс потенцијала *P. chrysogenum*

На графикону **5.5.3.** приказане су промене редокс потенцијала у ферментационој течности током раста гљиве *Penicillium cyclopium* у контролној подлози и у подлози са детерџентом 0,3% концентрације.

Вредности редокс потенцијала су се мењале током читавог периода култивације гљиве у контролној подлози и у подлози ДЗ. Највеће промене редокс потенцијала у контроли забележене су у првих 6 дана култивације гљиве, када је дошло до наглог смањења редокс потенцијала. Међутим, вредности редокс потенцијала су се смањивале и током стационарне фазе од 6. дана до 9. дана, али те промене нису биле статистички значајне. Једино значајно повећање редокс потенцијала у овој подлози забележено је од 9. дана до 12. дана и поклапа се са фазом аутолизе. У подлози ДЗ, вредности редокс потенцијала су се повећавале од тренутка инокулације до 12. дана. Статистички значајне промене редокс потенцијала забележене су у периоду од 6. до 9. дана. Смањење редокс потенцијала забележено је

од 12. до 16. дана, као и у контроли. У овом периоду вредности редокс потенцијала биле су веома сличне у обе подлоге.

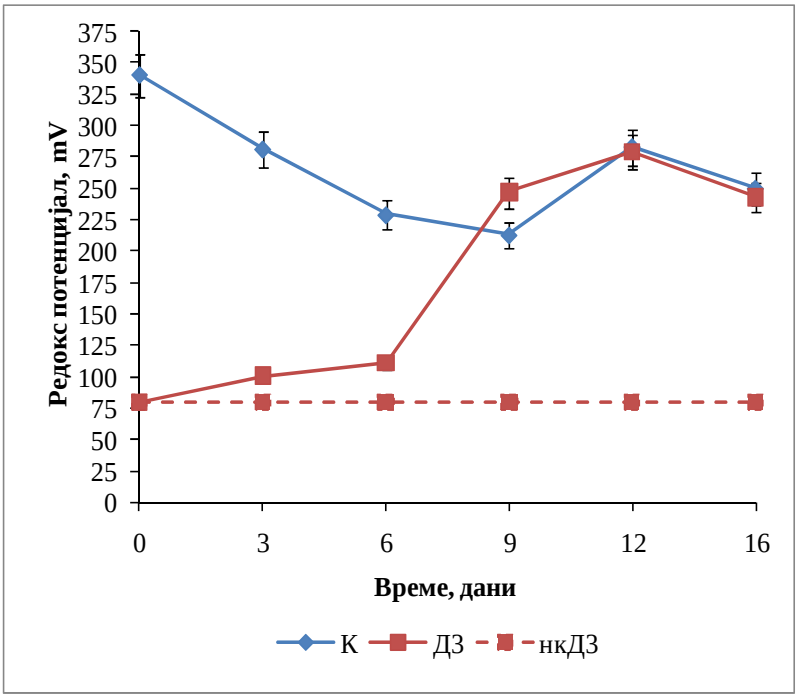


График 5.5.3. Промене редокс потенцијала *P. cyclopium*

На графикону **5.5.4.** приказане су промене редокс потенцијала у ферментационој течности током раста гљиве *Trichoderma harzianum* у контролној подлози и у подлози са детерџентом 0,3% концентрације.

Вредности редокс потенцијала у контролној подлози имале су тенденцију опадања од момемта инокулације до краја експеримента, са изузетком од 3. дана до 6. дана, када је дошло до благог повећања редокс потенцијала. Најзначајније промене редокс потенцијала забележене су у периоду од инокулације до 3. дана, и у периоду од 6. дана до 12. дана. Супротно, вредности редокс потенцијала у подлози ДЗ имале су тенденцију раста током читавог периода култивације гљиве. Благе промене редокс потенцијала забележене су у периоду од инокулације до 6. дана, а статистички најзначајне промене забележене су од 6. дана до 9. дана.

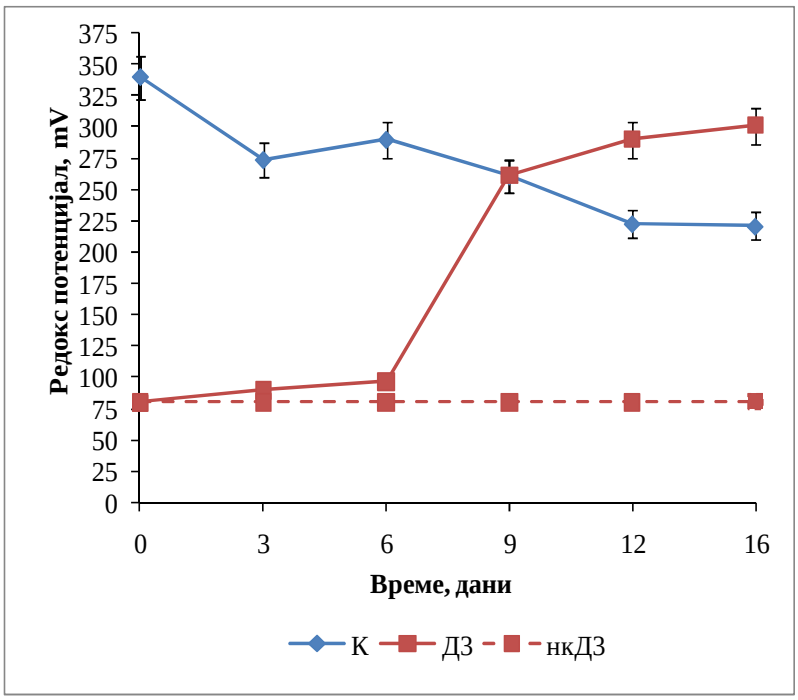


График 5.5.4. Промене редокс потенцијала *T. harzianum*

На графикону **5.5.5** приказане су промене редокс потенцијала у ферментационој течности током раста гљиве *Mucor racemosus* у контролној подлози и у подлогама са детерџентом 0,3% и 0,5% концентрације.

Вредности редокс потенцијала хранљивих подлога мењале су се у зависности од њиховог састава и фаза раста гљиве. Најзначајније промене редокс потенцијала забележене су у првих 6 дана култивације гљиве у све три хранљиве подлоге. У контролној подлози, вредности редокс потенцијала су се нагло смањивале током експоненцијалног раста, од инокулације до 6. дана, а незнатно су се повећавале током стационарне фазе и аутолизе. У подлози ДЗ, вредности редокс потенцијала су се повећавале од момента инокулације до краја огледа. Статистички најзначајније промене забележене су у експоненцијалној фази раста (3. дана) и од 9. дана до 12. дана. У подлози Д5, вредности редокс потенцијале су се повећавале од момента инокулације до краја огледа, са изузетком од 6. дана до 9. дана. Статистички најзначајније промене у овој подлози забележене су у периоду од 3. до 6. дана и у периоду од 9. дана до 16. дана.

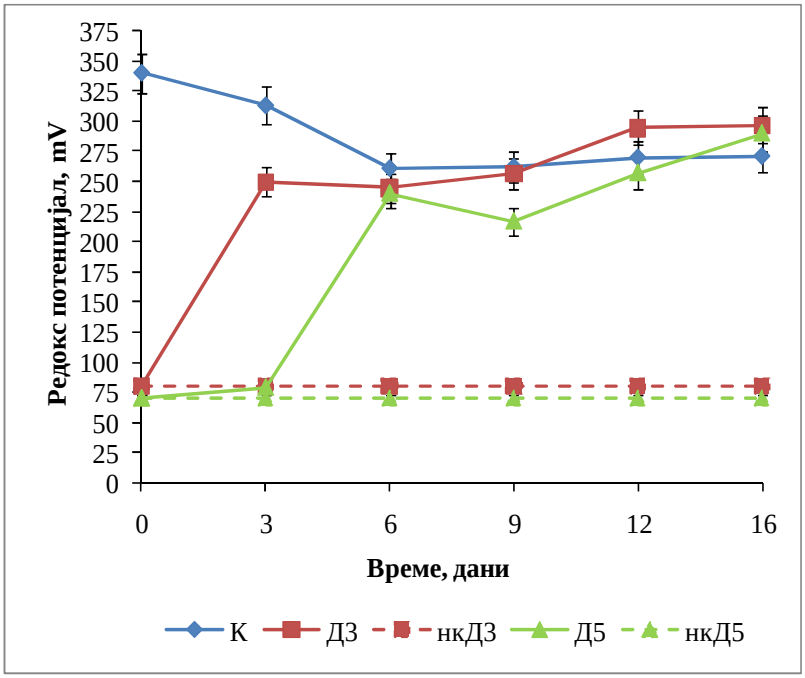


График 5.5.5. Промене редокс потенцијала *M. racemosus*

5.6. Продукција слободних и укупних органских киселина

Органске киселине представљају кључни фактор алкалне толеранције, посебно интрацелуларне јонске хомеостазе. Када је унутрашња pH већа од спољашње (изнад pK_a), органске киселине постоје у дисосованом облику у цитоплазми што доводи до пораста унутрашње киселости. Ове киселине се излучују у екстрацелуларну средину и смањују спољашњу pH. Концентрација слободних органских киселина (титрациона киселост) одговара броју протона који се неутралишу јаким базама у процесу титрације. Међутим, органске киселине постоје и у везаном облику. Збир количине слободних и везаних органских киселина представља количину укупних органских киселина. Према Strasser *и cap.*, (1994) садржај свих органских киселина повећава се значајно за време алкалног стреса. Према Wang *и cap*, (1999) у условима алкалног стреса, количина неорганских анјона се смањује што изазива већу акумулацију органских киселина, посебно малата и цитрата. Када је сахароза у подлози једини извор угљеника, сирћетна киселина је доминанта у пулу слободних органских киселина. Wang *и cap*., (1999) су показали да сирћетна, пропионска, изовалеријанска киселина доминантне киселине у процесу дигестије активног муља.

У овом истраживању испитивана је концентрација слободних и укупних органских киселина у различитим фазама развоја гљива у контролној подлози и подлози са детерџентом, а резултати су приказани графиконима од 5.6.1. до 5.6.6.

Концентрације слободних и укупних органских киселина гљиве *Aspergilus niger* у ферментационој течности контролне подлоге и подлози ДЗ које је гљива продуковала током свог раста, представљена је на графикону **5.6.1.**

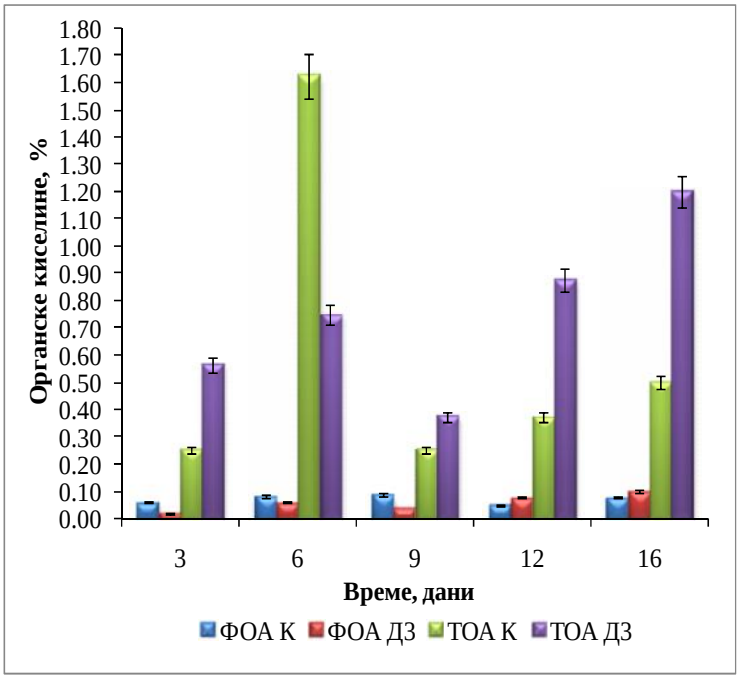


График 5.6.1. Слободне (ФОА) и укупне (ТОА) органске киселине *A. niger*

Концентрација ТОА коју је гљива продуковала током раста и развоја у хранљивим подлогама била је променљива у зависности од састава подлоге и фазе развића гљиве. У раној фази раста (3. дана), концентрација ТОА била је двоструко већа у подлози ДЗ у односу на контролу. Супротан ефекат је забележен 6. дана, током експоненцијалног раста гљиве, када је двоструко већа количина ФОА измерена у К подлози. Међутим, уласком гљиве у стационарну фазу и током аутолизе, концентрација киселина се драстично смањила у контроли. У подлози ДЗ, гљива је продуковала најмању количину ФОА (0,38%) током аутолизе (9. дана) али се ова количина повећавала паралелно са растом мицелијума и била је максимална 16. дана (1,2%).

На графикону **5.6.2**. приказане су концентрације слободних и укупних органских киселина које је продуковала гљива *Penicillium chrysogenum* у ферментационој течности током раста у контролној подлози и ДЗ подлози.

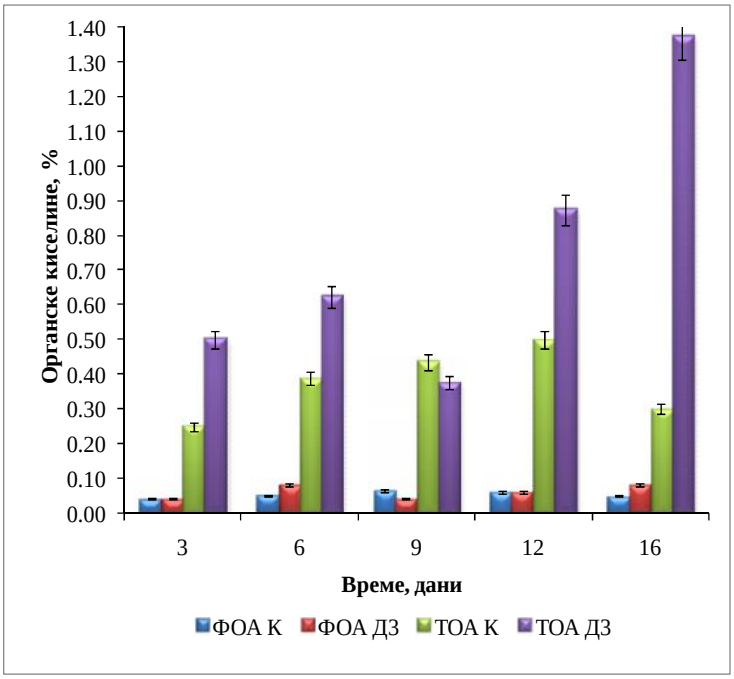


График 5.6.2. Слободне (ФОА) и укупне (ТОА) органске киселине *P.chrysogenum*

Концентрација слободних органских киселина (ФОА) се повећавала у К подлози за време експоненцијалног раста од 0,04% до 0,08%, што представља максималну концентрацију ФОА у овој подлози. Уласком гљиве у стационарну фазу концентрација ФОА се благо смањивала све до почетка аутолизе када се концентрација киселина поново повећала. Максималну количину ФОА у подлози ДЗ гљива је продуковала 6. дана и 12. дана, и ове вредности су нешто веће од максималних вредности измерених у К подлози. Значајно смањење концентрације ФОА у подлози ДЗ измерено је у раној и касној стационарној фази.

Концентрација укупних органских киселина (ТОА) у контролној подлози била је максимална у фази експоненцијалног раста, 9. дана. Међутим, старењем гљиве продукција ТОА се незнатно смањивала. Супротан ефекат је забележен у подлози ДЗ. Старењем гљиве укупна киселост се повећавала, нарочито у периоду од 12. дана до

16. дана. Максимална девијација између подлога је забележена 16. дана, када је концентрација ТОА била око 4 пута већа у подлози ДЗ у односу на контролу.

Концентрације слободних и укупних органских киселина гљиве *Penicillium cyclopium* у ферментационој течности контролне подлоге и подлоге ДЗ, представљена је на графикону **5.6.3.**

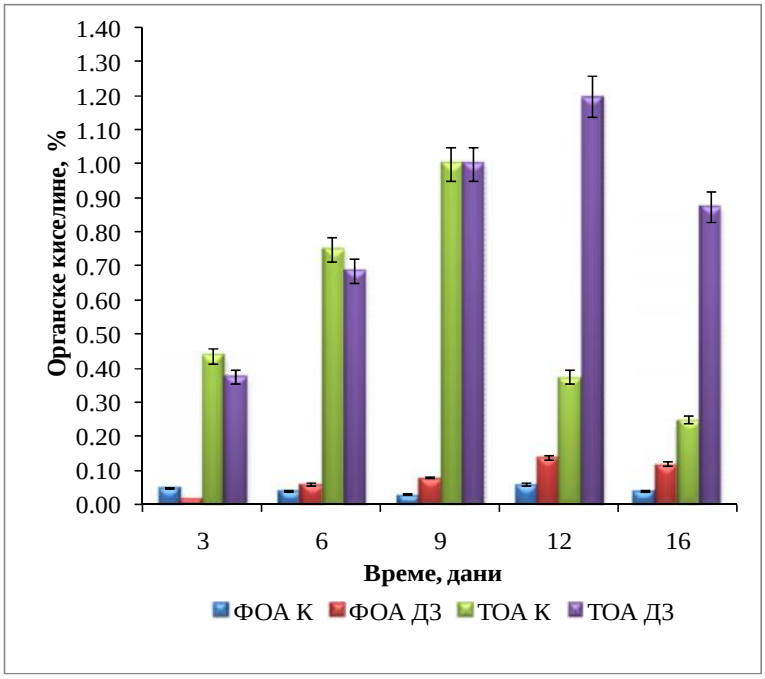


График 5.6.3. Слободне (ФОА) и укупне (ТОА) органске киселине *P.cyclopium*

Концентрација ФОА у К подлози благо се смањивала током експонцијалног раста, и била је у корелацији са порастом pH вредности контролне подлоге. Највеће промене концентрације ФОА су забележене почетком аутолизе, од 9. дана до 12. дана, када се концентрација ФОА удвостручила (од 0,03% до 0,06%). У подлози ДЗ, концентрација ФОА се повећавала паралелно са растом мицелијума, а највеће промене су забележене од 9. дана до 12. дана (од 0,08% до 0,14%).

Концентрација ТОА коју је гљива продуковала током раста и развоја у хранљивим подлогама била је променљива у зависности од састава подлоге и фазе развића гљиве. У контролној подлози, концентрација ТОА се повећавала равномерно током екпоненцијалног раста и највећа је била у стационарној фази (1,0%), 9. дана. Почетком аутолизе (12. дана), дошло је до наглог смањења концентрације ТОА, а 16.

дана концентрација је била 4 пута мања у односу на максималну вредност. У подлози ДЗ, најмања количина ТОА је измерена 3. дана, али се она значајно повећавала током експоненцијалног раста до 9. дана. Највећа количина ТОА (1,2%) је измерена 12. дана, у стационарној фази. Гљива је продуковала већу количину ТОА у подлози ДЗ у односу на контролу.

Концентрације слободних и укупних органских киселина гљиве *Trichoderma harzianum* у ферментационој течности контролне подлоге и подлози ДЗ, представљена је на графикону **5.6.4.**

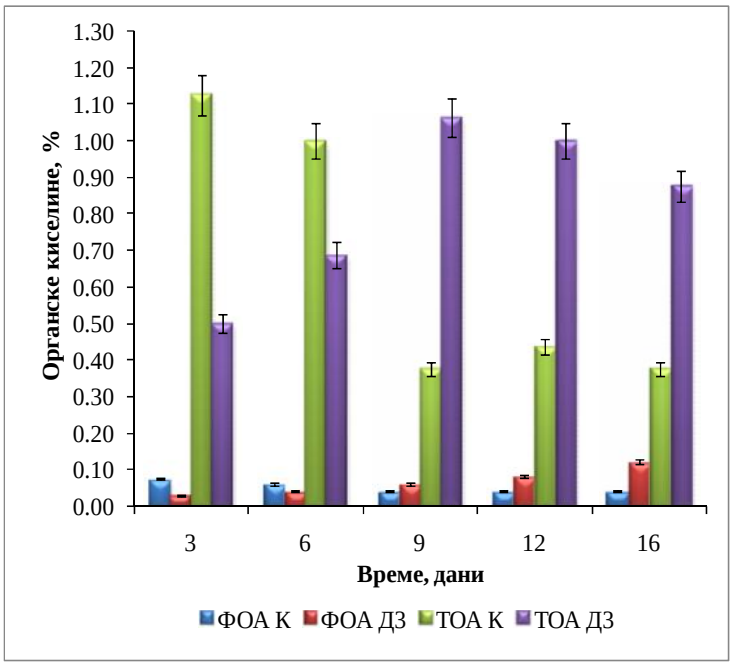


График 5.6.4. Слободне (ФОА) и укупне (ТОА) органске киселине *T.harzianum*

Концентрација ФОА у К подлози смањивала се током читавог експерименталног периода, упоредо са опадањем pH вредности контролне подлоге. Најмање промене концентрације ФОА су измерене у раној фази раста, од 3. дана до 6. дана, а незнатно веће промене у касној експоненцијалној фази, од 6. дана до 9. дана. Од почетка стационарне фазе до краја експерименталног периода нису забележене промене концентрације ФОА. У подлози ДЗ, концентрација ФОА се повећавала током читавог експериманталног периода, упоредо са опадањем pH подлоге. Најмања

концентрација ФОА (0,03%) је забележена 3. дана, а највећа (0,12%) 16. дана. Гљива је продуковала око 1,5 пута већу количину ФОА у подлози Д3 у односу на контролу.

Гљива је продуковала различиту концентрацију ТОА током раста и развоја у хранљивим подлогама у зависности од састава подлоге и фазе развића гљиве. У фази експоненцијалног раста, гљива је продуковала највећу концентрацију ТОА (1,13%) у контролној подлози. Преласком из експоненцијалне у стационарну фазу концентрација ТОА се смањила око 2,5 пута, и до краја експерименталног периода се није битније мењала. Продукција ТОА у подлози Д3 се повећавала паралелно са растом мицелијума. Највеће повећање концентрације ТОА (од 0,69% до 1,06%) забележено је у фази експоненцијалног раста, од 6. дана до 9. дана. У стационарној фази је дошло до благог смањења продукције ТОА. Максималне вредности ТОА које је гљива продуковала у обе подлоге биле су веома уједначене.

Концентрације слободних и укупних органских киселина гљиве *Mucor racemosus* у ферментационој течности контролне подлоге и подлогама Д3 и Д5 које је гљива продуковала током свог раста, представљена је на графикону **5.6.5**.

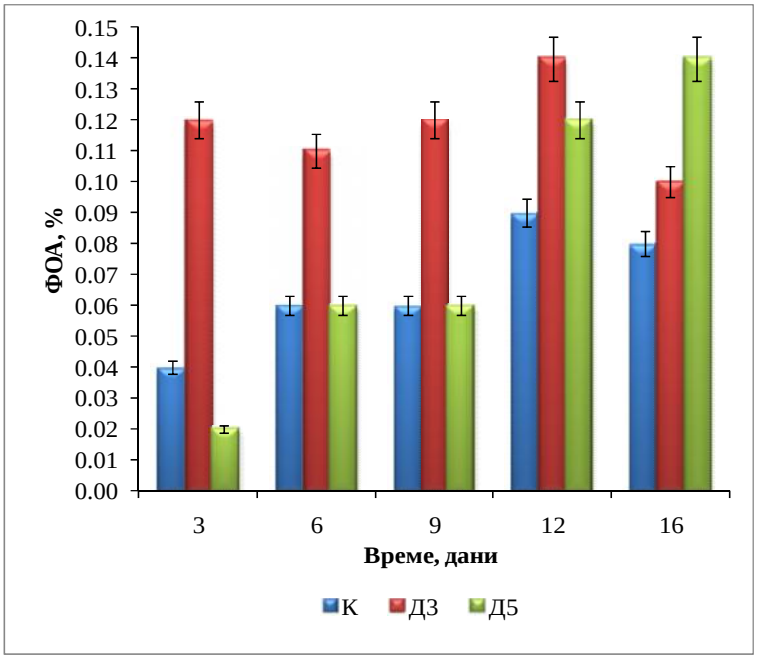


График 5.6.5а. Слободне (ФОА) органске киселине *M.racemosus*

Концентрација ФОА у ферментационој течности повећавала се благо или знатно старењем мицелијума, у зависности од састава подлоге. Количина ФОА у К

подлози повећавала се током експоненцијалне фазе раста од 0,04% до 0,06%, и почетком аутолизе од 0,06% до 0,09%. Концентрација ФОА коју је гљива продуковала у подлози Д3 била је знатно већа у односу на контролу. Највећа количина ФОА у овој подлози (0,14%) измерена је за време секундарне експоненцијалне фазе раста, 12. дана. Највеће одступање количине ФОА било је у Д5 подлози у односу на остале две подлоге. Концентрација ФОА се повећавала од 0,02% до 0,06% током примарне експоненцијалне фазе раста, али је најзначајније повећање забележено током секундарне експоненцијалне фазе, од 0,06% до 0,12%. Максимална концентрација ФОА коју је гљива продуковала у обе подлоге са детерџентом била је идентична, и већа око 50% у односу на контролу.

Концентрација ТОА коју је гљива продуковала током раста и развоја у хранљивим подлогама била је променљива у зависности од састава подлоге и фазе развића гљиве. У раној фази раста (3. дана), концентрација ТОА била је веома уједначена у различитим подлогама. Разлике су почеле да се испољавају 6. дана, када је највећа количина ТОА измерена у подлози Д3 (1,13%) а значајно мања количина је измерена у К (0.63%) и Д5 подлози (0.4%). Концентрација ТОА се незнатно повећавала у К подлози или веома значајно у подлози Д3 од 6. дана до 9. дана. Супротан ефекат је забележен у подлози Д5 у којој се концентрација ТОА незнатно смањивала. Интересантно, концентрација ТОА се благо смањивала (од 1,5% до 1,23%) у подлози Д3 али се драстично повећавала од 0,35% до 1,5%, у периоду од 9. дана до 16. дана. Максимална количина ТОА у обе подлоге са детерџентом била је идентична и већа у поређењу са контролом.

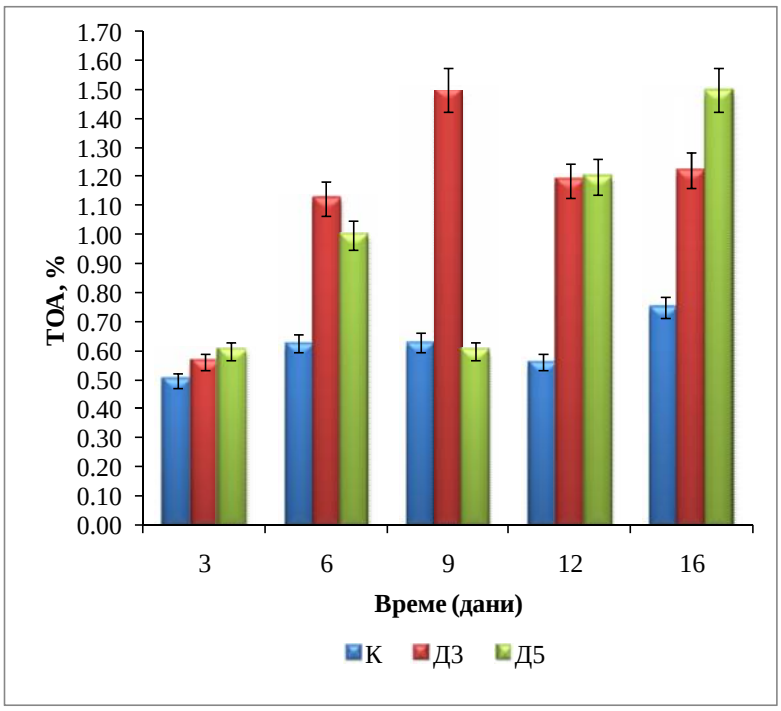
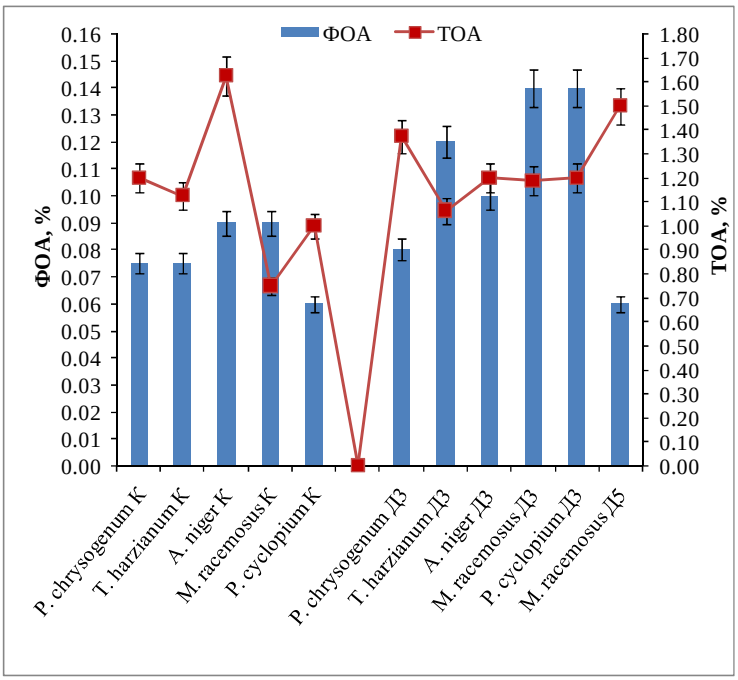


График 5.6.5б. Укупне (ТОА) органске киселине *M.racemosus*

На графикону 5.6.6 приказане су максималне вредности органских киселина које су гљиве продуковале у хранљивим подлогама током експеримента. У контролној подлози највећу количину ТОА продуковала је гљива *A. niger*, а најмању *M. racemosus.* У подлози Д3, највећу количину ТОА продуковала је *P. chrysogenum*, а затим гљиве *P. cyclopium*, *A. niger*, *M. racemosus*, а најмању *T. harzianum.* У подлози Д5, *Mucor racemosus* је продуковала већу количину ТОА у односу на подлогу Д3. Највећу количину ФОА у контролној подлози продуковале су *M. racemosus* и *A. niger*, а најмању *P. cyclopium.* У подлози Д3, највећу количину ФОА продуковале су *M. racemosus* и *P. cyclopium*, а најмању *P. chrysogenum.* Гљива *M. racemosus* продуковала је мању количину ФОА у подлози Д5 у односу на подлогу Д3.



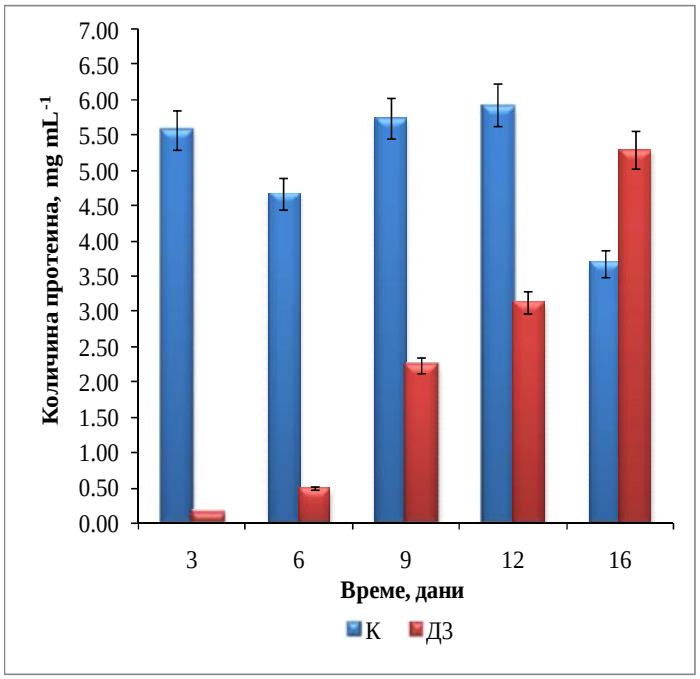
Графикон 5.6.6. Максималне вредности слободних (ФОА) и укупних (ТОА) органских киселина у подлогама

5.7. Продукција протеина у хранљивим подлогама

Протеини су азотна једињења и састоје се од 20 различитих аминокиселина. Свим живим бићима су неопходни за раст и развој и служе као извор енергије, али и за синтезу ћелијских мембрана и ензима (Chouhan *и сар.*, 2013). Филаментозне гљиве се у великом обиму користе за производњу протеина ферментационом технологијом у многим индустријским гранама: хемијској, детерџентној и прехрамбеној (Kathiresan и Manivannan 2006; Moreira и *сар.*, 2001). Иако је механизам секреције протеина недовољно познат на молекуларном нивоу, ипак се зна да морфологија гљива (пелети и слободни филаменти) и услови хранљиви подлоге (инокулум, pH, температура, брзина аерације, употреба полимерних адитива или сурфактаната) јако утичу на секрецију протеина (Metz и Kossen, 1977). Присуство детерџента и активних компоненти типа етоксилованих алкохола може деловати стимулативно или инхибиторна на продукцију протеина у зависности од врсте гљива и примењене концентрације (Стојановић, 1990). У овом истраживању испитиван је утицај комерцијалног детерџента који је додат у хранљиву подлогу на продукцију протеина

гљива у поређењу са контролном подлогом која садржи сахарозу као једини извор угљеника. Резултати су приказани на графиконима 5.7.1. до 5.7.6.

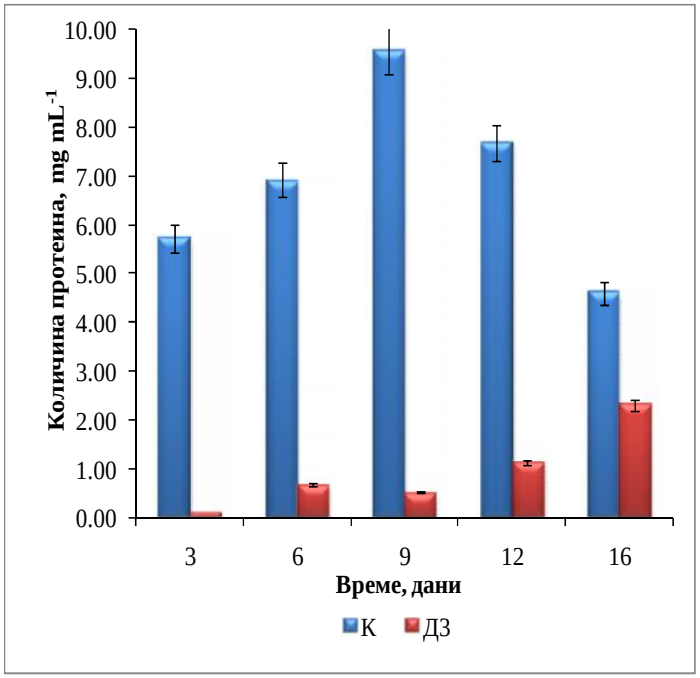
Количина укупних протеина у ферментационој течности контролне и подлоге са детерџентом (ДЗ) гљиве *Aspergilus niger* приказана је на графикону **5.7.1**.



Графикон 5.7.1. Продукција протеина *Aspergilus niger*

Гљива је продуковала велику количину протеина у контролној подлози. Количина протеина се благо повећавала од 3. дана до 12. дана када је измерена максимална количина протеина у подлози. Изузетак је благо смањење количине протеина у подлози, у фази експоненцијалног раста (од 3. дана до 6. дана), што је у корелацији са максималном протеолитичком активношћу. У подлози са детерџентом, количина укупних протеина повећавала се линеарно са временом култивације гљиве, тако да је максимална продукција протеина измерена 16. дана. Продукција протеина била је инхибирана присуством детерџента у подлози.

Количина укупних протеина у ферментационој течности контролне и подлоге са детерџентом (ДЗ) гљиве *Penicillium chrysogenum* приказана је на графикону **5.7.2.**

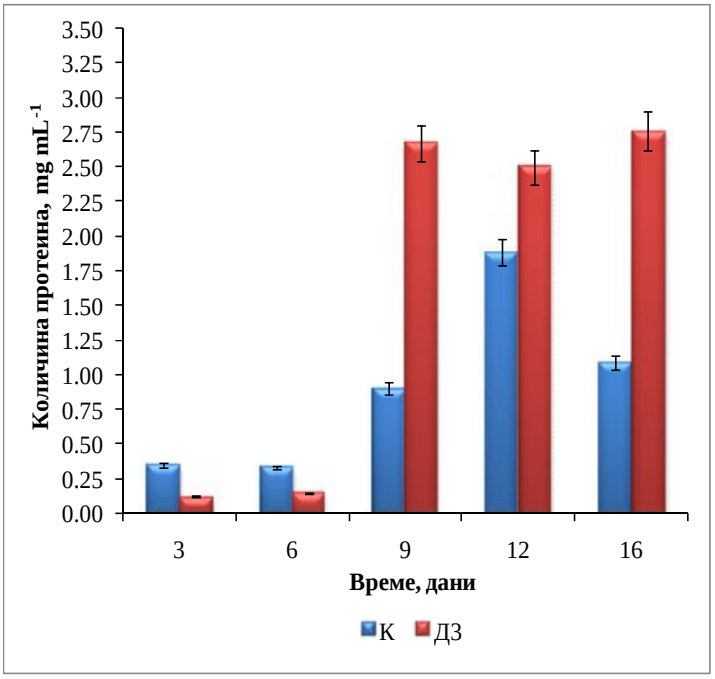


Графикон 5.7.2. Продукција протеина *P.chrysogenum*

Гљива је продуковала велику количину протеина у контролној подлози. Количина протеина се повећавала упоредо са растом и развојем мицелијума, а максимална количина протеина је измерена у фази експоненцијалног раста, 6. дана. Након тога, значајно мања количина протеина је измерена 9. дана, што је у корелацији са максималном протеолитичком активношћу. У фази аутолизе (12. дана) дошло је до благог повећања количине протеина у контролној подлози. У подлози са детерџентом, количина укупних протеина повећавала се линеарно са временом култивације гљиве, тако да је максимална продукција протеина измерена 16. дана. Изузетак је благо смањење количине протеина у подлози у периоду од 6. дана до 9. дана, што је у корелацији са максималном протеолитичком активношћу. Укупна количина протеина у подлози ДЗ била је мања у односу на количину протеина у контроли.

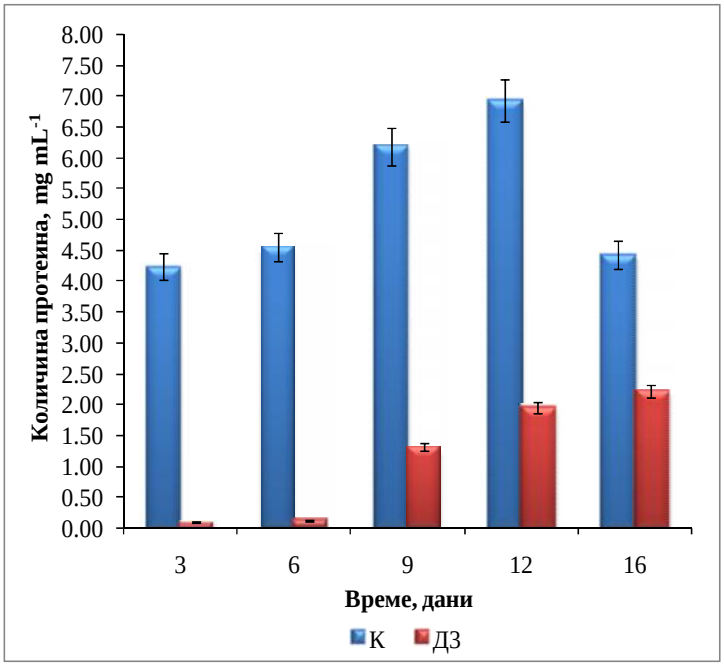
Гљива *Penicillium cyclopium* продуковала је већу количину протеина у ферментационој течности хранљиве подлоге са детерџентом (ДЗ) у односу на контролну подлогу. Концентрација протеина у ферментационој течности контролне подлоге била је веома мала у почетним фазама развоја гљиве, али је у периоду од 6. дана до 12. дана дошло до значајног повећања количине протеина, када је измерена

максимална вредност. У подлози са детерџентом, продукција протеина је такође била слаба до 6. дана, затим се нагло повећала у периоду од 6. дана до 9. дана. До краја експерименталног периода количина протеина се није значајније мењала, али је максимална количина протеина измерена 16. дана. Резултати су приказани на графикону **5.7.3**.



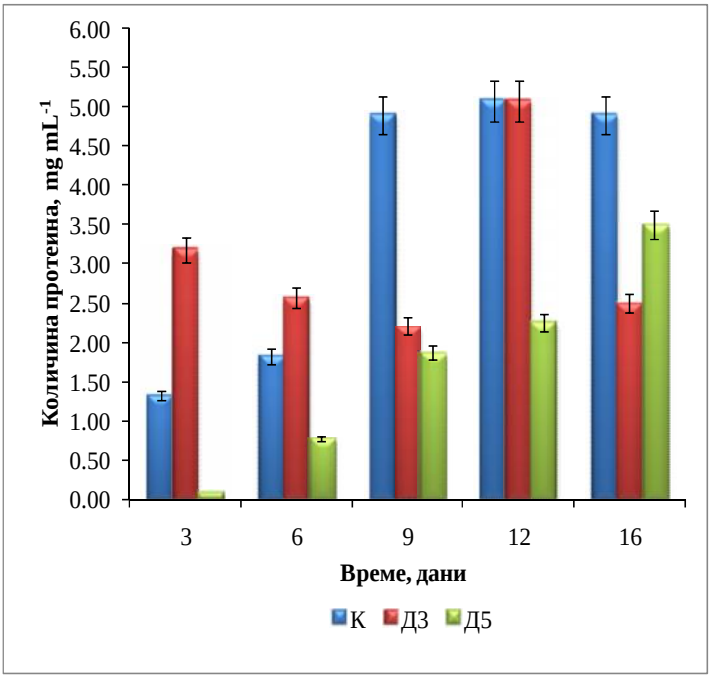
Графикон 5.7.3. Продукција протеина *P. cyclopium*

Гљива *Trichoderma harzianum* продуковала је већу количину протеина у контролној подлози у односу на подлогу са детерџентом (ДЗ). Концентрација протеина у ферментационој течности контролне подлоге се благо повећавала са развојем мицелијума, од 3. дана до 12. дана, када је забележена максимална количина протеина. Међутим, у периоду од 12. дана до 16. дана дошло је до значајног смањења количине протеина у подлози. У подлози са детерџентом, количина протеина је била готово занемарљива током првих 6 дана раста гљиве. Значајно повећање количине протеина у подлози забележено је од 6. дана до 9. дана. Након тога, количина протеина повећавала се линеарно са временом култивације гљиве, тако да је максимална продукција протеина измерена 16. дана. Резултати су приказани на графикону **5.7.4**.



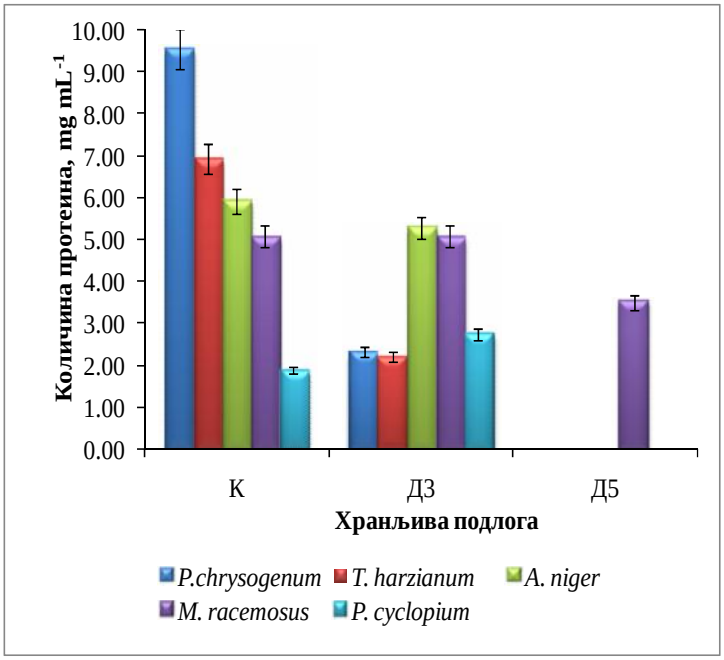
Графикон 5.7.4. Продукција протеина *T. harzianum*

Гљива *Mucor racemosus* продуковала је једнаку количину протеина у контроли и подлози са 0,3% детерџентом, док је продукција протеина у подлози са 0,5% детерџентом била знатно слабија (графикон **5.7.5**). У контролној подлози гљива је продуковала мању количину протеина у почетним фазама развоја мицелијума, али је до наглог повећања продукције дошло у периоду од 6. дана до 9. дана. Након тога, количина протеина се није значајније мењала до краја експеримента, али је највећа количина протеина у овој подлози измерена је у фази аутолизе (12. дана). Смањење количине протеина у контроли је забележено у фази експоненцијалног раста (6. дана) што је у корелацији са максималном протеолитичком активношћу. У подлози Д3, гљива је продуковала већу количину протеина у фази експоненцијалног раста у односу на контролу. Количина протеина у овој подлози се постепено смањивала од 3. дана до 9. дана, што је у корелацији са максимамном протеолитичком активношћу. Међутим, количина протеина у овој подлози значајно се повећала од 9. дана до 12. дана, када је измерена максимална вредност. У подлози Д5, количина протеина се линеарно повећавала са периодом култивације гљиве, тако да је највећа количина протеина измерена 16. дана.



Графикон 5.7.5. Продукција протеина *M. racemosus*

Максимална продукција протеина гљива у хранљивим подлогама приказана је на графикону **5.7.6.** Детерџент је испољио инхибиторно или стимулативно дејство на продукцију протеина у зависности од врсте гљиве и концентрације у подлози. Детерџент додат у хранљиву подлогу у концентрацији 0,3% утицао је на веома значајно смањење количине протеина *P. chrysogenum* (око 4 пута) и *T. harzianum* (око 3 пута), незнатно смањење количине протеина *A. niger*, али је утицао на повећање количине протеина *P. cyclopium* (око 1,5 пута). Код гљиве *M. racemosus*, нижа концентрација детерџента (0,3%) није утицала на промену количине протеина, док је виша концентрација (0,5%) утицала на смањење количине протеина у подлози. Резултати показују да се тестиране гљиве могу користити као организми за продукцију различитих протеина у биотехнологији, посебно врста *P. chrysogenum*.



Графикон 5.7.6. Максимална продукција протеина у подлогама

5.8. Квалитативни и квантитативни састав аминокиселина

Аминокиселине су азотна једињења и служе као извор енергије и изграђују протеине. Двадесет различитих аминокиселина је неопходно за раст и развој гљива. Филаментозне гљиве у фази раста продукују екстрацелуларне аминокиселине у хранљиву подлогу, у зависности од времена инкубације. Најчешће идентификоване аминокиселине филаментозних гљива су глутамин, глицин, фенилаланин, триптофан, изолеуцин, леуцин, лизин, метионин, треонин и валин. 13 различитих аминокиселина изоловано је из културе и ферментационе течности *Aspergillus* (Woolley и Peterson, 1937). Концентрација аминокиселина зависи од старости организма и спољашњих услова (Sueoka, 1961; Holden, 1962). Такође, састав хранљиве подлоге утиче на квалитативни и квантитативни састав аминокиселина. *Aspergillus wentii* у подлози са сахарозом продукује валин, серин, глутаминску киселину и цитин, а на подлози са глукозом глутаминску киселину, леуцин, хидрокси пролин (Chouhan *и cap*., 2013). Код гљива *A. niger* и *P. verrucosum* присуство детерџента у хранљивој подлози утиче на квалитет и квантитет екскретованих аминокиселина. Код *A. niger* детерџент стимулише продукцију 15 аминокиселина, а најзаступљеније су аспарагинска,

глутаминска, аргинин, лизин, аланин и пролин. Детерџент инхибира продукцију 13 аминокиселина код гљиве *P. verrucosum,* али стимулише продукцију изолеуцина и леуцина (Стојановић, 2000). Код *F. oxysporum,* детерџент стимулише продукцију већине аминокиселина, док код *T. roseum* има супротно дејство (Стојановић, 1989). У овом истраживању је испитиван квалитативни и квантитативни састав аминокиселина у контролној подлози и у подлози са комерцијалним детерџентом анјонског типа. Резултати су приказани табеларно (табела 5.1) и графички (графикони од 5.8.1 до 5.8.11).

У течној хранљивој подлози по Чапеку све тестиране врсте гљива су продуковале аланин, а осим аланина гљиве *Penicillium cyclopium* и *Mucor racemosus* су продуковале и аргинин. Квантитавно најзаступљенија аминокиселина у контролној подлози је аргинин код *P. cyclopium* (4038 μg L^{-1}) и *M. racemosus* (2875 μg L^{-1}). У течној подлози са детерџентом 0,3% концентрације, гљиве *Penicillium chrysogenum, Penicillium cyclopium* и *Trichoderma harzianum* су продуковале аргинин и глутамат. Гљива *Aspergillus niger* је у подлози Д3 продуковала аланин, глицин и глутамат. Код гљиве *Mucor racemosus* присуство детерџента 0,3% концентрације није утицало на квалитативни састав већ само на квантитативни састав аминокиселина, тако да је концентрација аргинина била је око 1,5 пута мања, а аланина око 2,5 пута мања у односу на контролу. Међутим, присуство детерџента 0,5% концентрације у хранљивој подлози утицало је на продукцију укупно 5 аминокиселина: аргинин, аланин, валин, серин и глутамат. Квантитативно најзаступљенија аминокиселина била је аргинин (4487 μg L^{-1}) и њена концентрација је била незнатно већа у односу на контролу.

Табела 5.1. Квалитативни и квантитативни састав аминокиселина 16. дана

Врста гљива	Подлога	Квалитативни састав аминокиселина	Квантитативни састав аминокиселина C / μg L^{-1}	Ретенционо време t / min.
Penicillium chrysogenum	К	Аланин	391	6.47
	ДЗ	Аргинин	5080	1.77
		Глутамат	273	31.15
Trichoderma harzianum	К	Аланин	550	6.47
	ДЗ	Аргинин	5570	1.77
		Глутамат	482	31.15
Aspergillus niger	К	Аланин	406	6.47
	ДЗ	Аланин	5110	6.47
		Глицин	4390	7.50
		Глутамат	432	31.15
Penicillium cyclopium	К	Аргинин	4038	1.77
		Аланин	603	6.47
	ДЗ	Аргинин	4318	1.77
		Глутамат	395	31.15
Mucor racemosus	К	Аргинин	2048	1.77
		Аланин	305	6.47
	ДЗ	Аргинин	2875	1.77
		Аланин	228	6.47
	Д5	Аргинин	4487	1.77
		Аланин	893	6.47
		Валин	637	8.73
		Серин	338	10.20
		Глутамат	344	31.15

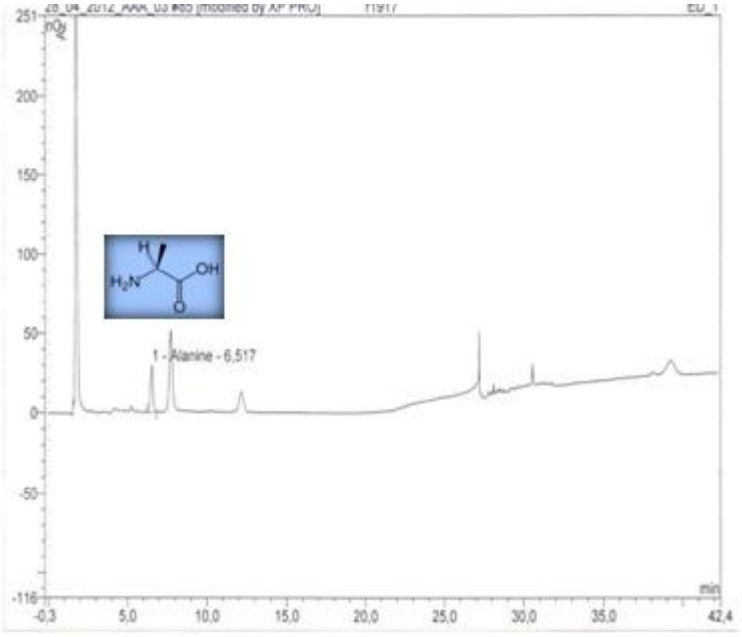


График 5.8.1. Аминокиселине *A. niger* у контроли

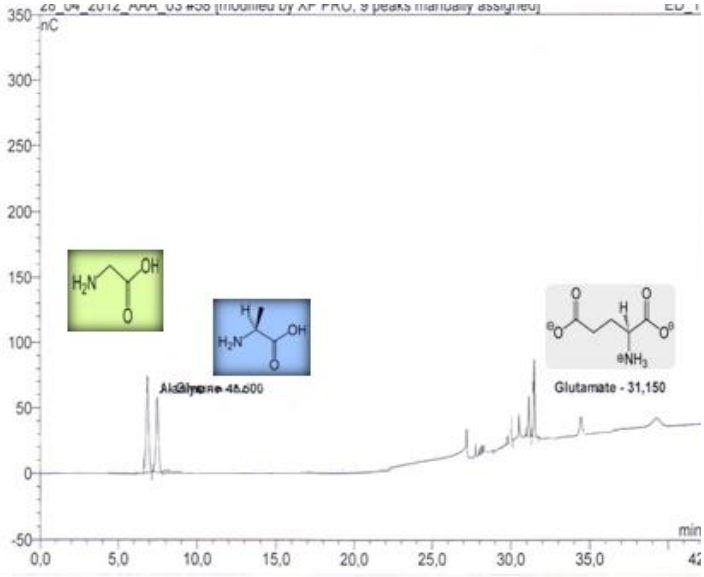


График 5.8.2. Аминокиселине *A. niger* у ДЗ подлози

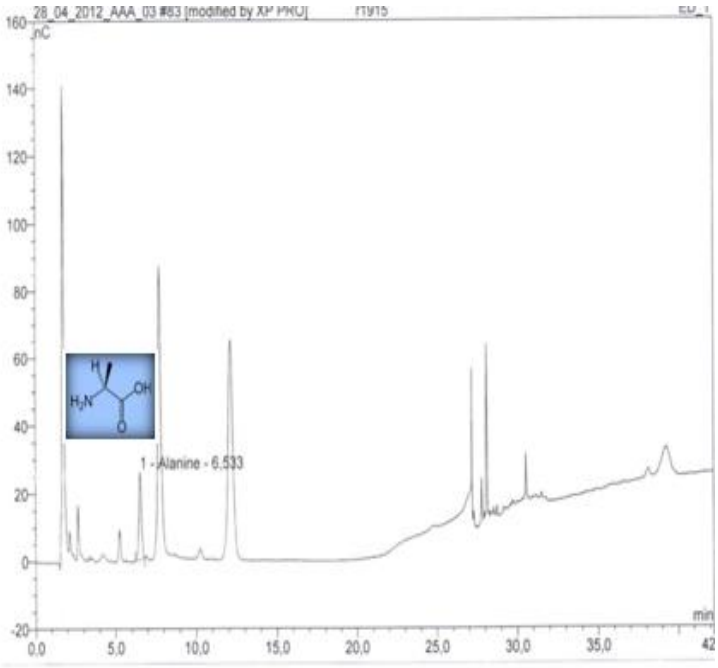


График 5.8.3. Аминокиселине *P. chrysogenum* у контроли

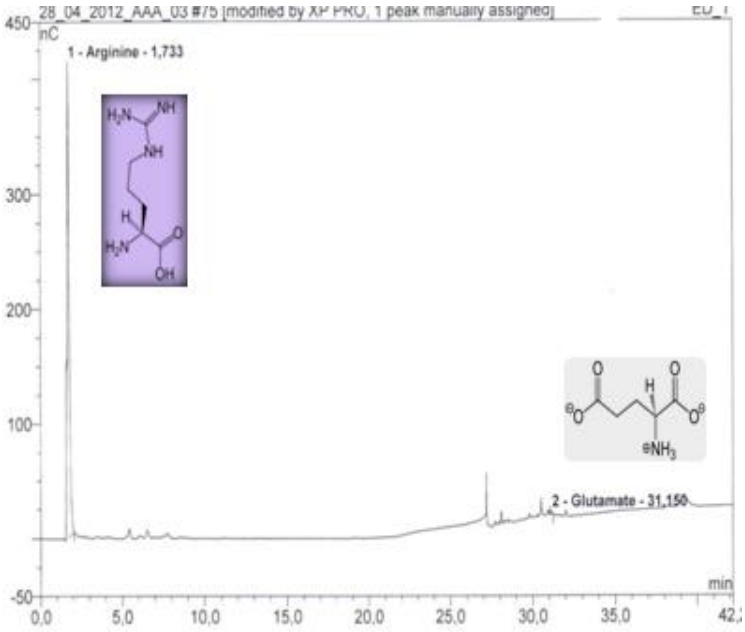


График 5.8.4. Аминокиселине *P. chrysogenum* у ДЗ подлози

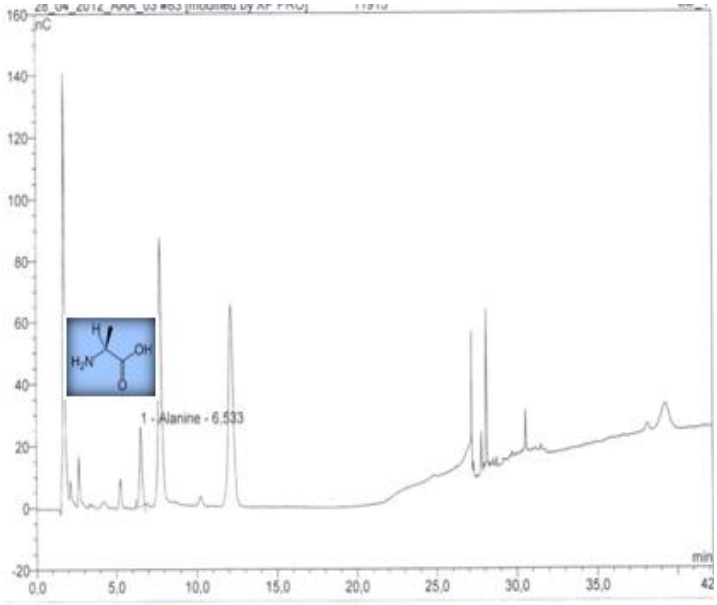


График 5.8.5. Аминокиселине *T. harzianum* у контроли

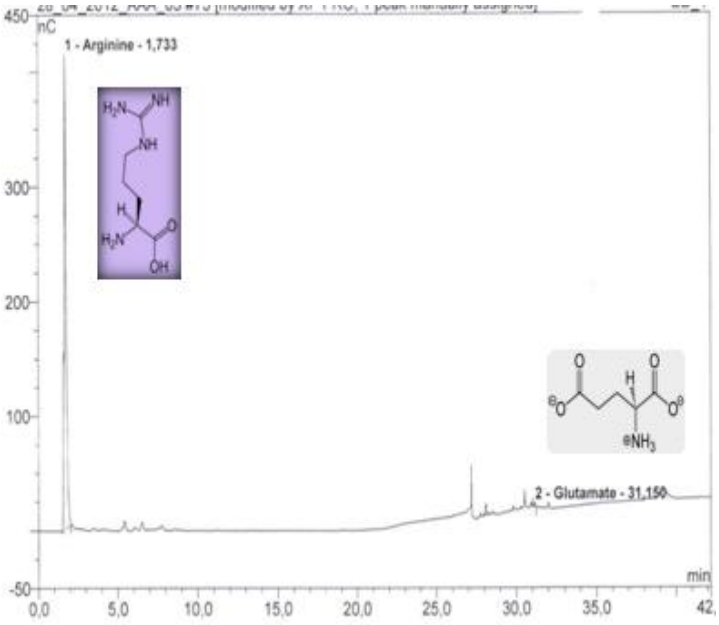


График 5.8.6. Аминокиселине *T. harzianum* у ДЗ подлози

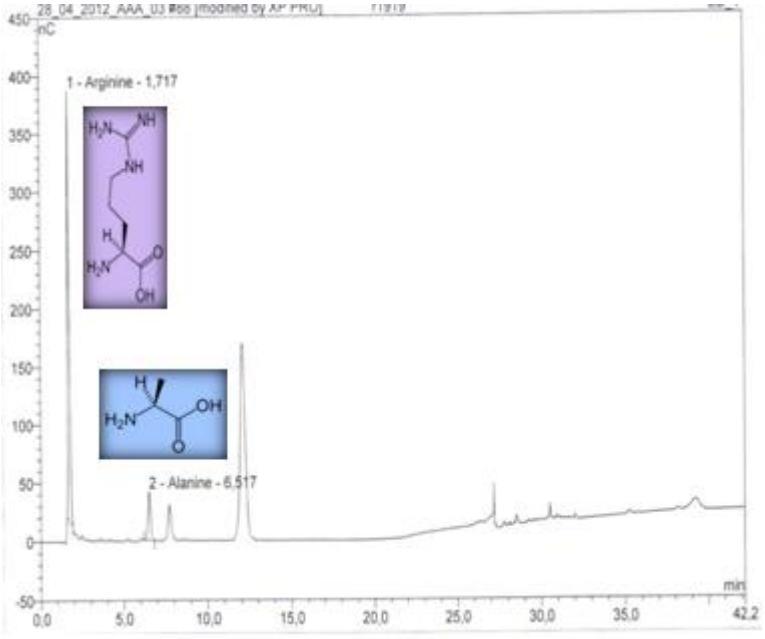


График 5.8.7. Аминокиселине *P. cyclopium* у контроли

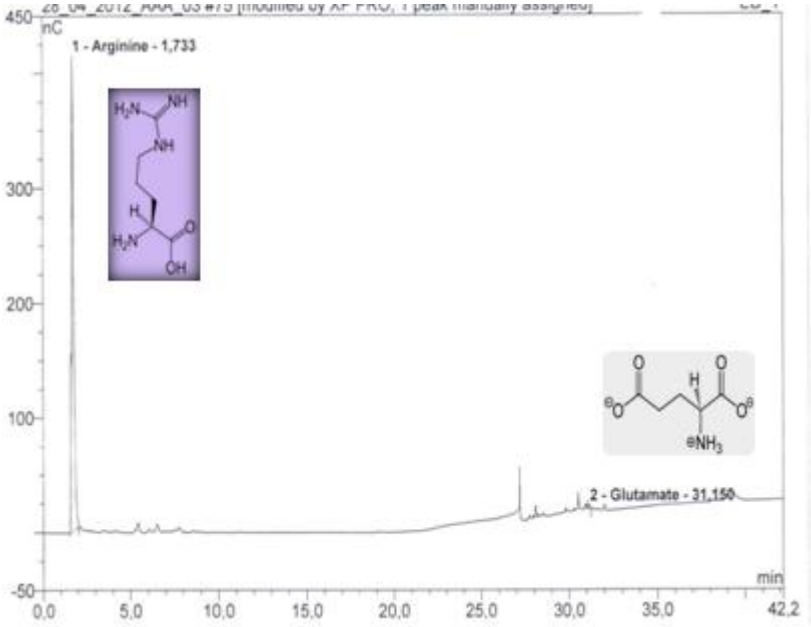
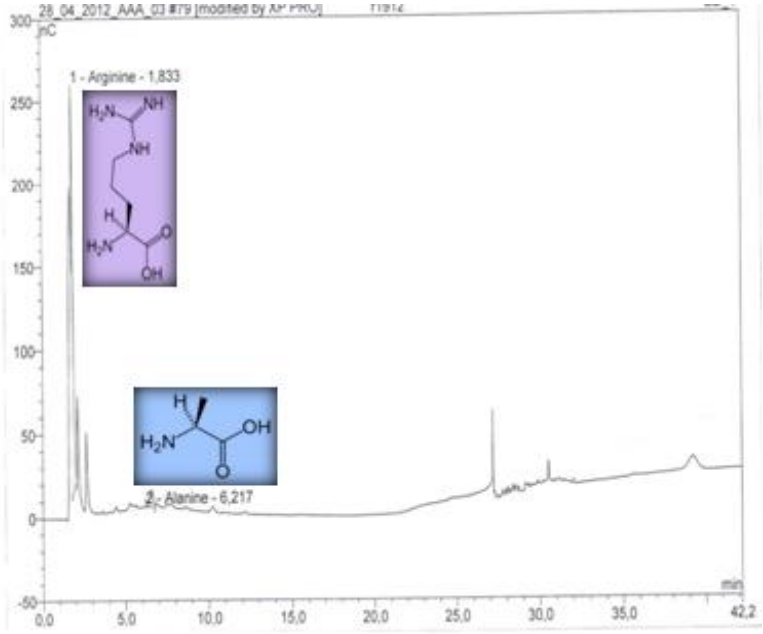
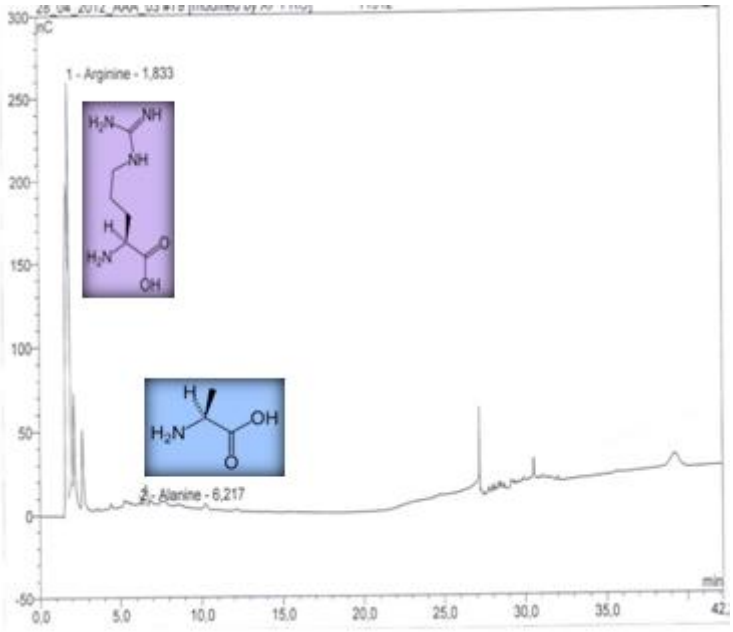


График 5.8.8. Аминокиселине *P. cyclopium* у ДЗ подлози



Графикон 5.8.9. Аминокиселине *Mucor racemosus* у контроли



Графикон 5.8.10. Аминокиселине *Mucor racemosus* у Д3 подлози

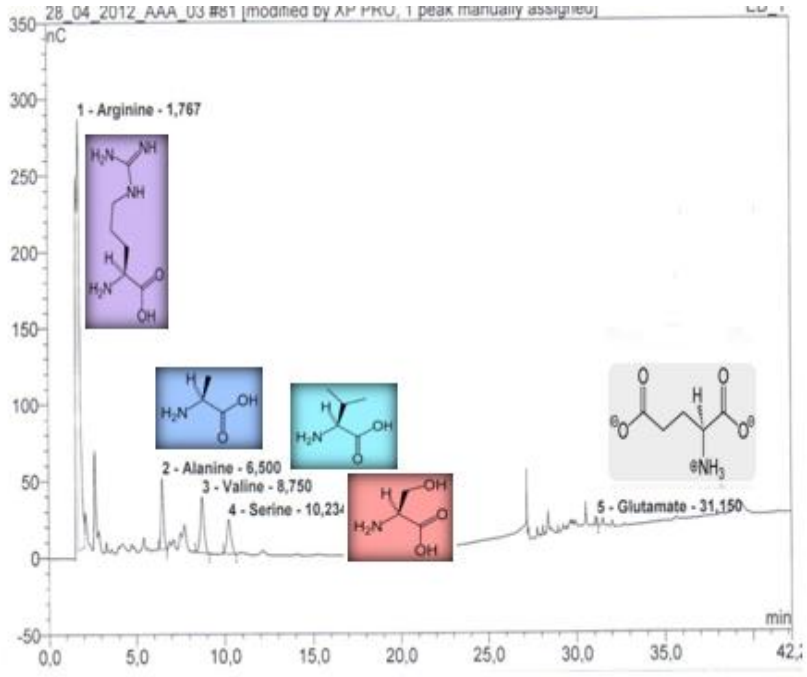


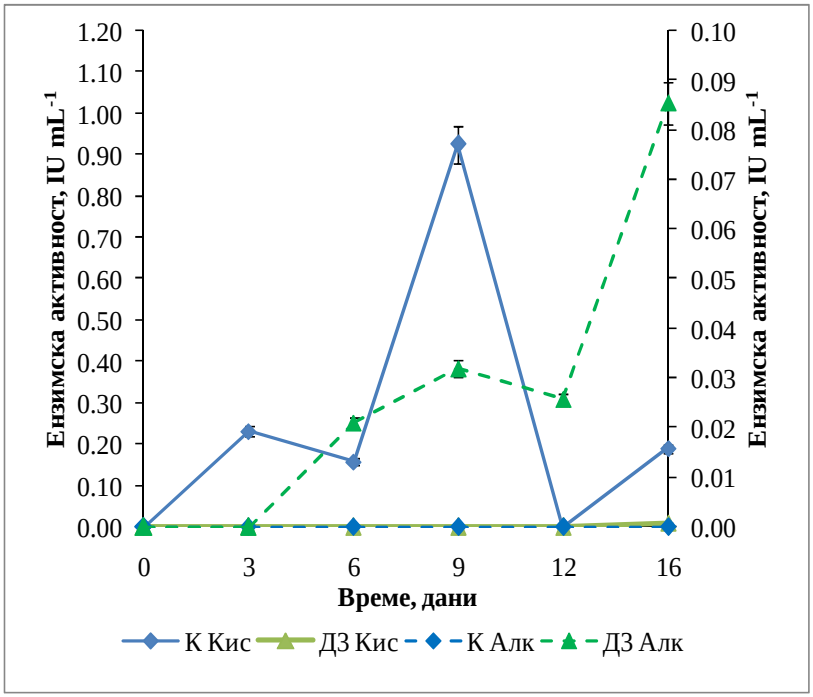
График 5.8.11. Аминокиселине *Mucor racemosus* у Д5 подлози

5.9. Утицај детерџента на активност киселе и алкалне инвертазе

Инвертазе су ензими који хидролизују дисахарид сахарозу на глукозу и фруктозу. Већина гљива има и интрацелуларне и екстрацелуларне инвертазе (Gillespie *и cap.*, 1952; Crewther *и cap.*, 1953), које се разликују по положају у ћелији (ћелијски зид, вакуоле или цитоплазма), растворљивости (растворљиве или нерастворљиве у пуферу мале јонске јачине), оптималној pH (кисели или неутралне/алкалне) и изоелектричној тачки (p*I*). Резултати многих истраживања су потврдили да активност ових ензима зависи од врсте подлоге и фазе развоја гљива. Инвертазе су изоловане и окарактерисане код многих филаментозних гљива: *Penicillium, Neurospora*, *Aspergillus*, итд., (Poonawalla, 1965; Ashok Kumar и *cap.*, 2001; Guimaraes *и cap.*, 2009). Истраживања Vainstein и Peberdy (1991) су показала да *Aspergillus nidulans* продукује екстрацелуларне инвертазе на подлози са сахарозом или рафинозом, а ензимски максимум је достигнут након 15 h инкубације на 28°C. Резултати Poonawalla *и cap*., (1965) су показали да у субмерзној ферментацији *P. chrysogenum* и *S. cerevisiae* продукују и интра- и екстрацелуларну инвертазу, а да је максимум ензимске активности забележен између 72 и 96 h у подлози са 30 g L^{-1} сахарозе.

У овом истраживању испитивана је активност киселе и алкалне инвертазе у контролној подлози која садржи сахарозу и у подлози са детерџентом, а резултати су приказани на графиконима од 5.9.1. до 5.9.6.

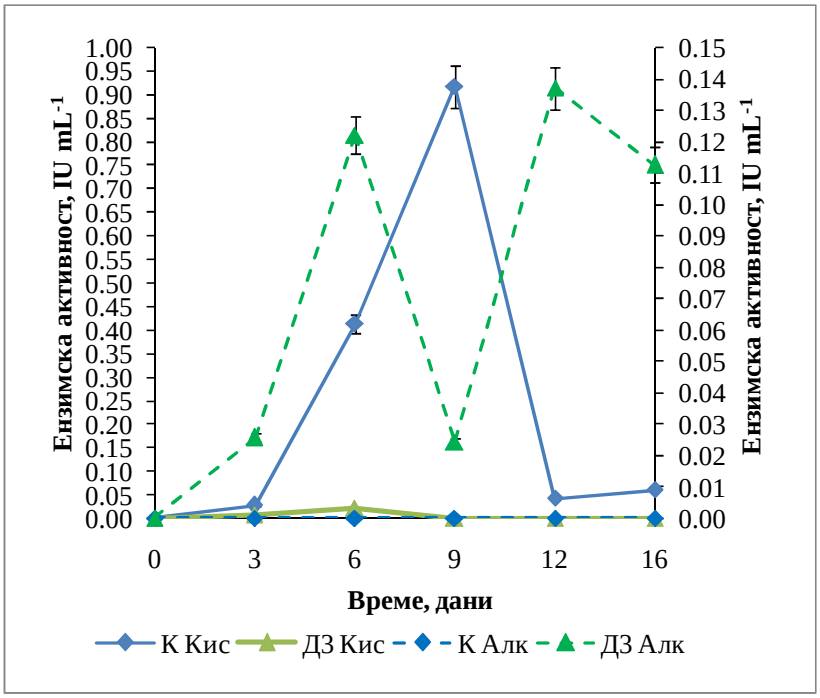
Активност киселе и алкалне инвертазе гљиве *Aspergilus niger* за време њеног раста и развоја у контролној подлози и у подлози ДЗ, приказана је на графикону **5.9.1.**



Графикон 5.9.1. Активност киселе и алкалне инвертазе *A. niger*

Активност киселе инвертазе у контролој подлози била је веома изражена. Слабија ензимска активност је измерена у раним фазама развоја гљиве. Нагло повећање ензимске активности забележено је у периоду од 6. до 9. дана, када је достигла максималну вредност (0.93 IU mL^{-1}). Нагло смањење ензимске активности забележено је у периоду од 9. дана до 12. дана, када је активност ензима била потпуно инхибирана. Присуство детерџента 0,3% концентрације у подлози утицало је на потпуну инхибицију активности киселе инвертазе. Активност алкалне инвертазе није регистрована у контролној подлози током читавог периода култивације гљиве. Међутим, активност алкалне инвертазе у подлози ДЗ повећавала се паралелно са развојем мицелијума, од 3. дана до 9. дана, нарочито у периоду од 12. дана до 16. дана, када је измерен ензимски максимум (0.09 IU mL^{-1}).

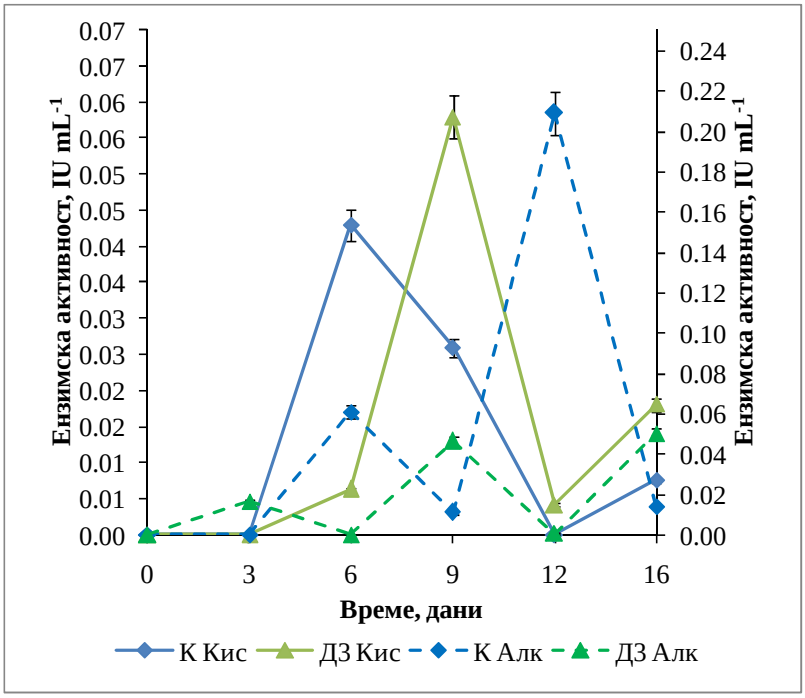
На графикону **5.9.2.** приказана је активност киселе и алкалне инвертазе *P. chrysogenum* за време њеног раста и развоја у контролној подлози и у подлози ДЗ.



Графикон 5.9.2. Активност киселе и алкалне инвертазе *P. chrysogenum*

Активност алкалне инвертазе није регистрована у контролној подлози, али је променљива ензимска активност регистрована у подлози ДЗ, нарочито 6. дана и 12. дана. Активност киселе инвертазе била је изражена током читавог експерименталног периода у контролној подлози, са максимумом 9. дана (0.98 IU mL^{-1}). Међутим, активност киселе инвертазе била је изузетно слаба у подлози ДЗ и изражена само у фази раста мицелијума од 3. дана до 6. дана. У осталим фазама развоја гљиве ензимска активност је била потпуно инхибирана.

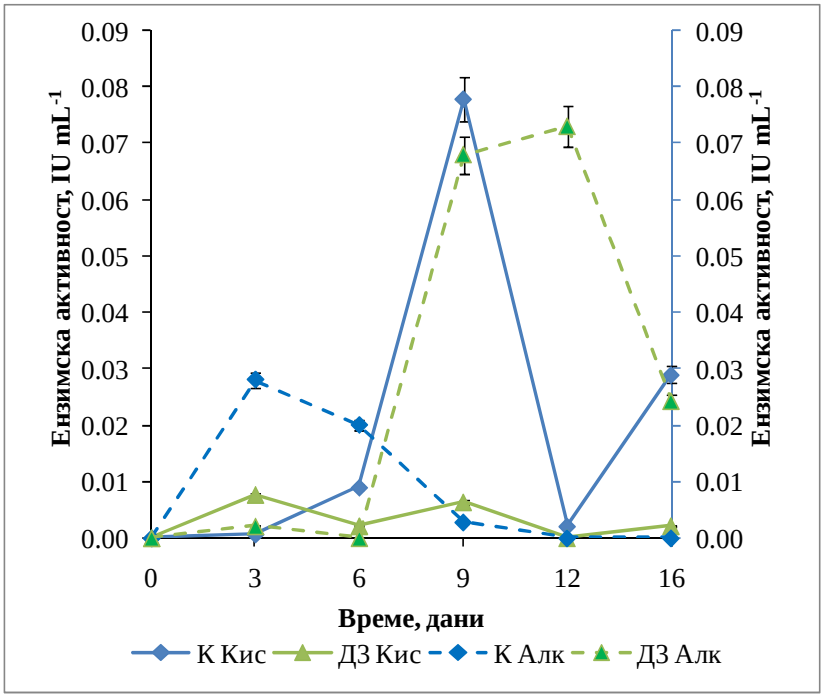
На графикону **5.9.3.** приказана је активност киселе и алкалне инвертазе гљиве *Penicillium cyclopium* у контролној подлози и подлози са 0,3% детерџентом.



Графикон 5.9.3. Активност киселе и алкалне инвертазе *P. cyclopium*

Активност киселе и алкалне инвертазе измерена је и у контроли и у подлози ДЗ. У контролној подлози, активност киселе инвертазе била је изражена у фази експоненцијалног раста мицелијума, нагло се повећавала од 3. дана до 6. дана када је измерен ензимски максимум (0.04 IU mL^{-1}). Почетком стационарне фазе дошло је до смањења ензимске активности, а најмања активност је измерена у фази аутолизе (12. дана). Присуство детерџента 0,3% концентрације у подлози стимулисало је активност киселе инвертазе у односу на контролу. Максимална ензимска активност у подлози ДЗ измерена је 9. дана (0.06 IU mL^{-1}). Активност алкалне инвертазе у контролној подлози била је изражена 6. дана и 12. дана, када је достигла максималну вредност (0.21 IU mL^{-1}). У контролној подлози, активност алкалне инвертазе била је већа од активности киселе инвертазе. У подлози ДЗ, активност алкалне инвертазе била је знатно слабија у односу на активност киселе инвертазе. Максимална вредност ензимске активности је измерена 16. дана (0.05 IU mL^{-1}).

На графикону **5.9.4** приказана је активност киселе и алкалне инвертазе гљиве *Trichoderma harzianum* у контролној подлози и у подлози ДЗ.



Графикон 5.9.4. Активност киселе и алкалне инвертазе *T. harzianum*

Активност киселе инвертазе била је слаба у почетној фази раста мицелијума од 3. дана до 6. дана, али се нагло повећала у периоду од 6. дана до 9. дана, када је достигла максималну вредност (0.08 IU mL^{-1}). Нагло смањење ензимске активности уследило је у периоду од 9. дана до 12. дана, када је активност ензима била потпуно инхибирана у контроли, али је забележена променљива ензимска активност у подлози ДЗ, нарочито 6. дана и 12. дана. Активност киселе инвертазе била је изражена током читавог експерименталног периода у контроли, са максимумом 9. дана. Међутим, активност киселе инвертазе била је изузетно слаба у подлози ДЗ и изражена само у фази раста мицелијума, од 3. дана до 6. дана. У осталим фазама развоја гљиве била је потпуно инхибирана. Изузетно слаба активност киселе инвертазе измерена је у подлози ДЗ, 3. дана и 9. дана. Активност алкалне инвертазе у контролној подлози измерена је у раним фазама раста мицелијума, са максимумом 3. дана. Међутим, ензимска активност се смањивала са продужењем периода култивације и најмања је била 16. дана. У подлози ДЗ, активност алкалне инвертазе је била занемарљива до 6. дана, када је дошло до наглог повећања ензимске активности и максимум је измерен 12. дана (0.07 IU mL^{-1}).

Алкална инвертазна активност гљиве *Mucor racemosus* у контроли нагло се повећавала у фази експоненцијалног раста, од 3. дана до 6. дана, а благо се смањивала у стационарној фази. Међутим, максимална ензимска активност (0.43 IU mL^{-1}) је измерена за време аутолизе (12. дана). Присуство детерџента 0,3% концентрације у подлози деловало је инхибиторно на ензимску активност у поређењу са контролом. Максимална ензимска активност у подлози Д3 (0.17 IU mL^{-1}) је измерена за време секундарне експоненцијалне фазе раста (12. дана), али је ензимска активност била мања у поређењу са контролом. Супротно, динамика ензимске активности гљиве била је веома слична у подлози Д5 и у контроли, у периоду од 3. дана до 9. дана. У подлози Д5, максимална ензимска активност је измерена 6. дана (0.25 IU mL^{-1}) током примарне експоненцијалне фазе раста и била је незнатно већа од вредности измерене у контролној подлози. Резултати су приказани на графикону **5.9.5**.

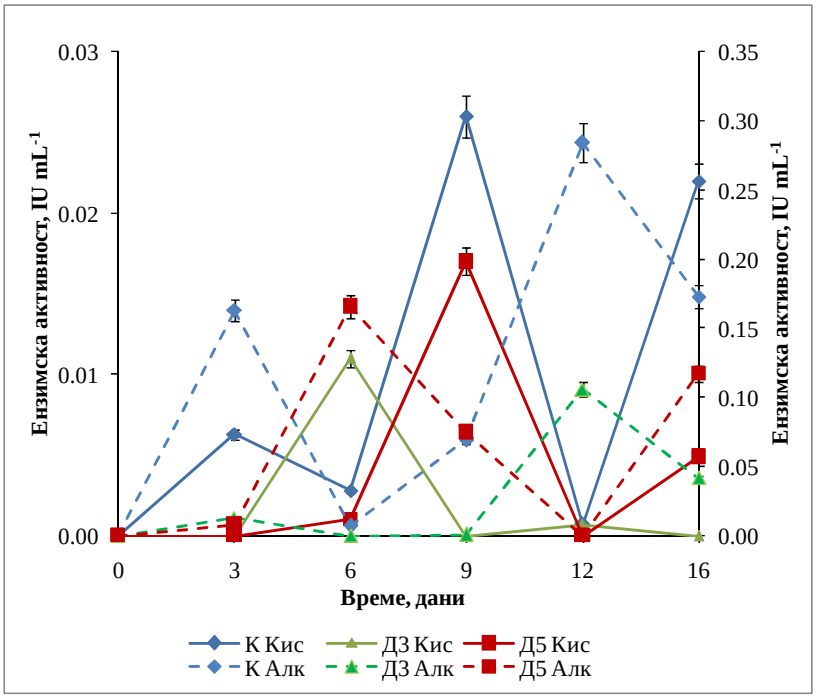
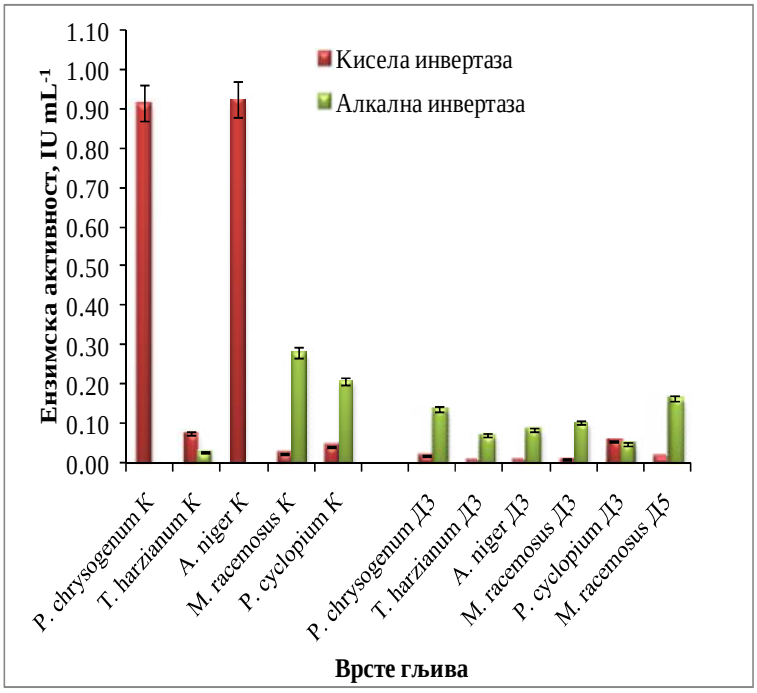


График 5.9.5. Активност киселе и алкалне инвертазе *M. racemosus*

Утицај детерџента на активност алкалне и киселе инвертазе гљива у односу на контролну подлогу приказан је на графикону **5.9.6**.



Графикон 5.9.6. Максимална инвертазна активност гљива у подлогама

Код гљива *P. chrysogenum* и *A. niger* забележена је само кисела инвертазна активност у контролној подлози, док је код осталих гљива регистрована и алкална инвертазна активност. Код гљива *M. racemosus* и *P. cyclopium* активност алкалне инвертазе била је од 2 до 3 пута већа од активности киселе инвертазе. У подлози ДЗ, активност алкалне инвертазе била је стимулисана или инхибирана детерџентом у зависности од врсте гљиве. Највеће стимулативно дејство детерџент је испољио на активност алкалне инвертазе гљива *P. chrysogenum*, *A. niger* и *T. harzianum*. Супротно дејство детерџент је имао на ензимску активност гљива *M. racemosus* и *P. cyclopium*. У подлози са детерџентом активност киселе инвертазе гљива била је инхибирана, изузев код гљиве *P. cyclopium* код које је детерџент испољио стимулативно дејство. Максималне активности ензима забележене су у фази експоненцијалног раста гљива али и у фази аутолизе, што указује на присуство екстрацелуларних и интрацелуларних ензима у ферментационој течности. Изузетна ензимска активност гљива *P. chrysogenum* и *A. niger* у контролној подлози указује на потенцијалну примену ових гљива у индустријској производњи инвертаза.

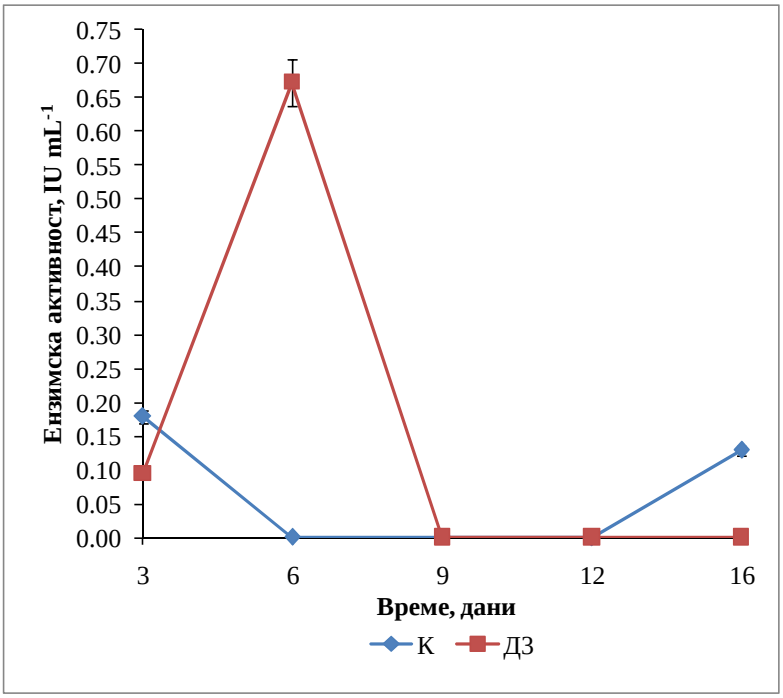
5.10. Утицај детерџента на активност алкалне протеазе

Протеазе су хидролитички ензими који катализују раскидање пептидних веза у протеинима на мање пептидне фрагменте. Деле се на алкалне, киселе и неутралне у зависности од интервала pH у коме испољавају максималну активност. Комерцијално најзначајније алкалне протеазе су добијене из *Aspergillus sydowi* (Danno и Yoshimura, 1967), *A. mellieus* (Ito и Sugira, 1968), *A. fumigatus* (Monod *и cap.*, 1991, Larcher *и cap.*, 1992), и *Aspergillus oryzae* (Malathi и Chakraborthy, 1991). Протеазе се примењују у разним областима индустрије: детерџентној, фармацеутској, кожној, фотографској, прехрамбеној и пољопривредној. На продукцију ензима велики утицај имају компоненте хранљиве подлоге које служе као извор угљеника и азота, температура, pH, дужина инкубације и др. (Rani *и cap.*, 2012). Протеазе *Bacillus* врста показале су одличну стабилност и компатибилност са комерцијалним детерџентима (Mala *и cap.*, 2010). Са друге стране, анјонски сурфактанти као што су SDBS и SDS испољавају јако инхибиторно дејство на ензимску активност већине микроорганизама (Грбавчић *и cap.*, 2009; Израел Живковић *и cap.*, 2009). Поларне главе SDS или SDBS везују се за активни центар ензима јонским интеракцијама које изазивају конформационе промене ензима. Нејонски сурфактанти попут етилен оксида, везују се за активни центар ензима водоничним везама и побољшавају конформациону флексибилност.

У овом истраживању испитивана је протеолитичка активност гљива у контролној подлози са сахарозом и у подлози са тестираним комерцијалним детерџентом, а резултати су приказани на графиконима од 5.10.1. до 5.10.6.

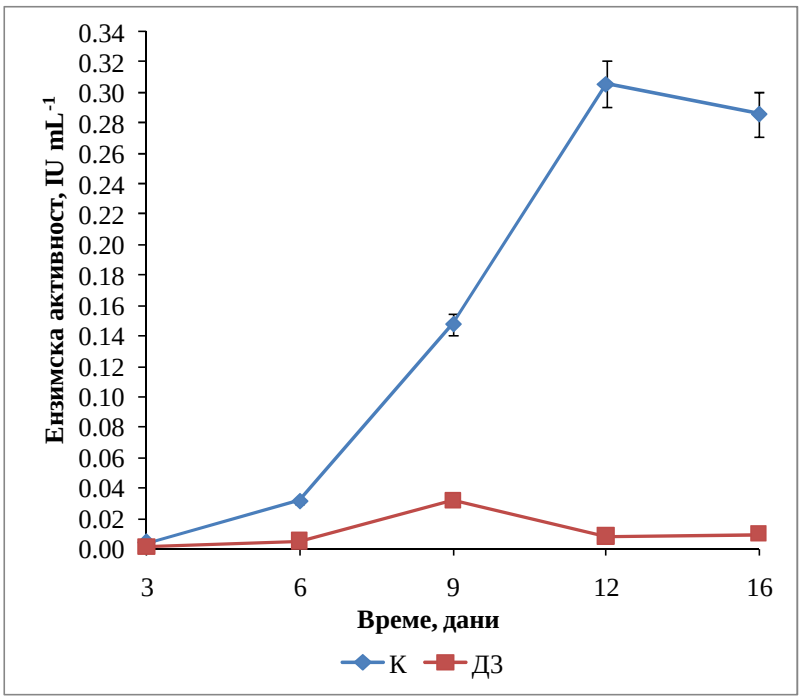
Протеолитичка активност ферментационе течности гљиве *Aspergillus niger* у контролној подлози била је слаба и изражена само одређеним фазама развоја гљиве. Максимална ензимска активност (0.18 IU mL^{-1}) је измерена у фази експоненцијалног раста (3. дана), а затим је нагло опадала до 6. дана, и била потпуно инхибирана до 12. дана. Међутим, почетком аутолизе (од 12. дана до 16. дана) дошло је до повећања ензимске активности у контроли. Присуство детерџента у хранљивој подлози (ДЗ) стимулисало је активност протеолитичких ензима у фази експоненцијалног раста мицелијума (6. дана) када је забележен ензимски максимум (0.67 IU mL^{-1}). Са продужењем периода култивације гљиве дошло је наглог смањења протеолитичке

активности и потпуне инхибиције до краја експеримента. Резултати су приказани на графикону **5.10.1**.



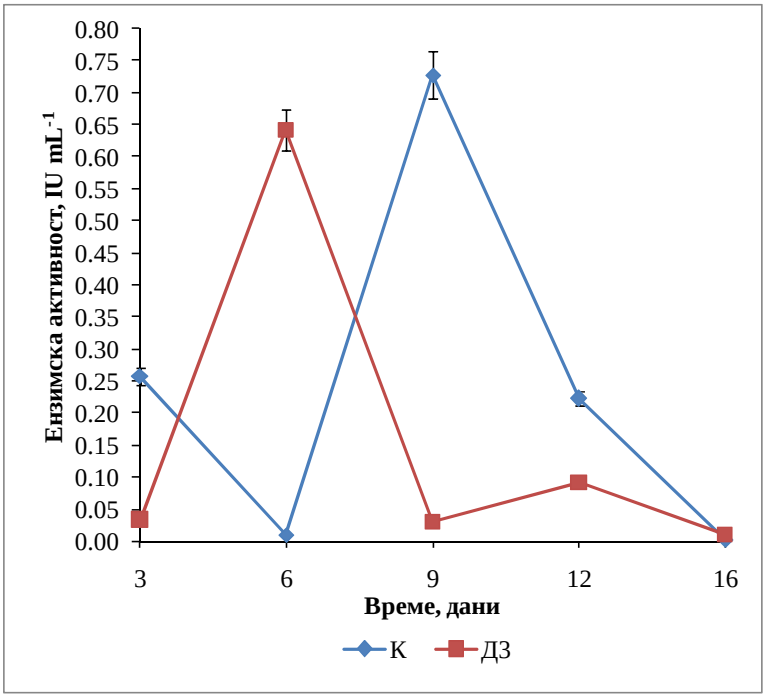
Графикон 5.10.1. Протеолитичка активност гљиве *A. niger*

Протеолитичка активност ферментационе течности гљиве *Penicillium chrysogenum* у контролној подлози повећавала се упоредо са растом и развојем гљиве. Статистички значајно повећање ензимске активности забележено је од 6. дана до 12. дана, када је измерен ензимски максикум (0.31 IU mL^{-1}). У подлози ДЗ, ензимска активност је била значајно инхибирана присуством детерџента у односу на контролу. Максимална ензимска активност у овој подлози је измерена 9. дана (0.03 IU mL^{-1}). У осталим фазама развоја мицелијума ензимска активност је била занемарљива. Резултати су приказани на графикону **5.10.2**.



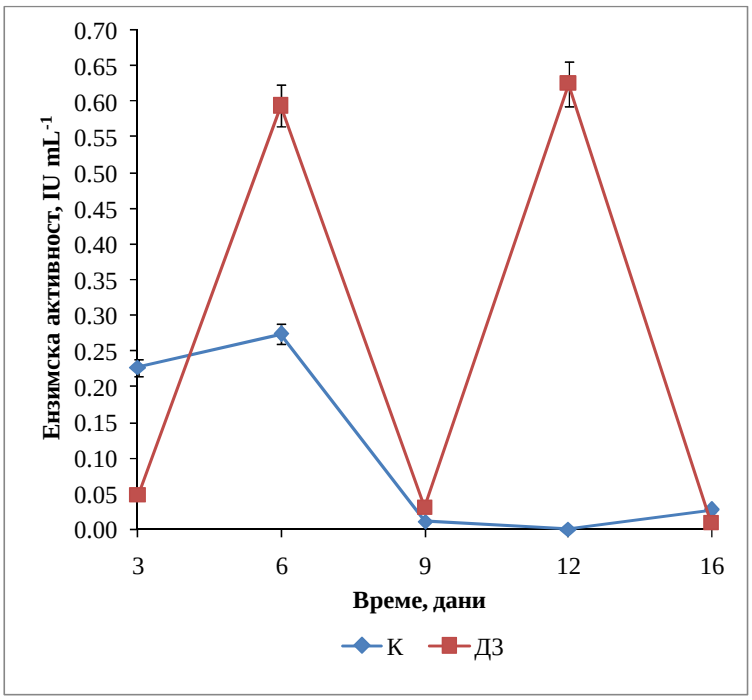
Графикон 5.10.2. Протеолитичка активност гљиве *P.chrysogenum*

Протеолитичка активност ферментационе течности гљиве *Penicillium cyclopium* у контролној подлози била је изражена у раној фази развоја мицелијума (3. дана), док је у фази експоненцијалног раста била потпуно инхибирана. Преласком у стационарну фазу, ензимска активност се нагло повећала и максималну вредност (0.73 IU mL^{-1}) је достигла 9. дана. Почетком аутолизе, ензимска активност се нагло смањивала и на крају експерименталног периода је била потпуно инхибирана. У подлози ДЗ, активност протеолитичких ензима је била изражена у раној фази раста мицелијума (6. дана), када је забележен ензимски максимум (0.64 IU mL^{-1}). У експоненцијалној фази раста дошло је но наглог смањења ензимске активности. Уласком у стационарну фазу, ензимска активност се благо повећала. Најмања активност протеолитичких ензима у овој подлози је измерена 16. дана. Резултати су приказани на графикону **5.10.3**.



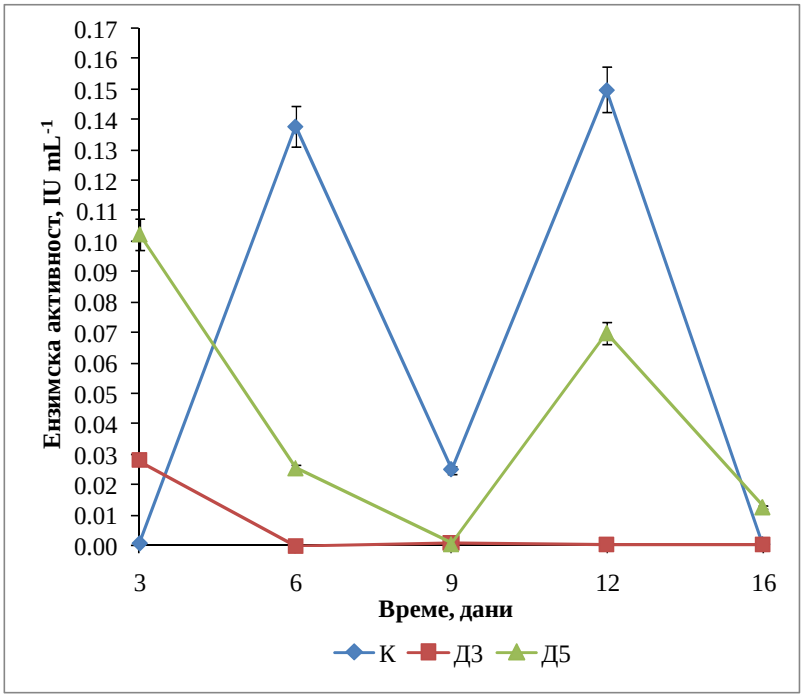
Графикон 5.10.3. Протеолитичка активност гљиве *P.cyclopium*

Протеолитичка активност ферментационе течности гљиве *Trichoderma harzianum* у контролној подлози била је изражена у експоненцијалној фази развоја мицелијума од 3. дана до 6. дана, када је измерен ензимски максимум (0.27 IU mL^{-1}). Уласком у стационарну фазу, ензимска активност се нагло смањивала и најмања је била у фази аутолизе (12. дана). У подлози ДЗ, активност протеолитичких ензима била је стимулисана присуством детерџента у односу на контролу. Максимална ензимска активност (0.59 IU mL^{-1}) је забележена у раној експоненцијалној фази раста (6. дана) и у стационарној фази (12. дана) (0.63 IU mL^{-1}). Најмања активност протеолитичких ензима је измерена 16. дана. Резултати су приказани на графикону **5.10.4**.



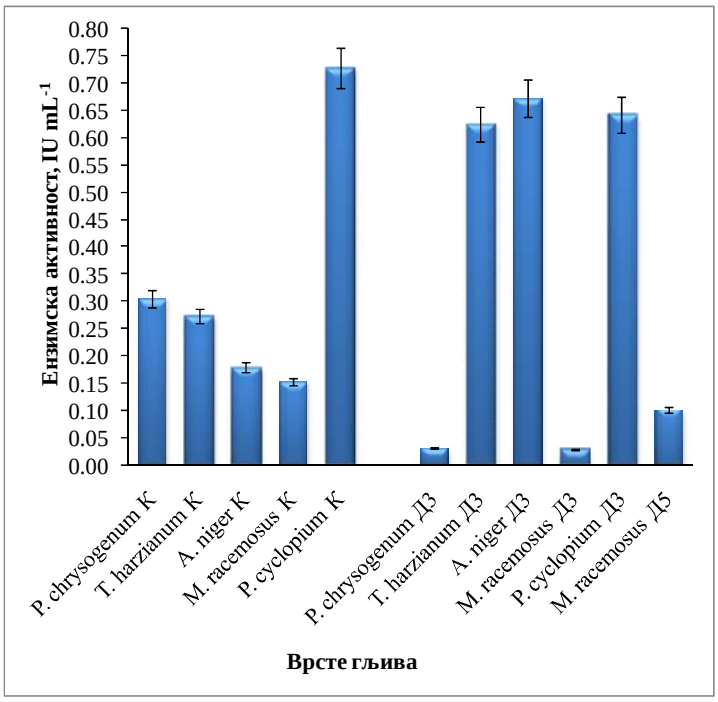
Графикон 5.10.4. Протеолитичка активност гљиве *T. harzianum*

На графикону **5.10.5.** приказана је протеолитичка активност гљиве *Mucor racemosus* у контролној подлози и у подлози са детерџентом 0,3% и 0,5% концентрације. Протеолитичка активност ферментационе течности гљиве *M. racemosus* у контролној подлози била је изражена у фази експоненцијалног раста (6. дана) и у фази аутолизе (12. дана) када је измерена максимална ензимска активност (0.15 IU mL^{-1}). У раној и у касној фази развоја гљиве ензимска активност није регистрована, док је у стационарној фази била веома слаба. Присуство детерџента у подлози утицало је на слабију протеолитичку активност у односу на контролу, у зависности од концентрације. У подлози Д3, ензимска активност је била најслабија и изражена само 3. дана, затим се нагло смањивала и била потпуно инхибирана од 6. дана до 16. дана. У подлози Д5, ензимска активност је била слабија у односу на контролу, а интензивнија у односу на подлогу Д3. Измерена су два ензимска максимума, 3. дана и 12. дана.



Графикон 5.10.5. Протеолитичка активност гљиве *M. racemosus*

На графикону **5.10.6.** приказана је максимална активност протеолитичких ензима гљива у ферментационој течности контроле и подлоге са детерџентом. У контролној подлози највећу ензимску активност имала је гљива *Penicillium cyclopium*, а најмању *Mucor racemosus*. Детерџент је испољио инхибиторно или стимулативно дејство на активност протеолитичких ензима у зависности од врсте гљиве. Инхибиторно дејство детерџента различитог интензитета забележено је код гљива *P. chrysogenum, P. cyclopium, M. racemosus.* Најслабије инхибиторно дејство детерџент је имао на ензимску активност гљиве *P. cyclopium*, а најјаче на ензимску активност гљиве *P. chrysogenum*. Снажно стимулативно дејство на активност протеолитичких ензима детерџент је испољио код гљива *T. harzianum* и *A. niger*, тако да би ове гљиве могле имати практичну примену у индустријској производњи алкалних протеаза као адитива у формулацији детерџента. Максималне активности ензима које су забележене у фази експоненцијалног раста гљива и у фази аутолизе указује на присуство и екстрацелуларних и интрацелуларних ензима у ферментационој течности.



Графикон 5.10.6. Утицај детерџента на протеазну активност гљива

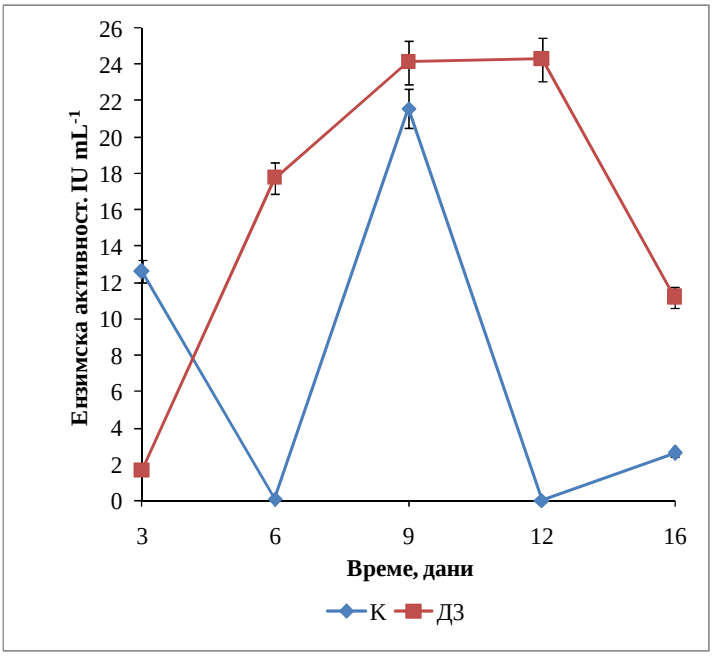
5.11. Утицај детерџента на активност алкалне фосфатазе

Фосфатазе хидролизују естре и анхидриде фосфорне киселине. Ови ензими су укључени у разне биолошке процесе, нпр. у ћелијски циклус, диференцирање и остале процесе. Оптимална pH за дејство алкалне фосфатазе је 9, али многобројна истраживања показала да је ензим активан у широком опсегу pH 3-9. Особине киселе и алкалне фосфатазе у хранљивој подлози (екстрацелуларни ензими) и екстракту мицелијума (цитоплазматски и ћелијски везани ензими) испитиване су код различитих гљива које су гајене у стационарним условима у течној минералној подлози (Reyes *и cap.*, 1990). Многе алкалне фосфатазе имају специфично дејство на супстрат. Продукција фосфатазе гљиве *A. awamor*i var. *kawachii* испитана је у подлогама са малом и великом концентрацијом фосфата. Ова гљива има максималну фосфатазну активност у подлози са малом концентрацијом фосфата, као и пекарски квасац, *E. coli* и *N. crassa* (Yoshiyuki *и cap*., 1968; Schmidt *и cap*., 1956). Са друге стране, у подлози са високом концентрацијом фосфата, фосфатазна активност је била слаба, али је већа за *β*-глицеросфат него за глукоза-6-фосфат. Истраживања Koffi *и*

cap., (2010) су показала да детерџент SDS испољава снажно инхибиторно дејство (око 98 %) на фосфатазну активност.

У овом истраживању је испитивана активност алкалне фосфатазе гљива у контролној подлози и у подлози са детерџентом, а резултати су приказани на графиконима 5.11.1. до 5.11.6.

Активност алкалне фосфатазе гљиве *Aspergillus niger* у ферментационој течности контролне подлоге и подлоге са детерџентом 0,3% концентрације приказана је на графикону **5.11.1**.

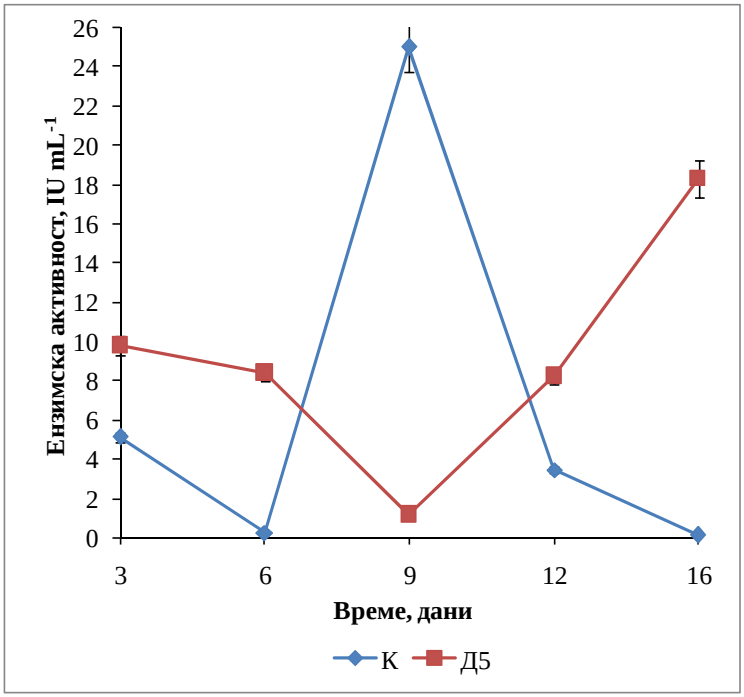


Графикон 5.11.1. Активност алкалне фосфатазе *A. niger*

Активност алкалне фосфатазе у контролној подлози смањивала се од 3. дана до 6. дана када је била потпуно инхибирана. Међутим, нагло повећање ензимске активности измерено је од 6. дана до 9. дана, када је измерен ензимски максимум (21,57 IU mL^{-1}). Крајем стационарне фазе дошло је до наглог смањења ензимске активности и потпуне инхибиције у фази аутолизе. У подлози ДЗ, ензимска активност се повећавала упоредо са развојем мицелијума, од 3. дана до 12. дана, када је ензимска активност била максимална (24,32 IU mL^{-1}). Највеће повећање ензимске активности забележено је у периоду од 3. дана до 6. дана. У периоду од 12. дана до 16. дана дошло је до значајног смањења ензимске активности. Присуство детерџента

у подлози деловало је стимулативно на активност алкалне фосфатазе у односу на контролу.

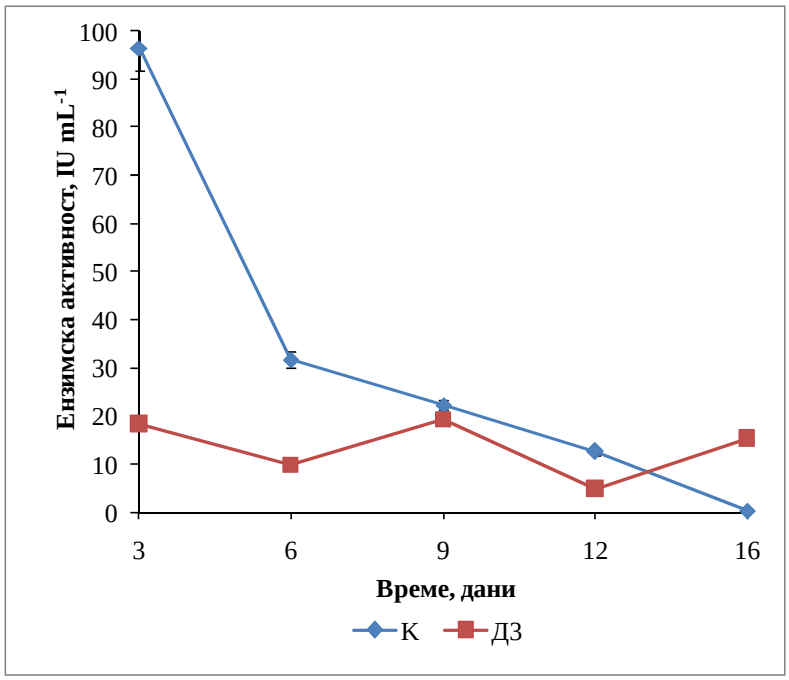
Активност алкалне фосфатазе гљиве *Penicillium chrysogenum* у ферментационој течности контролне подлоге и подлоге са детерџентом 0,3% концентрације приказана је на графикону **5.11.2**.



Графикон 5.11.2. Активност алкалне фосфатазе *P.chrysogenum*

Ензимска активност гљиве била је веома изражена у фази експоненцијалног раста, од 6. до 9. дана, када је измерен ензимски максимум (25 IU mL^{-1}). У осталим фазама развоја гљиве ензимска активност је била веома слаба. Након 9. дана ензимска активност се нагло смањивала све до краја огледа. У подлози Д3, активност алкалне фосфатазе је била променљива. Смањење ензимске активности забележено је у периоду од 3. дана до 9. дана, а нагло повећање ензимске активности у периоду од 9. дана до 16. дана, када је измерен ензимски максимум (18,27 IU mL^{-1}). Присуство детерџента у подлози утицало је на смањење активности алкалне фосфатазе у односу на контролу.

Активност алкалне фосфатазе гљиве *Penicillium cyclopium* у ферментационој течности контролне подлоге и подлоге са детерџентом 0,3% концентрације приказана је на графикону **5.11.3**.

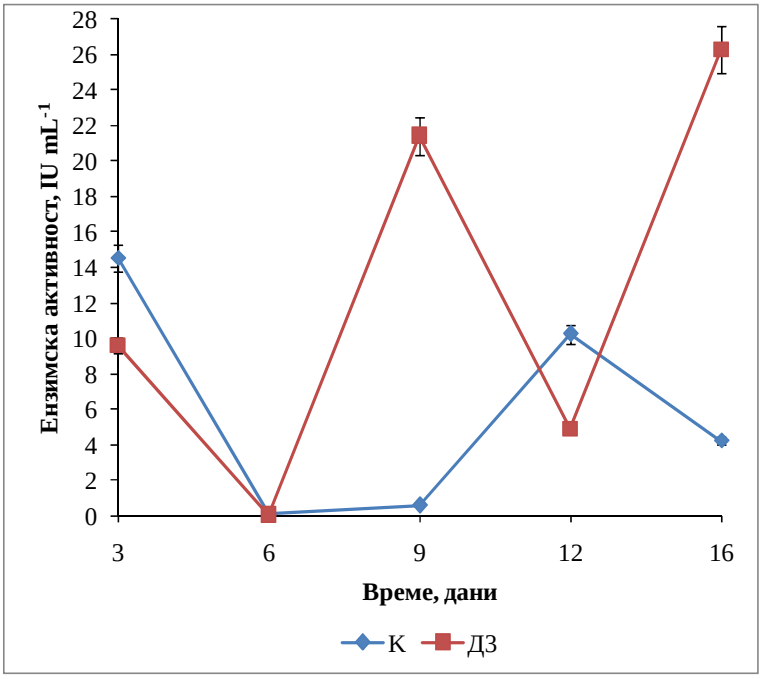


Графикон 5.11.3. Активност алкалне фосфатазе *P. cyclopium*

Максимална активност алкалне фосфатазе у контролној подлози (96,57 IU mL^{-1}) измерена је 3. дана, али се ензимска активност смањивала са продужењем времена култивације тако да је 16. дана била потпуно инхибирана. У подлози са детерџентом, ензимска активност је била инхибирана у односу на контролу (око 5 пута). Ензимска активност гљиве у подлози ДЗ била је променљива, у зависности од фаза развоја мицелијума. Смањење ензимске активности забележено је у периоду од 3. дана до 6. дана и од 9. дана до 12. дана. Повећање ензимске активности забележено је у периоду од 6. дана до 9. дана када је измерен ензимски максимум (19,14 IU mL^{-1}) и од 12. дана до 16. дана.

Активност алкалне фосфатазе гљиве *Trichoderma harzianum* у ферментационој течности контролне подлоге и подлоге са детерџентом 0,3% концентрације приказана је на графикону **5.11.4**.

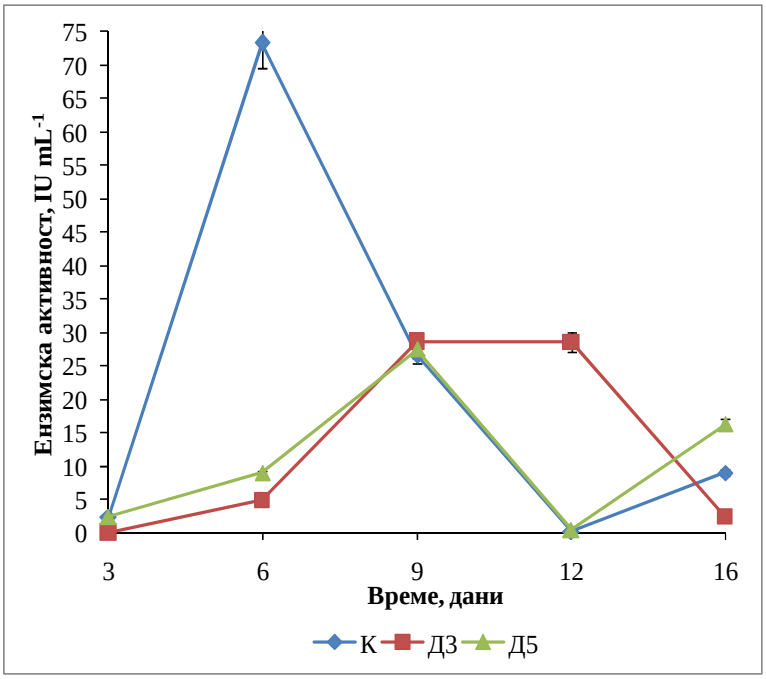
Ензимска активност алкалне фосфатазе у контроли била је изражена у различитим фазама развоја мицелијума. Максимална ензимска активност (14,51 IU mL^{-1}) је измерена 3. дана, а затим се нагло смањивала до 6. дана, када је била потпуно инхибирана. Међутим, у фази аутолизе (12. дана) ензимска активност је поново била изражена и нешто слабија у односу на 3. дан. Присуство детерџента у подлози значајно је стимулисало активност алкалне фосфатазе у односу на контролу. Ензимска активност у подлози Д3 је била променљива, нагло повећање је забележено у периоду од 6. до 9. дана, и у периоду од 12. до 16. дана када је измерен ензимски максимум (26,24 IU mL^{-1}).



Графикон 5.11.4. Активност алкалне фосфатазе *T. harzianum*

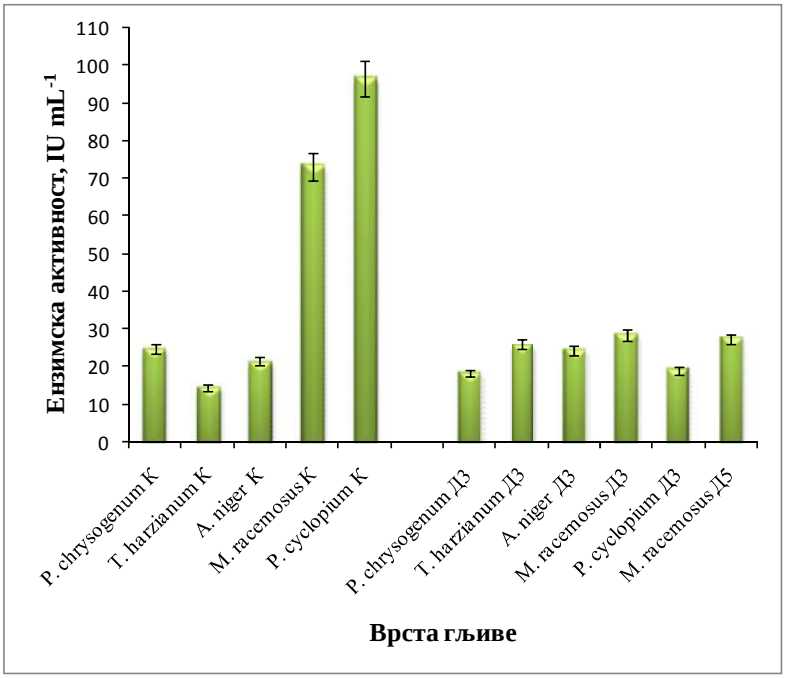
На графикону **5.11.5.** приказана је активност алкалне фосфатазе гљиве *Mucor racemosus* у ферментационој течности контролне подлоге и подлоге са детерџентом 0,3% и 0,5% концентрације. Активност алкалне фосфатазе у контролној подлози нагло се повећавала у периоду раста мицелијума од 3. дана до 6. дана, када је измерен ензимски максимум (73.23 IU mL^{-1}), а затим се нагло смањивала до 12. дана. Веома слична ензимска активност измерена је у подлогама Д3 и Д5, са максималним вредностима 9. дана (28.64 IU mL^{-1} и 27.48 IU mL^{-1}). Обе концентрације детерџента

испољиве су инхибиторно дејство (око 60%) на ензимску активност у односу на контролу.



Графикон 5.11.5. Активност алкалне фосфатазе *M. racemosus*

Утицај детерџента на активност алкалне фосфатазе гљива у односу на контролу приказан је на графикону **5.11.6**. У контролној подлози највећу ензимску активност имала је *P. cyclopium*, а нешто слабију активност *M. racemosus*. Детерџент је испољио стимулативно или инхибиторно дејство на ензимску активност у зависности од врсте гљиве. Најјаче инхибиторно дејство детерџент је испољио на ензимску активност *P. cyclopium* и *M. racemosus.* Стимулативно дејство детерџент је испољио на ензимску активност гљива *T. harzianum* и *A. niger*.

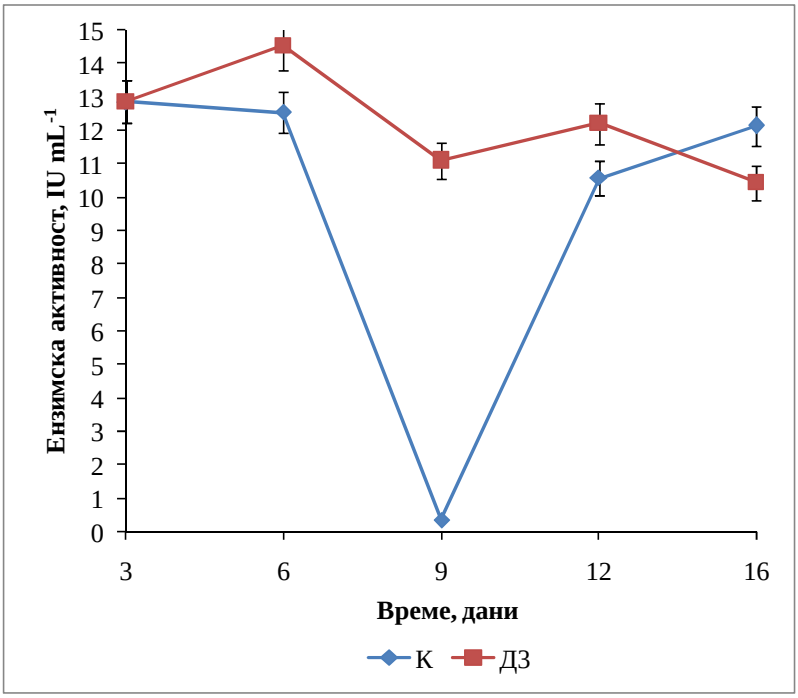


Графикон 5.11.6. Максимална фосфатазна активност гљива у подлогама

5.12. Утицај детерџента на активност фосфорилазе

Скроб фосфорилазе катализују реверзибилно претварање скроба и неорганског фосфата у глукоза-1-фосфат и имају важну улогу у метаболизму скроба у биљкама. Овај ензим се може користи за добијање глукоза-1-фосфата, цитостатика у кардиотерапији. Скроб фосфорилазе се такође могу користити за процену количине неорганског фосфата у серуму у патолошким условима, као и за утврђивање количине неорганског фосфатног загађења у окружењу. Имобилисани ензими имају велики индустријски значај због њихове могућности поновног коришћења. Упркос индустријској важности, скроб фосфорилаза је имобилисана из само неколико извора. Кумар и Санвал (1981) су први пут имобилизовали скроб фосфорилазу из листа зрелих банана на метилен-бис- акриламиду. Након тога је кромпир фосфорилаза имобилисана куповањем на нерастворном носачу кроз диазонијум соли и ковалентним везивањем између ензима и Еупергит Ц (Szulczinski, 1986). Код гљива је резервни шећер гликоген.

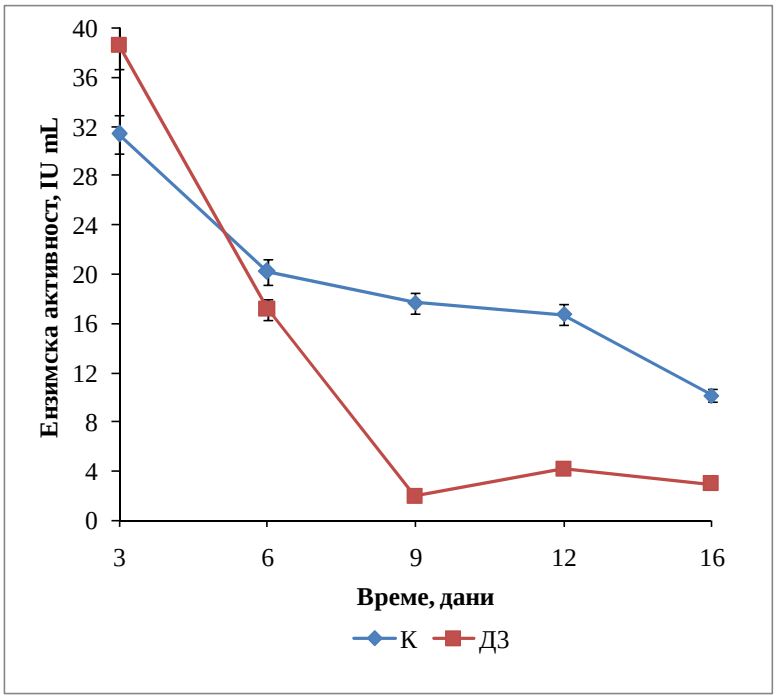
Активност фосфатазе гљиве *Aspergillus niger* у ферментационој течности контролне подлоге и подлоге са детерџентом 0,3% концентрације приказана је на графикону **5.12.1**. Активност ензима у контролној подлози била је изражена у почетним и каснијим фазама развића гљиве. Максимум ензимске активности измерен је 3. дана (12,87 IU mL^{-1}). Крајем експоненцијалне фазе и током стационарне фазе (9. дана) дошло је до статистички веома значајног смањења ензимске активности, када је измерен ензимски минимум. Међутим, почетком аутолизе активност ензима се поново повећала. У подлози ДЗ, максимална ензимска активност је измерена 6. дана (14,54 IU mL^{-1}). Након тога, ензимска активност се постепено смањивала до краја експеримента, са изузетком 12. дана. Најслабија ензимска активност забележена је 16. дана.



Графикон 5.12.1. Активност фосфорилазе *A. niger*

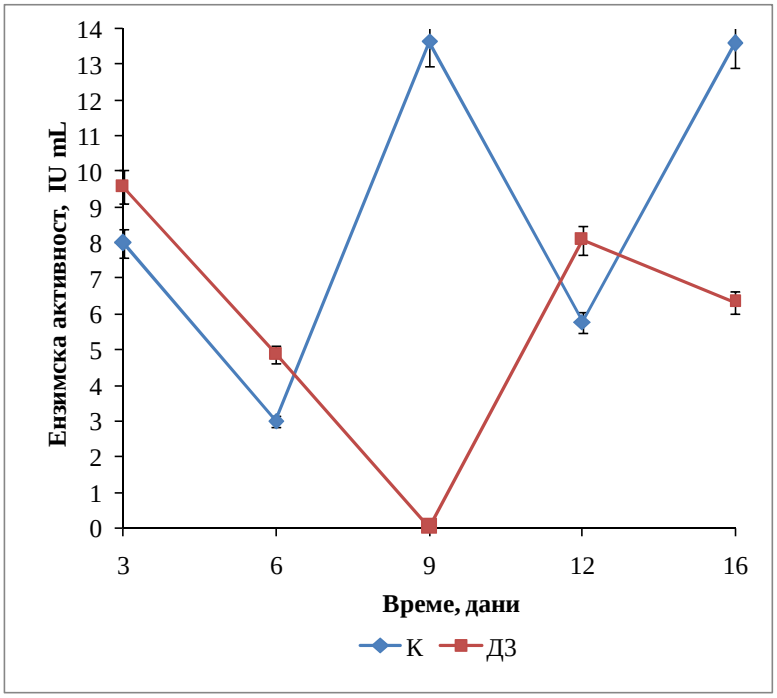
Активност фосфорилазе гљиве *Penicillium chrysogenum* у ферментационој течности контролне подлоге и подлоге са детерџентом 0,3% концентрације приказана је на графикону **5.10.2**. Максималне вредности ензимске активности у обе хранљиве подлоге измерене су 3. дана, (31,37 IU mL^{-1}) у контролној подлози и (38,61 IU mL^{-1}) у подлози ДЗ. Међутим, преодужењем периода култивације гљиве ензимска активност

се смањивала благо у контроли и нагло у подлози ДЗ. Најслабија ензимска активност измерена је 9. дана у подлози ДЗ. Детерџент је испољио стимулативно дејство на активност ензима у раној фази развоја гљиве и инхибиторно дејство током експоненцијане фазе раста.



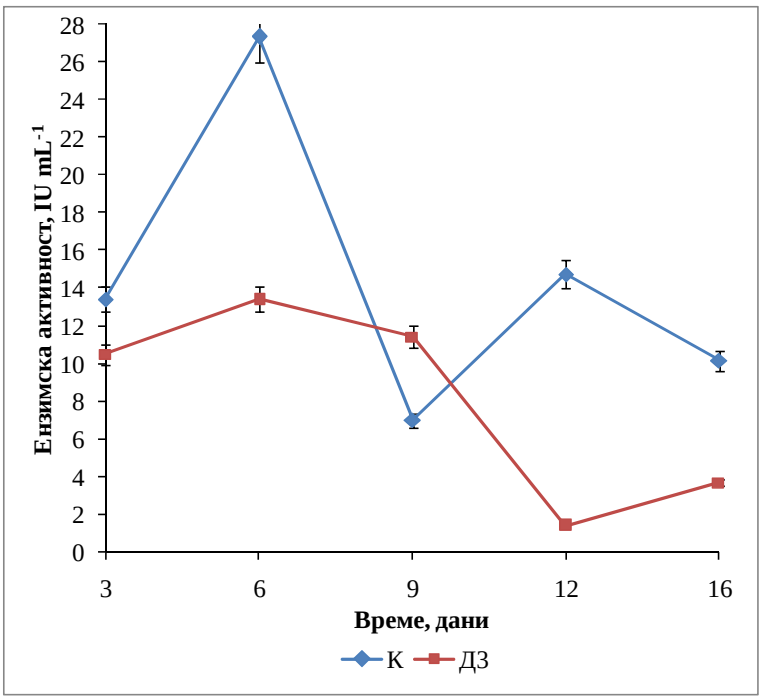
Графикон 5.12.2. Активност фосфорилазе *P.chrysogenum*

Активност фосфорилазе гљиве *Penicillium cyclopium* у ферментационој течности контролне подлоге и подлоге са детерџентом 0,3% концентрације приказана је на графикону **5.12.3**. Ензимска активност гљиве у контролној подлози била је променљива у зависности од фазе развоја гљиве. Слабија ензимска активност је забележена у раним фазама развоја, са минимумом 6. дана. Нагло повећање ензимске активности измерено је од 6. дана до 9. дана, када је активност ензима достигла максималну вредност (13,65 IU mL^{-1}). У подлози ДЗ, максимална ензимска активност је забележена 3. дана (9,57 IU mL^{-1})), након чега је дошло до наглог смањења ензимске активности и потпуне инхибиције 9. дана. Међутим, у периоду од 9. дана до 12. дана дошло је наглог повећања ензимске активности у подлози са детерџентом (ДЗ).



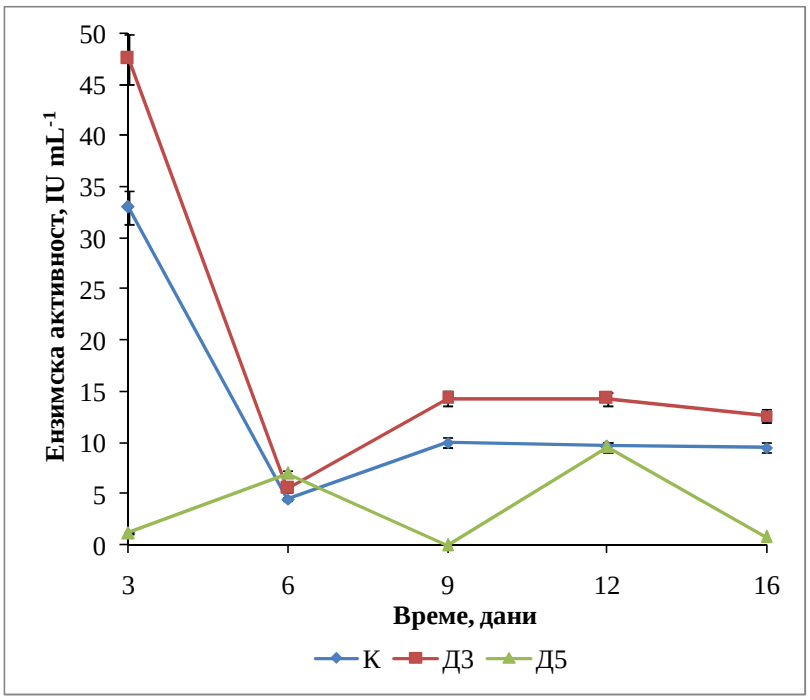
Графикон 5.12.3. Активност фосфорилазе *P. cyclopium*

Активност фосфорилазе гљиве *Trichoderma harzianum* у ферментационој течности контролне подлоге и подлоге са детерџентом 0,3% концентрације приказана је на графикону **5.12.4.** У контролној подлози ензимска активност је била променљива у зависности од фазе развоја гљиве. Максимална ензимска активност је забележена 6. дана (27,33 IU mL^{-1}), а минимална 9. дана. У подлози ДЗ ензимска активност је била двоструко слабија у односу на контролу и изражена у периоду од 3. дана до 9. дана, након чега је дошло до наглог смањења ензимске активности. Максимум ензимске активности је измерен 6. дана (13,40 IU mL^{-1}) Минимална ензимска активност је измерена 12. дана.



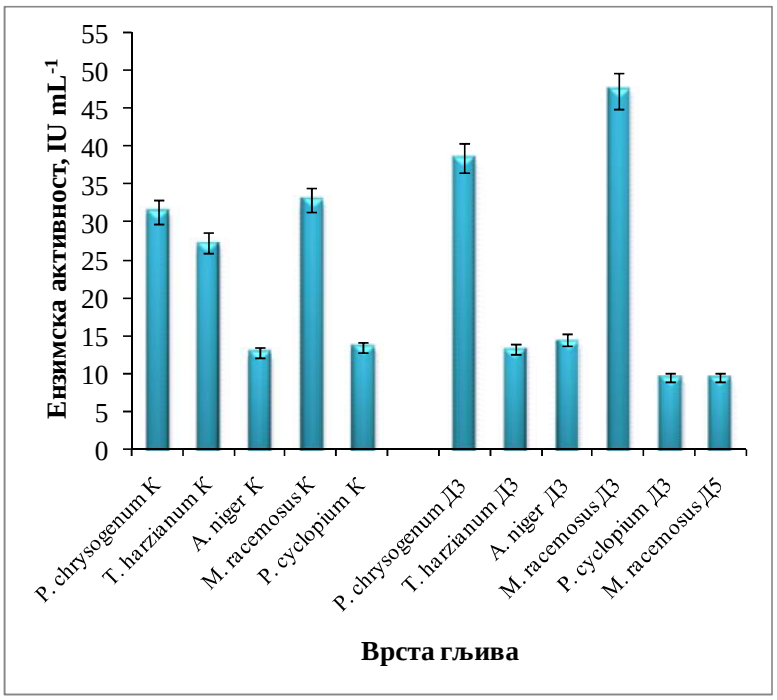
Графикон 5.12.4. Активност фосфорилазе *T. harzianum*

На графикону **5.12.5** приказана је активност фосфорилазе гљиве *Mucor racemosus* у ферментационој течности контролне подлоге и подлоге са детерџентом 0,3% и 0,5% концентрације. У контролној и подлози Д3, ензимска активност гљиве је била најизраженија у раној фази раста (3. дана), када је измерен ензимски максимум (33 IU mL^{-1} у К) и (47,46 IU mL^{-1} у Д3). Међутим, нагло смањење ензимске активности је забележено у експоненцијалној фази раста (6. дана), када је ензимска активност била минимална. Продужење периода култивације утицало је на благо повећање ензимске активности гљиве у ферментационој течности обе подлоге. У подлози Д5, ензимска активност гљиве је била и изражена само 6. дана и 12. дана, са ензимским максимумом (9,57 IU mL^{-1}). Мања концентрација детерџента у подлози (Д3) деловала је стимулативно а већа (Д5) инхибиторно на активност фосфорилазе гљиве у односу на контролу.



Графикон 5.12.5. Активност фосфорилазе *M. racemosus*

Утицај детерџента на активност фосфорилазе гљива у односу на контролну подлогу приказан је на графикону **5.12.6**. У контролној подлози, највећу ензимску активност имала је гљива *M. racemosus*, а незнатно слабију активност имале су *P.chrysogenum* и *T. harzianum.* Најмању ензимску активност имале су *P. cyclopium* и *A.niger*. Детерџент 0,3% концентрације деловао је као инхибитор ензимске активности гљива *T. harzianum, P. cyclopium* или као стимулатор ензимске активности гљива *P.chrysogenum, M. racemosus* и *A.niger*. Међутим, 0,5% детерџент је испољио снажно инхибиторно дејство на ензимску активност *M. racemosus.*



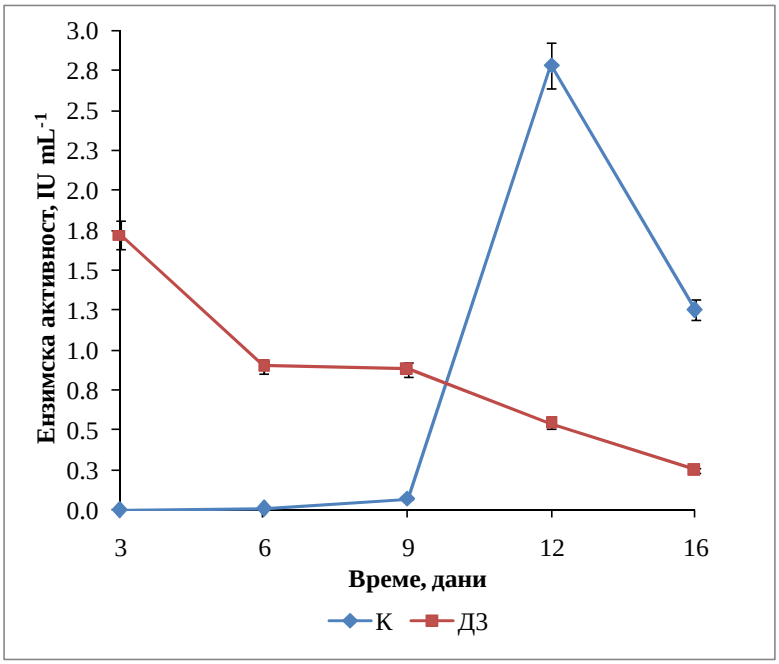
Графикон 5.12.6. Максимална фосфорилазна активност гљива у хранљивим подлогама

5.13. Утицај детерџента на активности рибонуклеазе (RNaze)

Нуклеазе су ензими који разлажу фосфодиестарске везе између нуклеотидних подјединица нуклеинских киселина. Обично се деле на егзо- и ендонуклеазе, мада се неки ензими могу сврстати у обе категорије. Егзонуклеазе делују на крајевима нуклеинских ланаца, односно одвајају крајње нуклеотиде. Реакција хидролиза се одвијаја било на 3’ или 5’ крају ланца. Ендонуклеазе разлажу фосфодиестарске везе у средини полинуклеотидних ланаца. Нуклеазе имају основну биолошку улогу у ћелијском расту и деоби стварајући слободне нуклеозиде и фосфате за синтезу нуклеинских киселина. Утврђено је да 11 родова маринских гљива *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Chaetomium*, *Fusarium*, *Gliomastix*, *Humicola*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Wardomyces*, *Periconia*, има значајну екстрацелуларну нуклеазну активност, и оне имају значајну улогу у циклусу органског фосфата и циклусу азота у океану. Ове нуклеазе су мање или више специфичне за једноланчану ДНА са високом специфичношћу према поли (У) супстрату стварајући 5’ фосфат мононуклеотиде. Висок ниво екстрацелуларне активности запажен је код изолата *Penicillium* spp.

Утврђено је током активног раста и спорулације *Penicillium melinii* постоји висока корелација између ензимске активности и усвајања тимидина што указује да су ови ензими неопходни за одржавање прекурзора нуклеотидног пула за биосинтезу ДНА током трансформације хифа у ваздушну мицелију и конидију у стресним условима.

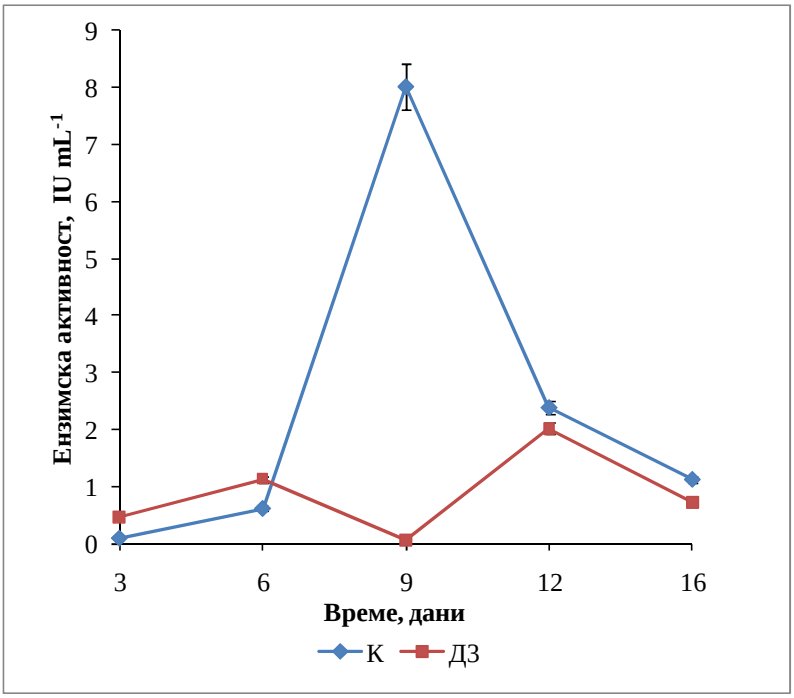
Активност рибонуклеазе гљиве *Aspergillus niger* у ферментационој течности контролне подлоге и подлоге са детерџентом 0,3% концентрације приказана је на графикону **5.13.1**. Активност рибонуклеазе у контролној подлози била је изузетно слаба у фази експоненцијалног раста и у стационарној фази, али је почетком аутолизе дошло до наглог повећања ензимске активности, са максимумом (2,78 IU mL^{-1}) 12. дана. У подлози ДЗ, ензимска активност је била око 2,5 пута слабија у односу на контролу. Највећа ензимска активност (1,72 IU mL^{-1}) је измерена почетком експоненцијалне фази раста (3. дана), а затим се постепено смањивала од 9. дана до 16. дана.



Графикон 5.13.1. Активност RNaze *A. niger*

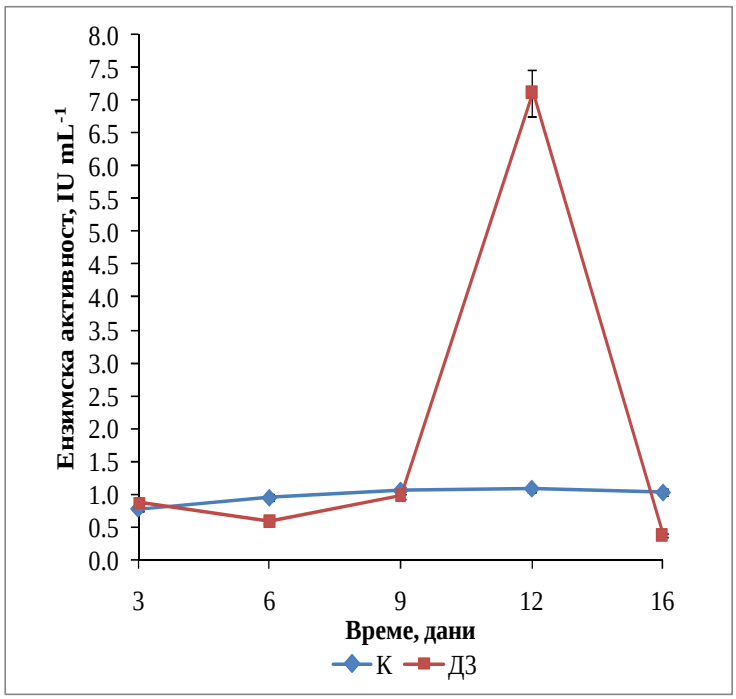
Активност рибонуклеазе гљиве *Penicillium chrysogenum* у ферментационој течности контролне подлоге и подлоге са детерџентом 0,3% концентрације приказана је на графикону **5.13.2**. Активност овог ензима у контролној подлози била је веома изражена у експоненцијалној фази раста (6. дана) када је измерен ензимски максимум

(8 IU mL^{-1}) и у фази аутолизе (12. дана). У подлози ДЗ, ензимска активност је била око 4 пута слабија у односу на контролу, и изражена у фази раста мицелијума 6. дана и 12. дана, када је измерен ензимски максимум (2 IU mL^{-1}).



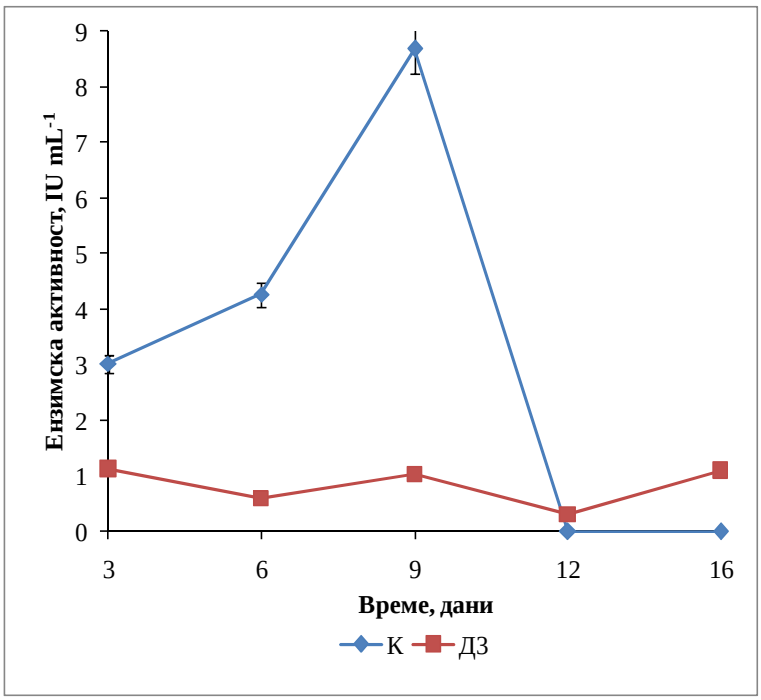
Графикон 5.13.2. Активност RNaze *P.chrysogenum*

Активност рибонуклеазе гљиве *Penicillium cyclopium* у ферментационој течности контролне подлоге и подлоге са детерџентом 0,3% концентрације приказана је на графикону **5.13.4**. Активност ензима рибонуклеазе у контроли се незнатно повећавала са експоненцијалним растом и преласком у стационарну фазу, а максимална вредност (1,1 IU mL^{-1}) је измерена у фази аутолизе (12. дана). У подлози ДЗ, ензимска активност је била промењљива у зависности од фазе раста мицелијума. Слабија ензимска активност је измерена у фази експоненцијалног раста и стационарној фази. Почетком аутолизе дошло до наглог повећања ензимске активности (12. дана), када је измерен ензимски максимум (7,12 IU mL^{-1}). Међутим, у периоду од 12. дана до 16. дана дошло је до наглог смањења ензимске активности када је забележена најслабија ензимска активност.



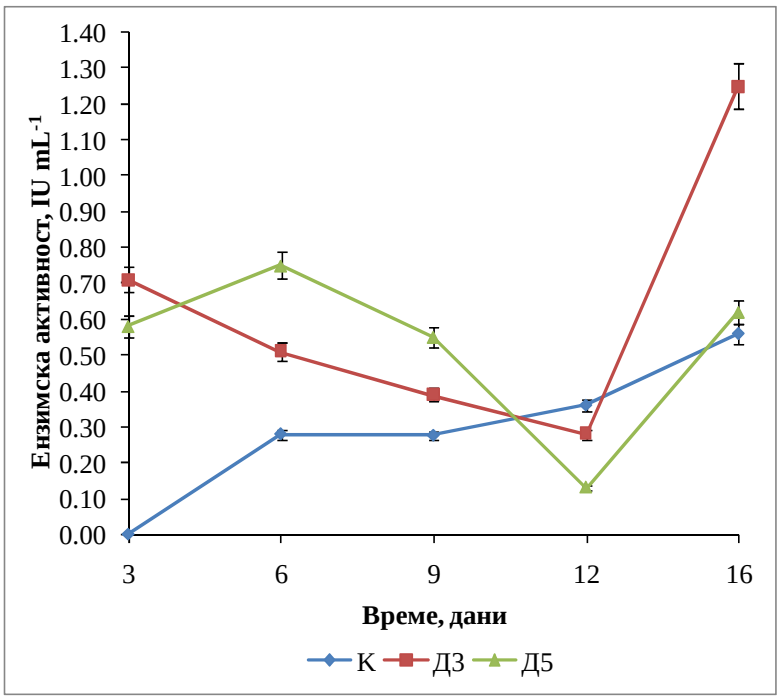
Графикон 5.13.4. Активност RNaze *P. cyclopium*

Активност рибонуклеазе гљиве *Trichoderma harzianum* у ферментационој течности контролне подлоге и подлоге са детерџентом 0,3% концентрације приказана је на графикону **5.13.4.** У контролној подлози ензимска активност се повећавала упоредо са експоненцијалним растом гљиве од 3. дана до 9. дана, када је забележена максимална ензимска активност (8,68 IU mL^{-1}). Међутим, крајем стационарне фазе и почетком аутолизе дошло је до наглог смањења и потпуне инхибиције ензимске активности. У подлози ДЗ, ензимска активност је била око 9 пута слабија у односу на контролу, са благим осцилацијама. Максимум ензимске активности је измерен 3. дана (1,13 IU mL^{-1}), али се након тога ензимска активност незнатно смањила (6. дана). Повећање ензимске активности забележено је у фази експоненцијалног раста од 6. дана до 9. дана и у стационарној фази од 12. дана до 16. дана.

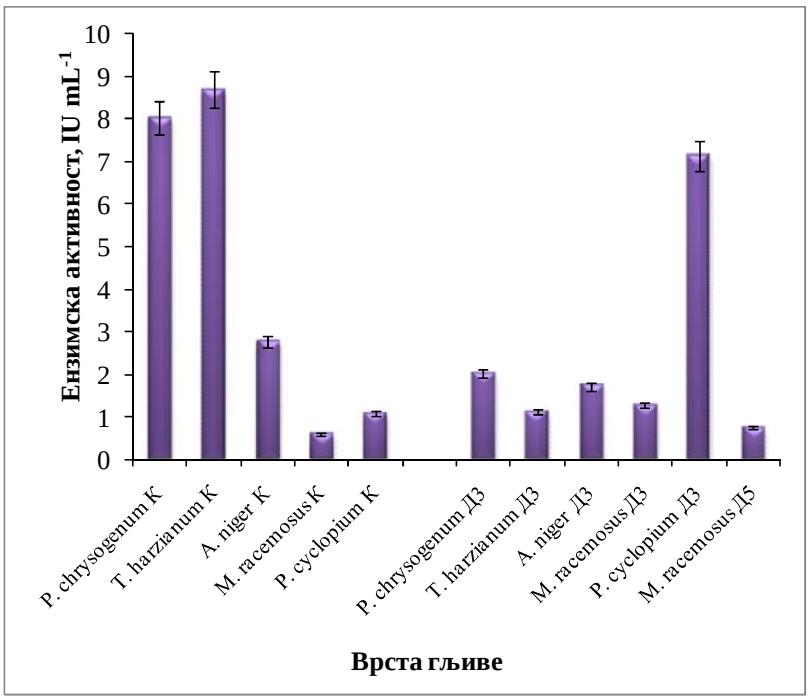


Графикон 5.13.4. Активност RNaze *T. harzianum*

На графикону **5.13.5.** приказана је активност рибонуклеазе гљиве *Mucor racemosus* у ферментационој течности контролне подлоге и подлоге са детерџентом 0,3% и 0,5% концентрације. Ензимска активност у контроли је била потпуно инхибирана 3. дана, а затим се нагло повећала у фази експоненцијалног раста 6. дана. До краја огледа ензимска активност је наставила да се повећава, и 16. дана је забележен ензимски максимум (0,46 IU mL^{-1}). У подлогама са детерџентом ензимска активност је била од 2 (Д5 подлога) до 2,5 пута (Д3 подлога) већа у односу на контролу. У подлози Д5, максимална ензимска активност (0,71 IU mL^{-1}) је забележена 6. дана, у примарној експоненцијалној фази раста. У подлози Д3, ензимска активност се смањивала од 3. дана до 12. дана, а затим је дошло до наглог повећања ензимске активности од 12. дана до 16. дана, када је забележена максимална активност ензима (1,24 IU mL^{-1}).



Графикон 5.13.5. Активност RNaze *M. racemosus*

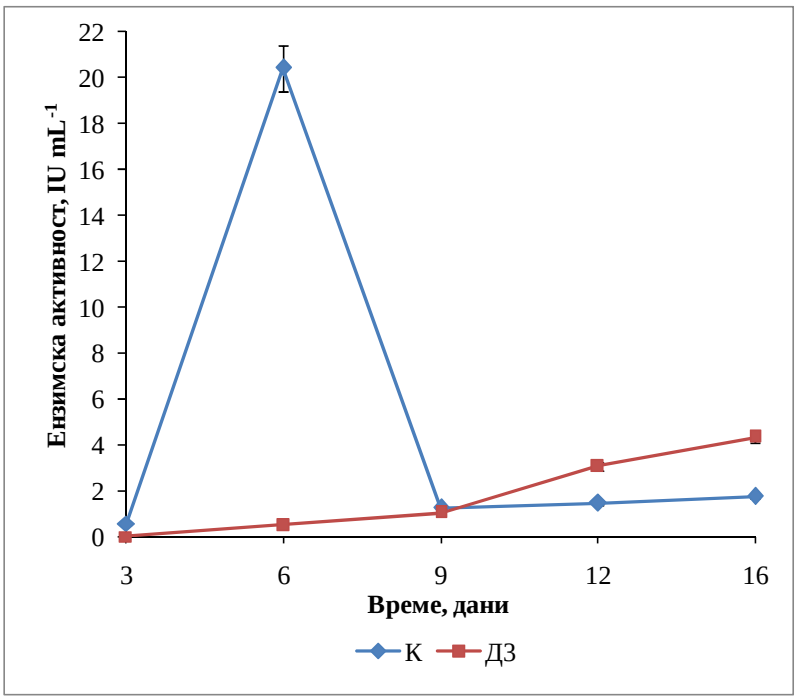


Графикон 5.13.6. Максималне вредности RNaze гљива у подлогама

На графикону **5.13.6.** приказана је максимална активност RNaze гљива у подлогама. У контролној подлози највећу ензимску активност имале су гљиве *T. harzianum* и *P.chrysogenum*, а веома слабу ензимску активност имале су *A. niger, P. cyclopium* и *M. racemosus.* Детерџент додат у хранљиву подлогу испољио је стимулативно или инхибиторно дејство на ензимску активност у зависности од врсте гљиве. У подлози ДЗ, највећу ензимску активност имала је гљива *P. cyclopium*, а најмању *M. racemosus* и *T. harzianum*. Најјаче инхибиторно дејство детерџент је испољио на ензимску активност *T. harzianum* и *P.chrysogenum*, а најмање на *A. niger*. Детерџент је деловао као изузетан стимулатор ензимске активности *P. cyclopium*. Гљива *M. racemosus* је имала већу ензимску активност у подлогама са детерџентом (највећу у подлози ДЗ) у односу на контролу.

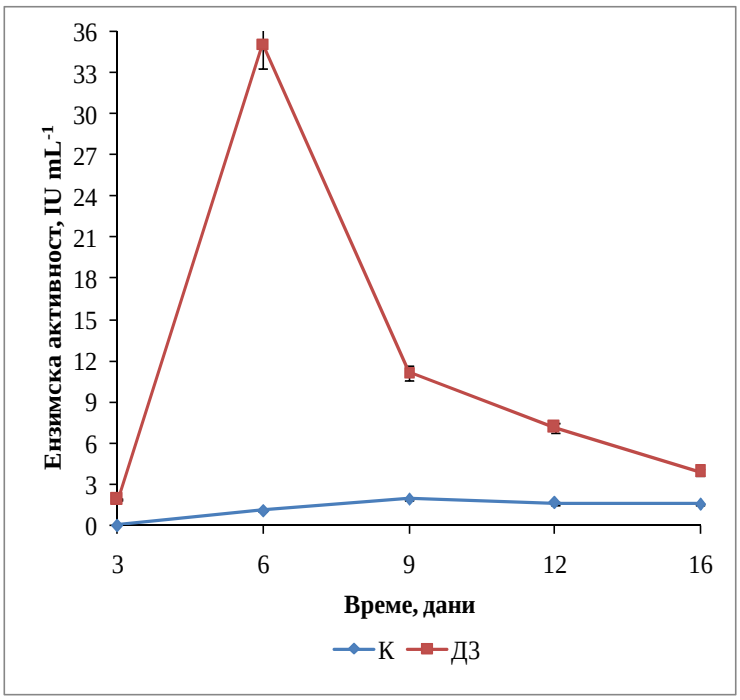
5.14. Утицај детерџента на активности деоксирибониклеазе (DNaze)

Активност DNaze гљиве *Aspergillus niger* у ферментационој течности контролне подлоге и подлоге са детерџентом 0,3% концентрације приказана је на графикону **5.14.1**. Активност деоксирибонуклеазе била је веома слаба у раној фази раста (3. дана). Међутим, у фази експоненцијалног раста (6. дана) забележено је веома значајно повећање ензимске активности и ензимски максимум (20,4 IU mL^{-1}). Преласком гљиве из експоненцијалне у стационарну фазу, од 6. дана до 9. дана, уследило је значајно смањење ензимске активности која се до краја експеримента није мењала. У подлози ДЗ, ензимска активност је била око 5 пута слабија у односу на контролу. Ензимска активност се повећавала са повећањем времена култивације. Међутим, повећање ензимске активности је било незнатно до 9. дана, а веома значајно од 9. до 16. дана, када је измерен ензимски максимум (4,3 IU mL^{-1}).



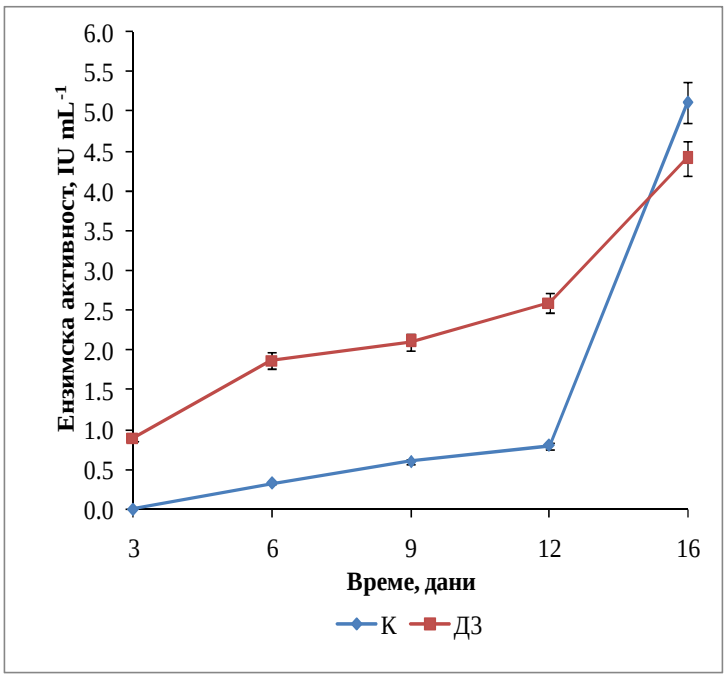
Графикон 5.14.1. Активност DNaze *A. niger*

Активност деоксирибонуклеазе гљиве *Penicillium chrysogenum* у ферментационој течности контролне подлоге и подлоге са детерџентом 0,3% концентрације приказана је на графикону **5.14.2**. Активност ензима у контролној подлози била је веома слаба у односу на подлогу са детерџентом. Ензимска активност се благо повећавала упоредо са повећањем времена култивације гљиве, од периода инокулације до 9. дана, када је измерен ензимски максимум (1,91 IU mL^{-1}). У подлози ДЗ, ензимска активност је била веома слаба у раној фази развоја гљиве (3. дана). Међутим, веома значајно повећање ензимске активности забележено је од 3. дана до 6. дана, када је измерен ензимски максимум (35,13 IU mL^{-1}). Након 6. дана, забележено је значајно смањење ензимске активности до 16. дана.



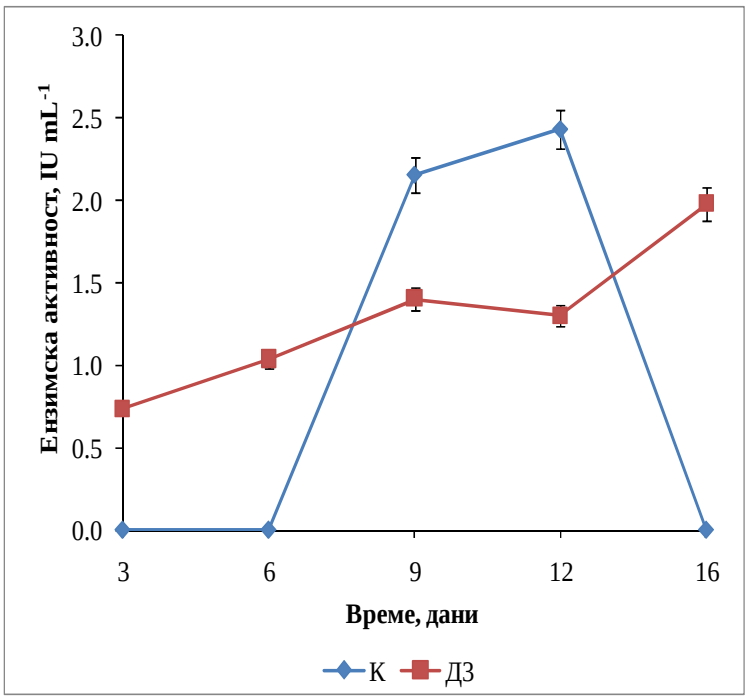
Графикон 5.14.2. Активност DNaze *P.chrysogenum*

Активност DNaze гљиве *Penicillium cyclopium* у ферментационој течности контролне подлоге и подлоге са детерџентом 0,3% концентрације приказана је на графикону **5.14.3**. Активност ензима деоксирибонуклеазе се повећавала упоредо са повећањем времене култивације у обе хранљиве подлоге, тако да је ензимски максимум измерен 16. дана. У подлози са детерџентом, активност ензима је била интензивнија (5 до 10 пута) у односу на контролу, у периоду од 3. дана до 12. дана. Међутим, од 12. дана до 16. дана, дошло је до веома значајног повећања ензимске активности у контроли (5,11 IU mL^{-1}), што се одразило незнатно већу ензимску активност у контроли у односу на подлогу са детерџентом (4,13 IU mL^{-1}).



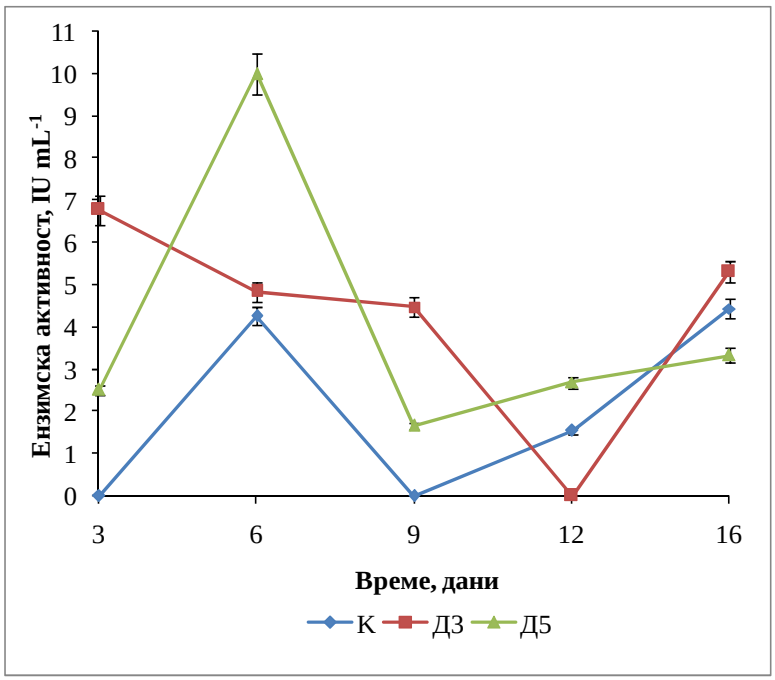
Графикон 5.14.3. Активност деоксирибонуклеазе *P. cyclopium*

Активност деоксирибонуклеазе гљиве *Trichoderma harzianum* у ферментационој течности контролне подлоге и подлоге са детерџентом 0,3% концентрације приказана је на графикону **5.14.4**. Активност ензима у контролној подлози била је веома изражена у фази експоненцијалног раста, а максимална вредност (2,16 IU mL^{-1}) је измерена у стационарној фази (9. дана). Почетком аутолизе, од 9. дана до 12. дана, дошло до наглог смањења ензимске активности. Након тога, ензимска активност се није значајно мењала до краја експеримента. У подлози ДЗ, ензимска активност је била слабија у односу на контролу. Значајна ензимска активност је измерена у раној фази раста (3. дана) и благо се повећавала до 6. дана. Незнатно смањење ензимске активности је измерено у периоду од 6. дана до 12. дана, након чега је дошло до значајног повећања ензимске активности. Повећањем временског периода култивације, ензимска активност гљиве се повећавала, тако да је максимум ензимске активности измерен 16. дана (1,98 IU mL^{-1}).

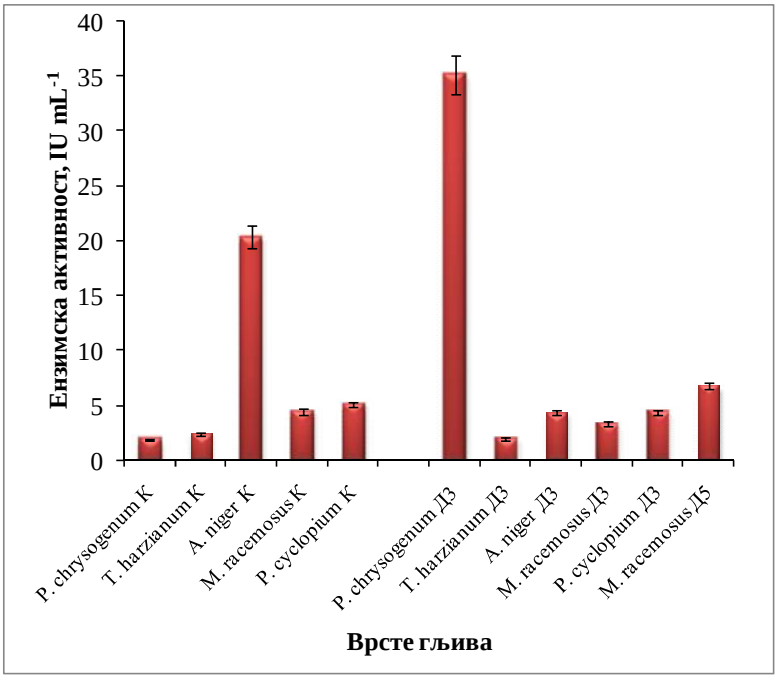


Графикон 5.14.4. Активност DNaze *T. harzianum*

На графикону **5.14.5.** приказана је активност DNAza гљиве *Mucor racemosus* у ферментационој течности контролне подлоге и подлоге са детерџентом 0,3% и 0,5% концентрације. Ензимска активност у контроли је била потпуно инхибирана 3. дана и 9. дана. Значајно повећање ензимске активности измерено је у периоду од 3. дана до 6. дана, и од 9. дана до 16. дана, када је измерен ензимски максимум (4,44 IU mL^{-1}). У подлогама са детерџентом ензимска активност је била већа у односу на контролу, од 1,2 (Д3 подлога) до 2 пута (Д5 подлога). У подлози Д3, максимална ензимска активност (6,78 IU mL^{-1}) је измерена 3. дана, а затим се значајно смањивала до 12. дана, када је била потпуно инхибирана. До наглог повећања ензимске активности поново је дошло од 12. дана до 16. дана. У подлози Д5, веома значајно повећање ензимске активности забележено је од 3. дана до 6. дана, када је измерен ензимски максимум (3,34 IU mL^{-1}). Од 6. дана до 9. дана, ензимска активност се нагло смањивала, а у периоду од 9. дана до 16. дана, дошло је благог раста ензимске активности.



Графикон 5.14.5. Активност деоксирибонуклеазе *M. racemosus*



Графикон 5.14.6. Максималне вредности DNaze у подлогама

На графикону **5.14.6.** приказане су максималне вредности DNaza које су гљиве продуковале у хранљивим подлогама. У контролној подлози, највећу ензимску активност имала је *A. niger*, а најмању *P.chrysogenum*. Детерџент додат у хранљиву

подлогу испољио је стимулативно или инхибиторно дејство на ензимску активност у зависности од врсте гљиве. У подлози Д3, највећу ензимску активност имала је гљива *P.chrysogenum,* а најмању *T. harzianum*. Гљива *M. racemosus* је имала већу ензимску активност у подлогама са детерџентом (највећу у подлози Д5) у односу на контролу. Најјаче инхибиторно дејство детерџент је испољио на ензимску активност *A. niger*.

5.15. Статистичка анализа резултата

Сви резултати мерења су приказани као средња вредност са стандардном девијацијом (MS±SD) три независна експеримента. Да би се испитао утицај детерџента на промене биохемијских параметара за сваку гљиву тестиране су средње вредности резултата унутар подлога (К, Д3 и Д5) и између подлога (К и Д3, К и Д5, Д3 и Д5) применом: Mann-Whitney и Wilcoxon теста. Применом Kruskal-Wallis теста испитано је да ли постоје разлике у биодеградацији тестираног детерџента између гљива. Корелација између испитиваних биохемијских параметара и линеарна регресија тестирани су са прагом значајности 0.05 и 0.01. Резултати су приказани графички и табеларно.

Статискичком анализом испитивано је да ли постоје статистичке значајне разлике између испитиваних биохемијских параметара у контролној подлози и подлози са детерџентом, са прагом значајности 0,05 и 0,01. Код гљива *P. chrysogenum* и *A. niger*, уношењем детерџента у хранљиву подлогу настале су статистичке значајне промене pH, редокс потенцијала, количине протеина, активности киселе и алкалне инвертазе. Код гљиве *T. harzianum*, уношењем детерџента у хранљиву подлогу настале су статистичке значајне промене pH, редокс потенцијала, количине протеина и биомасе. Код гљиве *P. cyclopium* уношењем детерџента у хранљиву подлогу настале су статистичке значајне промене биомасе и активности RNaze. Код гљиве *M. racemosus* додатак детерџента 0.3% концентрације утицао је на статистички значајне разлике у количини укупних органских киселина и биомасе, а детерџент 0.5% концентрације утицао је на статистички значајне разлике у фосфорилазној активности. Такође, постоје статистички значајне разлике у степену деградације детерџента у зависности од његове концентрације.

Тестирањем коефицијента корелације испитиван је степен корелације између биохемијских параметара гљива, а резултати су приказани у табели 5.2.

Табела 5.2. Корелација испитиваних биохемијских параметара

Correlations

			gljive	podlog	dani	biomas	protein	proteo	invertk	inverta	fosfata	fosforila	rnaza	dnaza	sok	uok	pH	redoks	degrad
Spearman	gljive	Correlation Co	1.00	.130	.010	-.01	-.26	.000	-.14	.190	.280	-.31	-.10	.130	.175	.210	.311	-.33	.015
		Sig. (2-tailed)	.	.341	.907	.91	.056	.97	.282	.149	.037	.01	.466	.34	.197	.105	.020	.011	.933
		N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	31
	podlogi	Correlation Co	.130	1.00	.043	-.36	-.47	-.14	-.49	.315	.142	-.34	-.01	.399	.284	.507	.570	-.57	.402
		Sig. (2-tailed)	.341	.	.752	.00	.000	.30	.000	.011	.296	.00	.938	.00	.034	.000	.000	.00	.025
		N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	31
	dani	Correlation Co	.010	.043	1.00	.52	.38	-.22	.047	.244	.041	-.27	.040	.299	.455	.233	-.30	.32	.753
		Sig. (2-tailed)	.907	.752	.	.00	.004	.08	.730	.070	.764	.03	.768	.02	.000	.086	.022	.016	.000
		N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	31
	biomas	Correlation Co	-.01	-.36	.52	1.00	.45	.02	.399	-.12	-.01	-.07	.315	.00	.184	.007	-.49	.50	.804
		Sig. (2-tailed)	.91	.006	.000	.	.001	.85	.002	.366	.918	.57	.019	.96	.174	.954	.000	.00	.000
		N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	31
	protein	Correlation Co	-.26	-.47	.38	.45	1.00	-.23	.429	-.19	-.16	.18	-.05	-.00	.377	-.05	-.80	.80	.424
		Sig. (2-tailed)	.056	.000	.00	.00	.	.08	.001	.154	.239	.18	.714	.95	.004	.665	.000	.00	.018
		N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	31
	proteol	Correlation Co	.000	-.14	-.22	.02	-.23	1.00	-.01	-.21	-.08	.00	.231	-.32	-.20	-.11	.116	-.12	-.12
		Sig. (2-tailed)	.97	.303	.089	.85	.083	.	.934	.111	.532	.96	.086	.01	.124	.415	.396	.37	.491
		N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	31
	invertki	Correlation Co	-.14	-.49	.04	.39	.42	-.01	1.00	-.27	-.02	.11	.094	-.12	-.05	-.26	-.39	.39	.094
		Sig. (2-tailed)	.28	.000	.73	.00	.001	.93	.	.044	.855	.39	.490	.36	.68	.049	.003	.00	.615
		N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	31
	inverta	Correlation Co	.190	.315	.244	-.12	-.19	-.21	-.27	1.00	.256	-.26	.090	.14	.254	.36	.238	-.25	.495
		Sig. (2-tailed)	.149	.018	.070	.36	.154	.11	.044	.	.057	.04	.512	.27	.059	.005	.077	.06	.005
		N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	31
	fosfata	Correlation Co	.280	.142	.041	-.01	-.16	-.08	-.02	.256	1.00	-.19	.000	-.03	.119	.148	.219	-.20	.251
		Sig. (2-tailed)	.037	.296	.764	.91	.239	.53	.855	.057	.	.15	.954	.77	.384	.277	.105	.12	.173
		N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	31
	fosforil	Correlation Co	-.31	-.34	-.27	-.07	.18	.000	.115	-.26	-.19	1.00	.123	-.03	-.17	-.30	-.20	.21	-.50
		Sig. (2-tailed)	.01	.008	.03	.57	.18	.96	.399	.044	.151	.	.365	.82	.187	.023	.129	.10	.004
		N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	31
	rnaza	Correlation Co	-.10	-.01	.040	.31	-.05	.23	.094	.090	.008	.12	1.00	.05	.075	.019	-.03	.03	-.02
		Sig. (2-tailed)	.466	.938	.768	.01	.714	.08	.490	.511	.954	.36	.	.69	.584	.889	.813	.81	.901
		N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	31
	dnaza	Correlation Co	.130	.399	.299	.00	-.00	-.32	-.12	.149	-.03	-.03	.054	1.00	.411	.369	.147	-.15	.201
		Sig. (2-tailed)	.341	.002	.025	.96	.954	.01	.361	.274	.776	.82	.695	.	.001	.006	.279	.26	.263
		N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	31
	sok	Correlation Co	.175	.284	.455	.18	.377	-.20	-.05	.254	.119	-.17	.075	.411	1.00	.633	-.25	.27	.555
		Sig. (2-tailed)	.197	.034	.000	.17	.004	.12	.680	.059	.384	.18	.584	.00	.	.000	.057	.04	.001
		N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	31
	uok	Correlation Co	.210	.507	.233	.00	-.05	-.11	-.26	.369	.148	-.30	.019	.369	.633	1.00	.182	-.17	.667
		Sig. (2-tailed)	.105	.000	.086	.95	.665	.41	.049	.005	.277	.02	.889	.00	.000	.	.180	.21	.000
		N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	31
	pH	Correlation Co	.311	.570	-.30	-.49	-.80	.11	-.39	.234	.219	-.20	-.03	.14	-.25	.182	1.00	-.98	-.60
		Sig. (2-tailed)	.020	.000	.022	.00	.000	.39	.003	.077	.105	.12	.813	.27	.057	.180	.	.00	.000
		N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	31
	redoks	Correlation Co	-.33	-.57	.32	.50	.80	-.12	.394	-.25	-.20	.21	.032	-.15	.275	-.17	-.98	1.00	.596
		Sig. (2-tailed)	.011	.000	.016	.00	.000	.37	.003	.061	.129	.10	.813	.26	.040	.210	.000	.	.000
		N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	31
	degrad	Correlation Co	.015	.402	.753	.80	.424	-.12	.094	.495	.251	-.50	-.02	.201	.555	.667	-.60	.596	1.00
		Sig. (2-tailed)	.933	.025	.000	.00	.018	.49	.615	.005	.172	.00	.901	.26	.001	.000	.000	.000	.
		N	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31

*.Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

**.Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Линеарном регресијом је испитивана зависност биомасе од биохемијских параметара (Табела 5.3). На биомасу утичу: протеини, алкална и кисела инвертаза, фосфорилаза, DNaza, слободне органске киселине и редокс потенцијал.

Табела 5.3. Променљиве које утичу на биомасу гљива

Excluded Variables [g]

Model		Beta In	t	Sig.	Partial Correlation	Collinearity Statistics: Tolerance
2	uok	.019 [a]	.135	.895	.033	.270
3	uok	.008 [b]	.062	.951	.015	.280
	rnaza	-.033 [b]	-.385	.705	-.090	.661
4	uok	.003 [c]	.024	.981	.006	.281
	rnaza	-.027 [c]	-.318	.754	-.073	.670
	proteolit	-.049 [c]	-.624	.540	-.142	.741
5	uok	.009 [d]	.074	.941	.017	.283
	rnaza	-.032 [d]	-.395	.697	-.088	.680
	proteolit	-.041 [d]	-.537	.597	-.119	.758
	fosfataza	-.046 [d]	-.606	.551	-.134	.763
6	uok	.012 [e]	.096	.925	.021	.284
	rnaza	-.040 [e]	-.485	.632	-.105	.685
	proteolit	-.033 [e]	-.432	.670	-.094	.764
	fosfataza	-.034 [e]	-.442	.663	-.096	.779
	pH	.190 [e]	1.097	.285	.233	.144
7	uok	.031 [f]	.248	.806	.053	.291
	rnaza	-.060 [f]	-.779	.444	-.164	.759
	proteolit	-.042 [f]	-.544	.592	-.115	.774
	fosfataza	-.021 [f]	-.275	.786	-.059	.800
	pH	.154 [f]	.892	.382	.187	.149
	degradac	.121 [f]	1.012	.323	.211	.308

a. Predictors in the Model: (Constant), degradac, dnaza, rnaza, proteolit, invertkis, fosfataza, fosforilaza, proteini, invertalk, pH, sok, redoks

b. Predictors in the Model: (Constant), degradac, dnaza, proteolit, invertkis, fosfataza, fosforilaza, proteini, invertalk, pH, sok, redoks

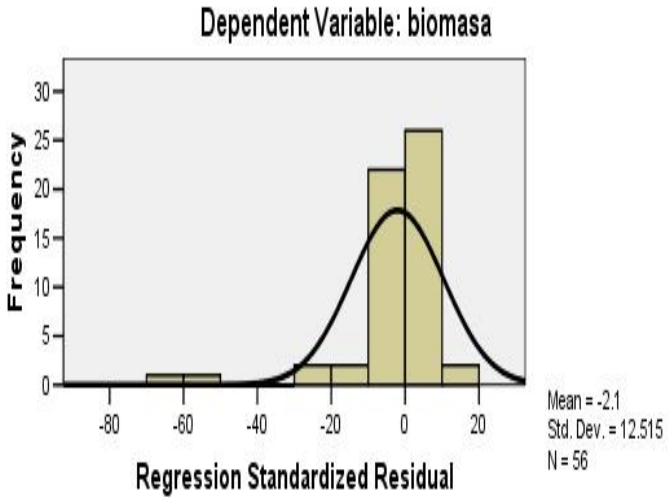
c. Predictors in the Model: (Constant), degradac, dnaza, invertkis, fosfataza, fosforilaza, proteini, invertalk, pH, sok, redoks

d. Predictors in the Model: (Constant), degradac, dnaza, invertkis, fosforilaza, proteini, invertalk, pH, sok, redoks

e. Predictors in the Model: (Constant), degradac, dnaza, invertkis, fosforilaza, proteini, invertalk, sok, redoks

f. Predictors in the Model: (Constant), dnaza, invertkis, fosforilaza, proteini, invertalk, sok, redoks

g. Dependent Variable: biomasa



Графикон 5.15. Зависност биомасе од испитиваних биохемијских параметара

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Abu-Zreig, M., Rudra P.R., Dickinson T.W., (2003) Effect of application of surfactants on hydraulic properties of soils. *Biosyst Eng.*, **84**, 363–372.
2. Adrio J.L., Demain A.L., (2003) Fungal biotechnology. *Int Microbiol.,* **6,** 191–199.
3. Akpoveta O.V., Egharevba F., Medjor O.W., (2011). A pilot study on the hydrocarbon and its kinetics on kerosene simulated soil. *Int J Env Sci.,* **2,** 54-67.
4. Amirmozafari N., Malekzadeh F., Hosseini F., Ghaemi N., (2007) Isolation and identification of anionic surfactant degrading bacteria from activated sludge, *IBJ*, **11,** 81-86
5. Andreoni V., Gianfreda L., (2007) Bioremediation and monitoring of aromatic polluted habitats. *Appl Microbiol Biotechnol.,* **76**, 287-308.
6. Anson M.L., (1938) The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol*., **20,** 79-89.
7. APHA (1989) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater,* 17th Edition, American Public Health Association, Washington, USA, p. 1 268.
8. Asea P.E.A., Kucey R.M.N., Stewart J.W.B., (1988) Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. *Soil Biol. Biochem.,* **20,** 459–464.
9. Ash M., Ash I.,(1993) *Handbook of Industrial Surfactants,* Gower, Aldershot,UK.
10. Ashok Kumar B, Kayalvizhi, N, Gunasekaran, P., (2001) Optimization of media for a fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. *Process Biochem.,* **37**, 331-338.
11. Bago B., Vierheilig H., Piche Y., Azcon-Aguilar C., (1996) Nitrate depletion and pH changes induced by the extraradical mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices grown in monoxenic culture. *New Phytol*., **133,** 273-280.
12. Ballicora M.A., Frueauf J.B., Fu Y., Schürmann P., Preiss J., (2000) Activation of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase by thioredoxin. *J. Biol. Chem*., **275,** 1315-20.
13. Balmer Y., Koller A., Del Val G., Manieri W., Schürmann P., Buchanan B.B., (2003) Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A***, 100,** 370-375.
14. Banat IM, Makkar RS, Cameotra SS., (2000) Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol*., **53**, 495-508.

15. Banke S, Rosendahl S, Frisvad JC., (1997) Taxonomy of *Penicillium chrysogenum* and related xerophilic species, based on isozyme analysis. *Mycological Research*, **101**, 617–624.
16. Bengoechea C., Samuel Cantarero A., (2009) Analysis of Linear Alkylbenzene Sulfonate in Waste Water and Sludge by High Performance Liquid Chromatography: An Exercise of Validation. *J Surfactants Deterg.*, **12**, 21-29.
17. Beškoski V.P., Gojgic-Cvijovic G.Đ., Milic J.S., Ilic M.V., Miletic S.B., Jovancicevic B.S., Vrvic M.M., (2012) Bioremedijacija zemljišta kontaminiranog naftom i naftnim derivatima: mikroorganizmi, putanje razgradnje, tehnologije. *Hem. Ind*., **66,** 275–289.
18. Borgia P.T., Sypherd P.S., (1977) Control of beta-glucosidase synthesis in Mucor racemosus. *J. Bacteriol*., **130,** 812-817.
19. Buestein B.R., Hiliton C.L., (1982) Amphoteric Surfactants, Marcel Dekker, New York.
20. Bulen, W.A., Varner, J.E., Burrell, R.C., (1952). Separation of organic acids from plant tissues. *Anal. Chem*., **24,** 187-190.
21. Buvaneswari S., Damodarkumar S., Murugesan S., (2013) Bioremediation studies on sugar-mill effluent by selected fungal species. *Int J Cur Microbiol App Sci.,* **2**, 50-58.
22. Cain R.B., Willats A.J., Bird J.A., (1971) Surfactant biodegradation: metabolism and enzymology. In: Biodegradation of materials. New York, John Wiley & Sons, Vol 2, pp. 136-144.
23. Cavalli L., (2004) in *Handbook of Detergents, Part B: Environmental Impact, Surfactant Science Series* (Zoller, U., ed.) Marcel Dekker, New York, Vol. 121, pp. 373-427.
24. Cavalli L., Clerici R., Radici P., Valtorta L., (1999b) Update on LAB/LAS. *Tenside Surf. Det.*, **36**, 254-258.
25. Chaturvedi V., Kumar A., (2010) Toxicity of sodium dodecyl sulfates in fishes and animals. *IJABPT*, **1**, 630-633.
26. Chen H.M., Chan S.C., Wu C.C., Cuo T.S., Wu J.S., Juang R.H., (2002) Regulation of the catalytic behavior of L-form starch phosphorylase from sweet potato roots by proteolysis. *Physiol. Plant*., **114,** 506-515.

27. Chouhan P.K., Prakash D., (2013) Comparative study of amino acids production by *Aspergillus wentii* in different culture media. *Int J Curr Pharm Res.*, **5**, 33-36.
28. Chouhan P.K., Verma P., Sharma M., Mali K., (2013) Comparative study of amylase production by small scale fermentation technology under laboratory conditions using *Aspergillus niger*. *J Bioprocess Technol Photon*, **98**, 260-265.
29. Clark D.P., (1989) The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **5,** 223-34.
30. Cook A.M., (1998) Sulfonated surfactants and related compounds: facets of their desulfonation by aerobic and anaerobic bacteria. *Tenside Surfact Det.*, **35,** 52-56.
31. Coon M.J., (2005) Omega oxygenases: nonheme-iron enzymes and P450 cytochromes. *Biochem Biophys Res Commun.*, **338,** 378–385.
32. Crewther W.G., Lennox F.G., (1953) Enzymes of *Aspergillus oryzae*. III. The sequence of appearance and some properties of the enzymes liberated during growth. *Aust J Biol Sci.*, **6,** 410-427.
33. Curtis T.P., Sloan W.T., Scannell J.W., (2002) Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 10494-9.
34. Danno G., Yoshimura S., (1967) Studies on an alkaline proteinase of *Aspergillus sydowi* part 1: Purification and some properties of the proteinase. *Agri Bio Chem*., **31,** 1151-1158.
35. Das N., Vimala R., Karthika P., (2008) Biosorption of heavy metals-an overview. *Indian J Biotechnol*.,**7**, 159-169.
36. De Hoog G.S., Guarro J., (1995) Atlas of clinical fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn and Delft, The Netherles.
37. Divo C., Cardini G., (1980) Primary and total biodegradation of linear alkylbenzene sulphonates. *Tenside Surfact Det.*, **17**, 30-36.
38. Dokić P., (2000) Deterdženti i hemijske osnove pranja i čišćenja čvrstih površina, u Sanitacija pogona i tehnološke opreme, izdavač AD Novosadski sajam, Novi Sad.
39. Domsch K.H., Gams W., Yerson T.H., (1980) Compendium of soil fungi. Vol. 1. Academic Press, London, UK.

40. Dong W., Eichhorn P., Radajewski S., Schleheck D., Denger K., Knepper T.P., Murrell J.C., Cook A.M., (2004) *Parvibaculum lavamentivorans* converts linear alkylbenzenesulfonate (LAS) surfactant to sulfophenylcarboxylates, *α,β*-unsaturated sulfophenylcarboxylates and sulfophenyldicarboxylates, which are degraded in communities. *J Appl Microbiol*., **96**, 630–640.
41. Doolotkeldieva T.D., (2010) Microbiological Control of Flour-Manufacture: Dissemination of Mycotoxins Producing Fungi in Cereal Products. *Microbiol Insights*, **3**, 1–15.
42. Džokić D., (1985) Površinski aktivne materije, Beograd.
43. Elisane OdS, Célia FCdR, Cátia TdP, Ana V.L.S, Janaína FdMB, Susana J.K., Carlos A.V.B., (2008). Prescreening of filamentous fungi isolated from a contaminated site in Southern Brazil for bioaugmentation purposes. *Afr J Biotechnol.*, **7**, 1314-1317.
44. Estruch F., (2000) Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol. Rev.*, **24,** 469–486.
45. European Parliament Regulation (EC) No 648/2004 of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 on detergents, (2004). In *Official Journal of the European Union*, EC No 684/2004.
46. Evans E.C., Abdullahi A., (2012) Effect of surfactant inclusions on the yield and characteristics of protease from *Bacillus subtilis*. *Proc. Rom. Acad. Series B*, **2,** 108–112.
47. Farhadian M., Vachelard C., Duchez D., Larroche C., (2008) In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: a review. *Bioresour Technol*., **99**, 5296-308.
48. Farmer W.R., Lio J.C., (1997) Reduction of aerobic acetate production by *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*., **63,** 3205-3210.
49. Federle T.W., Itrich N.R., (2006). Fate of free and linear alcohol-ethoxylate-derived fatty alcohols in activated sludge. *Ecotox Environ Safe.*, **64**, 30–41.
50. Fiske C.H., Subbarow Y., (1925) The colorimetric determination of phosphorus, *J Biol Chem.*, **66,** 375-400.
51. Frisvald J.C., Samson R.A., (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium.* A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Stud Micol.*, **49**, 1-173.

52. Fritsche W., Hofrichter M., (2008) Aerobic Degradation by Microorganisms, In Biotechnology: Environmental Processes II, Volume 11b, Second Edition, Second Edition (eds H.-J. Rehm and G. Reed), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany.
53. Fuchs B.B., Mylonakis E., (2009) Our paths might cross: the role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways. *Eukaryot Cell*, **8**, 1616–1625.
54. Funhoff E.G., Bauer U., Garcia-Rubio I., Witholt B., van Beilen J.B., (2006) CYP153A6, a soluble P450 oxygenase catalyzing terminal-alkane hydroxylation. *J Bacteriol.,* **188,** 5220–5227.
55. Gard-Terech A., Palla J.C., (1986) Comparative kinetics study of the evolution of freshwater aquatic toxicity and biodegradability of linear and branched alkylbenzene sulfonates. *Ecotoxicol Environ Safe.,* **12**,127-140.
56. Garon D., Krivobok S., Wouessidjewe D., Seigle-Murandi F., (2002) Influence of surfactants on solubilization and fungal degradation of fluorene. *Chemosphere,* **47,** 303-309.
57. Gaur Ruchi R., Gupta A., Khare S.K., (2008) Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain: Production optimization by response surface methodology and application. *Bioresource Technol.*, **11**, 4796 –4802.
58. Gillespie M.J., Jermyn M.A., Woods E.F., (1952) Multiple nature of the enzymes of *Aspergillus oryzæ* and of horse-radish: enzymes of *Aspergillus oryzae*. *Nature,* **169**, 487-488.
59. Gojgic-Cvijovic G.D., Milic J.S., Solevic T.M., Beskoski V.P., Ilic M.V., Đokic L.S., Narancic T.M., Vrvic M.M., (2012) Biodegradation of petroleum sludge and petroleum polluted soil by a bacterial consortium: a laboratory study. *Biodegradation,* **23,** 1–14.
60. Golyshin P.N., Martins Dos Santos V.A., Kaiser O., Ferrer M., Sabirova Y.S., Lunsdorf H., Chernikova T.N., Golyshina O.V., Yakimov M.M., Puhler A., Timmis K.N., (2003) Genome sequence completed of Alcanivorax borkumensis, a hydrocarbon-degrading bacterium that plays a global role in oil removal from marine systems. *J Biotechnol.*, **106**: 215-20.

61. Grbavcic Ž.S., Bezbradica I.D., Karadžic M.I., Kneževic-Jugovic D.Z., (2009) Lipases and proteases produced by indigenous pseudomonas aeruginosa strain as potential detergent additives, *Hem. Ind*. **63,** 331–335
62. Guimaraes L.H.S., Somera A.F., Terenzi H.F., Polizeli M.L., Jorge J.A., (2009) Production of fructofuranosidase by *Aspergillus niveus* using agroindustrial residues as carbon sources: Characterization of an intracellular enzyme accumulated in the presence of glucose. *Process Biochem*., **44**, 237-241.
63. Hadibarata T., Tachibana S., (2009) Microbial Degradation of *n*-Eicosane by Filamentous Fungi. (Eds.), Obayashi Y., Isobe T., Subramanian A., Suzuki S. and Tanabe S., in *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry — Environmental Research in Asia*. pp. 323–329, Tokyo.
64. Harayama S., Kishira H., Kasai Y., Shutsubo K., (1999) Petroleum biodegradation in marine environments. *J. Molec Microbiol Biotechnol*., **1**, 63-70.
65. Hashem A.R., (2007) Bioremediation of petroleum contaminated soils in the Persian gulf region: a review. *J Kuwait Sci.*, **19,** 81–9.
66. Heinonen J.K., Lahti R.J., (1981) A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase, *Anal Biochem*., **113,** 313-7.
67. Hendriks J.H.M., Kolbe A., Gibon Y., Smitt M., Geigenberger P., (2003) ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslation redox-modification is response to lights and to sugar in leaves of *Arabidopsis* and other plant species. *Plant Physiol.,* **133,** 838–849.
68. Hidayat N., (2011) Optimization of pH, Temperature and Agitation Rate on Biodegradation of Lipids and Detergents in Food Wastewater by *Bacillus* sp N-09, *J Agric Food Tech.,* **1,** 59-62.
69. Hodges G., Roberts D.W., Marshall S.J., Dearden J.C., (2006). The aquatic toxicity of anionic surfactants to Daphnia magna—A comparative QSAR study of linear alkylbenzene sulphonates and ester sulphonates. *Chemosphere,* **63**, 1443–1450.
70. Holden J.T., (1962). The composition of microbial *amino acid pools*. In *Amino Acid Pools* (ed. by J. T.Holden) pp**.** 73–108, Elsevier Publishing Co., NY.

71. Holmberg K., Jonson B., Kronberg B., Lindman B., (2002) Surfactants and polymers in aqueous solution, John Wiley & Sons.
72. Horvat T., Kalafatic M., Kopjar N., Kovacevic G., (2005) Toxicity testing of herbicide norflurazon on an aquatic bioindicator species–the planarian *Polycelis feline* (Daly). *Aquat Toxicol.,* **73,** 342–352.
73. Houbraken J., Samson R.A., (2011). Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. *Stud Mycol.,* **70**, 1–51.
74. Hrsák D., Begonja A., (2000) Possible interactions within a methanotrophic-heterotrophic groundwater community able to transform linear alkylbenzenesulfonates. *Appl Environ Microbiol*., **66,** 4433-4439.
75. Hrsák D., Grbic-Galic D., (1995) Biodegradation of linear alkylbenzenesulfonates (LAS) by mixed methanotrophic-heterotrophic cultures. *J Appl Bacteriol*., **78,** 487-494.
76. Huddleston R.L., Allred R.C., (1963) Microbial oxidation of sulfonated alkylbenzenes. In: Developments in industrial microbiology. American Institute of Biological Sciences, Washington, DC, Vol 4. pp 24-38.
77. Ito M., Sugira M., (1968) Purification and characterization of alkaline protease from *Aspergillus oryzae*. *Yakaguku Zasshi*, **88**, 1576-1582.
78. Ivankovic T., Hrenovic J., Gudelj I., (2009), Toxicity of commercial surfactants to phosphate accumulating bacterium. *Acta Chim Slov.*, **56**, 1003-1009.
79. Izrael Zivkovic L.T., Gojgic-Cvijovic G.D., Gopcevic K.R., Vrvic M.M., Karadzic I.M., (2009) Enzymatic characterization of 30 kDa lipase from *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *J Basic Microbiol*., **49**, 452-62.
80. Jurado E., Fernández-Serrano M., Núñez-Olea J., Lechuga M., (2007) Primary Biodegradation of Commercial Fatty-Alcohol Ethoxylate Surfactants: Characteristic Parameters. *J Surfactants Deterg*., **10,** 145-153.
81. Kamiya M., Judson H., Okazaki Y., Kusakabe M., Muramatsu M., Takada S., Takagi N., Arima T., Wake N., Kamimura K., Satomura K., Hermann R., Bonthron D.T., Hayashizaki Y., (2000) The cell cycle control gene ZAC/PLAGL1 is imprinted--a strong candidate gene for transient neonatal diabetes. *Hum Mol Genet*., **9,** 453-60.

82. Kar B., Banerjee R., Bhattacharyya B.C., (2003) Effect of additives on the behavioural properties of tannin acyl hydrolase. *Process Biochem.*, **38**, 1285-1293.
83. Karsa D.R., Porter M.R., (1995) Biodegradability of surfactants, Chapman & Hall.
84. Kathiresan K., Manivannan, S., (2006) α-Amylases production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizoshere soil. *Afr J Biotechnol*., **5**, 829- 832.
85. Khleifat K.M., (2006) Biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate by a two-member facultative anaerobic bacterial consortium. *Enzym Microb Techn.*, **39,** 1030–1035.
86. Khomenkov V.G., Shevelev A.B., Zhukov V.G., Zagustina N.A., Bezborodov A.M., Popov V.O., (2008) Organization of metabolic pathways and molecular-genetic mechanisms of xenobiotic biodegradation in microorganisms: a review, *Prikl Biokhim Mikrobiol*., **44,** 133–152.
87. Kimerle R.A., Macek K.J., Sleight B.H., Burrows M.E., (1981) Bioconcentration of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in bluegill (*Lepomis* macrochirus). *Water Res*., **15**, 251-256.
88. Kimerle R.A., Swisher R.D., (1977) Reduction of aquatic toxicity of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) by biodegradation. *Water Res.*, **11,** 31-37.
89. Kitagawa M., (1956) Studies on the oxidation mechanismsof methyl groups. *J Biochem. (Tokyo)* **43**, 553-563.
90. Koffi D.M., Faulet B.M., Gonnety J.T., Bédikou M.E., Kouame L.P., Zoro Bi I.A., Niamke S.L., (2010) Biochemical characterization of phosphatase, β-galactosidase and α-mannosidase activities of seeds of an oleaginous cucurbit: *Lagenaria siceraria* (Molina) Standl blocky-fruited cultivar. *Sci Nat*., **7,** 221-235.
91. Kosswig H., Stache HW., (1993) *Die Tenside*, Carl Hanser Verlag, Munich, Germany.
92. Kotani T., Kawashima Y., Yurimoto H., Kato N., Sakai Y., (2006) Gene structure and regulation of alkane monooxygenases in propane-utilizing *Mycobacterium* sp. TY-6 and *Pseudonocardia* sp. TY-7. *J Biosci Bioeng.*, **102,** 184–192.
93. Kotani T., Yurimoto H., Kato N., Sakai Y., (2007) Novel acetone metabolism in a propane-utilizing bacterium *Gordonia* sp. strain TY-5. *J Bacteriol.*, **189,** 886–893.

94. Kukec A., Berovič M., Čelan Š., Wondra M., (2002) Redox Potential Measurement in Sauvignon blanc Fermentation, *Food Technol Biotechnol*., **40,** 49–55.
95. Kumar M., Trivedi S.P., Misra A., Sharma S., (2007) Histopathological changes in testis of the freshwater fish Heteropneustes fossilis (Bloch) expos to linear alkyl benzene sulphonate (LAS). *J Environ Biol*., **28**, 679-684.
96. Kwon-Chung K.J., Bennett J.E., (1992) Medical Mycology. Lea & Febiger, Philadelphia and London.
97. Lara-Martín P.A., Petrovic M., Gómez-Parra A., Barceló D., González-Mazo E., (2006) Presence of surfactants and their degradation intermediates in sediment cores and grabs from the Cadiz Bay area. *Environ Pollution*, **144**, 483-491.
98. Larcher G., Bouchara J., Annaix V., Symeoens F., Chabasse D., Tronchin G., (1992) Purification and characterization of a fibrinogenolytic serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* culture filtrate. *FEBS Lett*., **308**, 65-69.
99. Larone D.H., (1995) Medically Important Fungi - A Guide to Identification, 3rd ed. ASM Press, Washington, D.C.
100. Leidner H., Gloor R., Wuhrmann K., (1976) The kinetics of degradation of linear alyklbenzene sulfonate. *Tenside Surfactants Deterg.*, **13**, 122-130 (in German).
101. León V.M., López C., Lara-Martín P.A., Prats D., Varó P., González-Mazo E., (2006) Removal of linear alkylbenzene sulfonates and their degradation intermediates at low temperatures during activated sludge treatment. *Chemosphere*, **64**, 1157-1166.
102. Lilly V.G., Barnett H.L., (1951) Physiology of the fungi. McGraw-Hill Book Co., New York, Toronto, London.
103. Liwarska-Bizukojc E., Bizukojc M., (2006) Effect of selected anionic surfactants on activated sludge flocs. *Enz Microb Technol*., **39**, 660–668.
104. Lomax E.G., (1996) *Amphoteric Surfactant, Organic Chemistry*, Surfactant Science Series 59, Mercel Dekker,New York.
105. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem*., **193,** 265-275.

106. Maenpaa K., Kukkonen J.V., (2006). Bioaccumulation and toxicity of 4-nonylphenol (4-NP) and 4-(2-dodecyl)-benzene sulfonate (LAS) in *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta) and *Chironomus riparius* (Insecta). *Aquatic Toxicology,* **77,** 329–338.
107. Mala M., Srividya S., (2010) Partial purification and properties of a laundry detergent compatible alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* species Y. *Indian J Microbiol*., **50,** 309–317.
108. Malathi S., Chakraborthy R., (1991). Purification of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid substrate fermentation conditions for use as a depilation agent. *Appl Environ Microbiol*., **57**, 712-716.
109. Marcomini A., Pojana G., Carrer C., Cavalli L., Cassani G., Lazzarin M., (2000b) Aerobic biodegradation of monobranched aliphatic alcohol polyethoxylates. *Environ Toxicol Chem.*, **19**, 555-560.
110. Marcomini A., Pojana G., Carrer C., Giacometti A., Cavalli L., Cassani G., (2000c) Biodegradation behavior of alcohol polyethoxylates (AE): An up to date. 5th World Surfactants Congress, May 29 – June 2, 2000, Florence. Proceedings, Vol. 2, p.1380-1386.
111. Marcomini A., Zanette M., Pojana G., Suter MJ-F., (2000a) Behaviour of aliphatic alcohol polyethoxylates and their metabolites under standardized aerobic biodegradation conditions. *Environ Toxicol Chem.*, **19**, 549-554.
112. Megharaj M., Ramakrishnan B., Venkateswarlu K., Sethunathan N., Naidu R., (2011). Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environ Int.*, **37**, 1362–1375.
113. Mehta J., Jakhetia M., Choudhary S., Mirza J., Sharma D., Khatri P., Gupta P., Nair M.M., (2012) Impact of Carbon & Nitrogen Sources on the *Trichoderma viride* (Biofungicide) and *Beauveria bassiana* (entomopathogenic fungi). *Eur J Exp Biol*., **2,** 2061-2067.
114. Mercer D.K., Iqbal M., Miller P., McCarthy A.J., (1996) Screening Actinomycetes for extracellular peroxidase activity. *Appl Environ Microbiol*., **62**, 2186–2190.
115. Merrettig-Bruns U., Jelen E., (2003) Anaerobic Biodegradation of detergent Surfactants. Fraunhofer UMSICHT, Oberhausen, Germany.

116. Metz B., Kossen N.W.F., (1977) Biotechnology review: The growth of molds in the form of pellets-a literature review. *Biotechnol Bioeng*., **19,** 781-799.
117. Mićović V.M., Vitorović D., (1967) Hemijska čitanka, Beograd.
118. Mikkelsen R., Mutenda K.E., Mant A., Schurmann P., Blennow A., (2005) Alpha-glucan, water dikinase (GWD): a plastidic enzyme with redox-regulated and coordinated catalytic activity and binding affinity. *Proc Natl Acad Sci. USA,* **102,** 1785–90.
119. Miller G.L., (1959) Use of dinitrosalicylic reagent or determination of reducing sugars. *Anal Chem*., **31**, 426-428.
120. Mohsenzadeh F., Chehregani R.A., Akbari M., (2012) Evaluation of oil removal efficiency and enzymatic activity in some fungal strains for bioremediation of petroleum-polluted soils. *IJEHSE,* **9**, 26-32.
121. Mohsenzadeh F., Nasseri S., Mesdaghinia A., Nabizadeh R., Zafari D., Khodakaramian G., Chehregani A., (2010) Phytoremediation of petroleum-polluted soils: application of polygonum aviculare and its root-associated (penetrated) fungal strains for bioremediation of petroleum-polluted soils. *Ecotox Environ Saf.,* **73,** 613–619.
122. Monod M., Togni G., Rahalison L., Frenk E., (1991) Isolation and characterization of an extracellular alkaline protease of *Aspergillus fumigates*. *J Medical Microbiol*., **35**, 23-28.
123. Moreira F.G., Lenartovicz V., De Souza C.G.M., Ramos E.P., Peralta R.M., (2001) The use of amethyl-D-glucoside, a synthetic analogue of maltose, as inducer of amylase by *Aspergillus* sp. in solid- state and submerged fermentation. *Braz J Microbiol*., **32**, 15-19.
124. Moreno A., Ferrer J., Berna J.L.,(1990) Biodegradability of LAS in a Sewer System.*Tenside Surf. Det.,* **27,** 312-315.
125. Mulligan C.N., (2005) Environmental applications of biosurfactants. *Environ Pollut.,* **133**, 183-198.
126. Myers D., (1999) *Surfactant Science and Technology*, 2nd Edn, Wiley-VHC, New York.
127. Nascimento W.C.A., Martins M.L.L., (2006) Studies on the stability of protease from *Bacillus* sp. and its compatibility with commercial detergent. *Braz J Microbiol*., **37,** 307-311.

128. Ojeda-Morales M.E., Hernández-Rivera M.Á., Martínez-Vázquez J.G., Córdova-Bautista Y., Hernández-Cardeño Y.E., (2013) Optimal Parameters for *in Vitro* Development of the Fungus Hydrocarbonoclastic *Penicillium* sp. *ACES*, **3,** 19-29.
129. Ojo O.A., Oso B.A. (2008) Isolation and Characterization of Synthetic Detergent-degraders from Wastewater. *Afr J Biotechnol*., **7,** 3753-3760.
130. Oya M., Hisano N., (2010) Decreases in surface activities and aquatic toxicities of linear alkylbenzene sulfonate and alcohol ethoxylates during biodegradation, *J Oleo Sci*., **59**, 31-39.
131. Pakou C., Kornaros M., Stamatelatou K., Lyberatos G., (2005) Fate of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) during composting, *Proc Waste Eng.*, Albi, France.
132. Pakou C., Stamatelatou K., Kornaros M., Lyberatos G., (2007) On the complete aerobic microbial mineralization of linear alkylbenzene sulfonate. *Desalination,* **215,** 198–208.
133. Palicka J., (1997) Development and trends in the European laundry detergent market, proceeding of 3rd international Symposium "Forum Chemiczne", Warsaw, pp. 37-42.
134. Paterson S.J., Scott C.C., Tucker K.B.E., (1970) Nonionic detergent degradation. III Initial mechanism of the degradation. *J Am Oil Chem Soc*., **47**, 37-41.
135. Perales J.A., Manzano M.A., Garrido M.C., Sales D., Quiroga J.M., (2007) Molecular structure and biodegradation kinetics of linear alkylbenzene sulphonates in sea water. *Biodegradation,* **18,** 567–578.
136. Petterson A., Adamson M., Dave G., (2000) Toxicity and detoxification of Swedish detergents and softener products. *Chemosphere,* **41**, 1611-1620.
137. Pitt J., (1979) The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London: *Academic Press*.
138. Poonawalla F.M., Patel K.L., Iyengar M.R.S., (1965) Invertase production by *Penicillium chrysogenum* and other fungi in submerged fermentation. *Appl Environ Microbiol*., **13,** 749-754.
139. Prasertsan P., Kittikul A.H., Maneesri J., Oi S., (1997) Optimization for xylanase and cellulase production from Aspergillus niger ATTC 6275 in palm oil mill wastes and its application. *World J Microbiol Biotechnol*., **13,** 555-559.

140. Punt P.J., van Biezen N., Conesa A., Albers A., Mangnus J., van den Hondel C., (2002) Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends Biotechnol.*, **20,** 200-206.
141. Rahman R.N.A., Geok L.P., Basri M., Sale A.B., (2005) Physical Factors Affecting the Production of Organic Solvent-tolerant Protease by *Pseudomonas aeruginosa* strain k. *Bioresour Technol*., **96**, 429-436.
142. Raimbault M., (1981) Solid state fermentation: growth of filamentous fungi on starch substrates. ORSTOM-Paris; Série Travaux et Documents, n° 127, pp 291.
143. Rani M.R., Prasad N.N., Sambasivarao K.R.S., (2012) Optimization of Cultural Conditions for the Production of Alkaline Protease from a Mutant *Aspergillus Flavus* AS2. *Asian J Exp Biol Sci.*, **3**, 565-576.
144. Rapaport R.A., Larson R.J.,McAvoy D.C.,Nielsen A.M., Trehy M., (1992)"The Fate of Commercial LAS in the Environment". 3rt CESIO International Surfactants Congres & Exhibition A Word Market, Proceeding, Section E, pp. 78-87, London, June 1-5.
145. Raper K.B., Fennell D.I., (1965) The genus *Aspergillus*. Baltimore: William & Wilkins.
146. Richmond J.M., (1990) *Cationic Surfactant, Organic Chemistry*,Surfactant Science Series 34, Mercel Dekker,New York.
147. Rodriguez V.B., Jurado E.A., A.R. Requena, García López A.I., Bailón-Moreno R., Cuevas Aranda M., (2005) Determination of average molecular weight of commercial surfactants: Alkylpolyglucosides and fatty alcohol ethoxylates. *J Surfactants Deterg.,* **8**, 341-346.
148. Ron E.Z., Rosenberg E., (2002) Biosurfactants and oil bioremediation. *Curr Opin Biotechnol.,* **13,** 249-252.
149. Rubingh N., Holl P.M., (1991) Cationic Surfactants – Physical Chemistry, Marcel Dekker, New York.
150. Samson R.A., Hadlok R., Stolk A.C., (1977) A taxonomic study of the *Penicillium chrysogenum* series. *Antonie van Leeuwenhoek*, **43**, 169–175.
151. Santamaria F., Reyes F., (1988) Proteases produced during autolysis of filamentous fungi. *Trans Br Mycol Soc.*, **91**, 217-220.

152. Sanz J.L., Culubret E., de Ferrer J., Moreno A., Berna, J.L., (2003) Anaerobic biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biodegradation*, **14,** 57–64.
153. Sawyer C.N., Ryckman D.W., (1957) Anionic synthetic detergents and water supply problems. *J Am Water Works Assoc.*, **49**, 480-490.
154. Schick M.J., (1987) Nonionic Surfactants: Physical Chemistry, Marcel Dekker, New York.
155. Schipper M.A.A., (1976) On *Mucor circinelloides*, *Mucor racemosus* and related species. *Stud Mycol.*, **12**, 1-40.
156. Schleheck D., Knepper T.P., Fischer K., Cook A.M., (2004a) Mineralization of individual congeners of linear alkylbenzenesulfonate (LAS) by defined pairs of heterotrophic bacteria. *Appl Environ Microbiol.*, **70,** 4053 4063.
157. Schmidt G., Seraidarian D., Greenbaum L.M., Hickey M.D., Thannhauser S.J., **(**1956) The effects of certain nutritions conditions on the formation of purines and of ribonucleic acid in baker's yeast. *Biochim Biophys. Acta*, **20,** 135-149.
158. Schöberl P., (1989) Basic principles of LAS biodegradation. *Tenside Surfact Det.*, **26**, 86-94.
159. Schönkaes U, (1998) LAS-A modern classic surfactant, *Chimica Oggi*: 9-13, September.
160. Schulz S., Dong W., Groth U., Cook A.M., (2000) Enantiomeric degradation of 2-(4-sulfophenyl) butyrate via 4-sulfocatechol in *Delftia acidovorans* SPB1. *Appl Environ Microbiol.*, **66**, 1905-1910.
161. Sekine M., Tanikawa S., Omata S., Saito M., Fujisawa T., Tsukatani N., *et al.* (2006) Sequence analysis of three plasmids harboured in *Rhodococcus erythropolis* strain PR4. *Environ Microbiol.*, **8,** 334–346.
162. Setzkorn E.A., Huddleston R.L., (1965) Ultraviolet spectroscopic analysis for following the biodegradation of hydrotopes. *J Am Oil Chem Soc.*, **42**, 1081-1084.
163. Setzkorn E.A., Huddleston R.L., Allred R.C., (1964) En evaluation of the river die-away technique for studyng detergent biodegradability. *J Am Oil Chem Soc*., **41**, 826-830.

164. Shazia I.U, Sadia G.R., Talat A., (2013) Bioremediation of Heavy Metals Using Isolates of Filamentous Fungus Aspergillus fumigatus Collected from Polluted Soil of Kasur, Pakistan. *International Research Journal of Biological Sciences*, **2,** 66-73.
165. Somogyi M., (1952) Notes on sugar determination. *J Biol Chem.*, **195,** 19-23.
166. Sovilj V., (2012) Tehnologija tenzida i deterdženata, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
167. Srivastava S., Pathak N., Srivastava P., (2011) Identification of limiting factors for the optimum growth of *Fusarium oxysporum* in liquid medium. *Toxicol Int*., **18,** 111-116.
168. Stache H.W., (1996) *Anionic Surfactants,Organic Chemistry,*Surfactant Science Series 34, Mercel Dekker,New York.
169. Steber J., Berger H., (1995) Biodegradability of anionic surfactants, In *Biodegradability of Surfactants*, Karsa D.R., Porter M.R., (eds.), Chapman and Hall, London, pp 134-182.
170. St-Germain G., Summerbell R., (1996) Identifying Filamentous Fungi - A Clinical Laboratory Handbook, 1st ed. Star Publishing Company, Belmont, California.
171. Stojanović J., Jakovljevic V., Matović I., Gajović O., Mijušković Z., Nedeljković T., (2011) Influence of detergent on metabolic activity of fungi *Aspergillus niger*. *Natural Science*, **3**, 466-470.
172. Stojanović J., Milićević J., Gajović O., Jakovljević V., Matović I., Mijušković Z., Nedeljković T., (2011) The effects of detergent, sodium tripoly-phosphate and ethoxyled oleyl-cetyl at metabolic parameters of the fungus *Trichothecium roseum* Link**.** *Arch Biol Sci.,* **63**, 1001-1006.
173. Stojanović J., Stojanović M. (2000) Uticaj deterdženata na produkciju aminokiselina i proteolitičku aktivnost nekih vrsta gljiva. *Acta veterinaria*, **50**, 381-386.
174. Stojanović J., (1989) Uticaj deterdženta na biohemijske procese nekih gljiva *in vitro*, Doktorska disertacija, Kragujevac.
175. Strasser H., Burgstaller W., Schinner F. (1994) High-yield production of oxalic acids for metal leaching processes by *Aspergillus niger*, *FEMS Microbiol Lett*., **119,** 365-370.
176. Sudip S., Om S., Rakesh J., (2002) Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol.*, **20**, 243-248.
177. Sueoka N. (1961) Cold Spr. Harb. Symp. *Quant Biol.,* **26**, 35-43.

178. Sumner J.B., Howell S.F., (1935) A method for determination of saccharase activity. *J Biol Chem.*, **108**, 51-54.
179. Sutton D.A., Fothergill A.W., Rinaldi M.G., (1998) Guide to Clinically Significant Fungi, 1st ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
180. Swisher R.D., (1963) The chemistry of surfactant biodegradation. *J Am Oil Chem Soc.*, **40**, 648-656.
181. Swisher R.D., (1967) Biodegradation of LAS benzene rings in activated sludge. *J Am Oil Chem Soc.*, **44**, 717-724.
182. Swisher R.D., (1981) The problem of ultimate biodegradability of linear alkylbenzene sulfonates: an extension. *Tenside Surfactants Deterg*., **18**, 57-63.
183. Swisher R.D., (1987) Surfactant biodegradation. New York, Marcel Dekker, Inc, pp 1085, (Surfactant Science Series, Vol **18**).
184. Szymański A., Bubien E., Kurosz T., Wolniewicz A., Łukaszewski Z., (2002) Biodegradation of Fatty Alcohol Ethoxylates under the Conditions of the Die-Away Test, *Pol J Environ Stud.*, **11,** 429-433.
185. Szymanski A., Wyrwas B., Szymanowska M., Lukaszewski Z., (2001) Determination of Short-Chained Poly(ethylene Glycols) and Ethylene Glycol in Environmental Samples. *Wat Res.*, **35,** 3599.
186. Tang L., Niu X., Sun Q., Wang R., (2010) Bioremediation of petroleum polluted soil by combination of ryegrass with effective microorganisms. *J Environ Technol Engin.*, **3**, 80–86.
187. Torriani A., (1960) Influence of inorganic phosphate in the formation of phosphatases by *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, **38,** 460-469.
188. Vainstein M.H., Peberdy J.F., (1991) Regulation of invertase in *Aspergillus nidulans*: effect of different carbonsources. *J Gen Microbiol.*, **137,** 315- 321.
189. Valtorta L., Radici P., Calcinai D., Cavalli L., (2000). Recent developments of LAB/LAS. La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse LXXVII: 73-76.
190. van Beilen J.B., Funhoff E.G., (2007) Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **74,** 13–21.

191. Van Os N.M., Haak J.R., Rupert L.A.M., (1993) *Physico-Chemical Properties of Selected Anionic, Cationic and Nonionic Surfactants*, Elsevier, Amsterdam.
192. Van Tieghem P., (1867) Description d'une nouvelle espèce d'Aspergillus: A. niger. *Ann Sci Nat Bot*., **8**, 240-244 (in France).
193. Velan M., SheebaVarma S., Gnanambigai P., Lakshmi M.B., (2012) Biodegradation of toluene in the contaminated soil by *Mycoplana* sp. MVMB2. *IJCEES*, **3**, 318-323.
194. Wang Q.H., Kuninobu M., Ogawa H.I., Kato Y., (1999) Degradation of volatile fatty acids in highly efficient anaerobic digestion. *Biomass Bioenerg*., **16,** 407-416.
195. Wang Z., Xiao B., Wu X., Tu X., Wang Y., Sun X., Song L., (2010) Linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in water of Lake Dianchi—spatial and seasonal variation, and kinetics of biodegradation. *Environ Monit Assess*, **171**, 501–512.
196. Weinhausel A., Nidetzky B., Rohrbach M., Blauensteiner B., Kulbe K.D., (1994) *Appl Microbiol Biotechnol.*, **41,** 510-516.
197. Wentzel A., Ellingsen T.E., Kotlar H.K., Zotchev S.B., Throne-Holst M., (2007) Bacterial metabolism of longchain *n*-alkanes. *Appl Microbiol Biotechnol*., **76,** 1209–1221.
198. Wickbold R., (1974) Analytische Beitrage zum biologischen Abbau von Tensiden. *Tenside Detergents*, **11**, 137-144.
199. Wiegant W.M., De Bont J.M., (1980) A new route for ethylene glycol metabolism in *Mycobacterium* E 44. *J Gen Microbiol*., **120**, 325-331.
200. Wongwicharn A., Harvey L.M., McNeil B., (1999) *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **74,** 821.
201. Woolley D.W., Peterson W.H., (1937) The chemistry of mould tissue. XII. Isolation of arginine, histidine and lysine from *Aspergillus sydowi. J Biol Chem.*, **118**, 363-370.
202. Xu J., Ridgway D., Gu T., Moo-Young M., (2000) Increased heterologous protein production in Aspergillus niger fermentation through extracellular proteases inhibition by pelleted growth. *Biotechnol Prog*., **16,** 222-227.
203. Yedidia I., Benhamou N., Chet I., (1999) Induction of defense responses in cucumber plants (Cucumis sativus L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl Environ Microbiol.*, **65**, 1061-1070.

204. Ying G.G., (2006) Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environ Int*., **32**, 417-431.

205. Yoshimura K., Hayashi K., Kawase J., Tsuji K., (1984b) Presence of anionic surfactants in rivers. *Jpn J Limnol.*, **45**, 51-60 (in Japanese).

206. Yoshiyuki O., Katsuhiko I., Seinosuke U., (1968). Production of phosphatase by *Aspergillus awamori* var. *kawachii* in a low phosphate medium. *Appl Microbiol*., **16,** 973-980.

207. Zhao B., Poh C.L., (2008) Insights into environmental bioremediation by microorganisms through functional genomics and proteomics. *Proteomics*, **8**, 874-81.

Web adrese:

http://fungi.myspecies.info/non-lichenized-ascomycota/aspergillus-niger

http://mycota-crcc.mnhn.fr/site/specie.php?idE=106

www.studiesinmycology.org

http://www.biocontrol.entomology.cornell.edu/pathogens/trichoderma.html

http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp?id=FU200802070052

6.ЗАКЉУЧАК

На основу приказаних резултата могу се извести следећи закључци:

- Тестирани прашкасти детерџент марке „Merix“ (Хенкел, Крушевац) испољио је различито дејство на раст и развој гљива у зависности од примењене концентрације, врсте гљива и њиховог порекла (порекла отпадних вода). Детерџент 0,5% концентрације испољио је фунгицидно дејство на испитиване врсте гљива, осим на врсту *Mucor racemosus*. Детерџент 0,3% концентрације деловао је инхибиторно на раст и развој гљива, у мањем или већем проценту, у следећем правцу: *Aspergillus niger* (51,42%) > *Penicillium chrysogenum* (50%) > *Penicillium cyclopium* (33,38%) > *Trichoderma harzianum* (20%), или стимулативно на гљиву *Mucor racemosus.* Међутим, већа концентрација детерџента имала је веће стимулативно дејство на раст гљиве *M. racemosus* (53%). Гљиве *M. racemosus* и *T. harzianum* су се показале најотпорнијим на дејство детерџента. Претпоставља се да су се оне адаптирале на високе концентрације детерџента јер су изоловане из индустријских отпадних вода фабрике Хенкел. Даља истраживања треба усмерити на ове 2 врсте гљива као тест организме за испитивање биодеградације различитих ксенобиотичких једињења, појединачно и у комбинацији са другим гљивама и бактеријама.

- Тестирани детерџент (анјонске компоненте детерџента) је показао различит проценат биоразградивости у зависности од врсте гљиве у периоду од 16 дана, у следећем правцу: *T. harzianum* 74,27% > *M. racemosus* (0,5%) 62,2% > *P. chrysogenum* 50% > *M. racemosus* (0,3%) 49,50% > *P. cyclopium* 46,97% > *A. niger* 30%. Математичким прорачуном из једначине регресионе праве за сваку гљиву добијено је да би оне могле да разграде 80% детерџента у временском периоду од: 16,8 дана *T. harzianum;* 18,3 дана *M. racemosus* (0,5%); 24,3 дана *M. racemosus* (0,3%); 24,8 дана *P. cyclopium;* 26,1 дана *P. chrysogenum;* 46,6 дана *A. niger*. Највиши степен корелације између процента биодеградације и временског периода утврђен је код *T. harzianum* и *M. racemosus*, тако да би ове врсте могле да имају практичну примену у тестовима брзе биодеградације детерџента.

Разградњом детерџента и настанком интермедијената у процесу метаболизма испитиваних гљива дошло је до промена физичко-хемијских, хемијских и биохемијских карактеристика: pH, редокс потенцијала, количине протеина, количине слободних и укупних органских киселина, квалитативног и квантитативног састава аминокиселина и активности испитиваних ензима.

- pH вредност ферментационе течности кретала се од базне средине (у тренутку инокулације) ка киселој средини (на крају огледа) код свих тестираних врста гљива. Највеће промене pH вредности су у корелацији са фазом експоненцијалног раста гљива и процентом деградације детерџента.

- Вредности редокс потенцијала ферментационе течности од тренутка инокулације до краја огледа кретале су у правцу повећања, а најзначајније промене су у корелацији са експоненцијалним растом и деградацијом детерџента.

- Количина слободних органских киселина у подлози са детерџентом била је већа у односу на контролу. Највећу количину слободних органских киселина продуковале су *M. racemosus* и *P. cyclopium* (0,14%), затим *T. harzianum* (0,12%), *A. niger* (0,10%), а најмању *P. chrysogenum* (0,08%). Детерџент је испољио различито дејство на продукцију укупних органских киселина у зависности од врсте гљиве. Највећу количину укупних органских киселина у подлози са 0,3% детерџентом продуковала је *P. chrysogenum* (1,40%), затим гљиве *P. cyclopium*, *A. niger* и *M. racemosus* (1,20%) и *T. harzianum* (1,06%). Гљива *M. racemosus* продуковала је већу количину укупних органских киселина у подлози са 0,5% детерџентом (1,50%) у односу на подлогу са 0,3% детерџентом.

- Детерџент је испољио инхибиторно или стимулативно дејство на продукцију протеина у зависности од врсте гљива. У контролној подлози са сахарозом гљиве су продуковале знатну количину протеина: *P. chrysogenum* (9,57 g L^{-1}), *T. harzianum* (6,93 g L^{-1}), *A. niger* (5,94 g L^{-1}), *M. racemosus* (5,08 g L^{-1}). Најмању количину протеина продуковала је гљива *P. cyclopium* (1,89 g L^{-1}). Детерџент

0,3% концентрације је значајно утицао на смањење количине протеина *P. chrysogenum* (2,32 g L^{-1}) и *T. harzianum* (2,21 g L^{-1}) и незнатно смањење количине протеина *A. niger* (5,30 g L^{-1}). Стимулативно дејство детерџента на продукцију протеина забележено је једино код гљиве *P. cyclopium* (3,50 g L^{-1}). Код гљиве *M. racemosus*, нижа концентрација детерџента (0,3%) није утицала на промену количине протеина, док је виша концентрација (0,5%) утицала на значајно смањење количине протеина у подлози (2,76 g L^{-1}).

- Детерџент додат у хранљиву подлогу у концентрацији 0,3% утицао је на промену квалитативног и квантитативног састава аминокиселина гљива (16. дана). У хранљивој подлози са сахарозом све тестиране врсте гљива су продуковале аланин, а осим аланина гљиве *P. cyclopium* и *M. racemosus* су продуковале и аргинин. У подлози са детерџентом 0,3% концентрације, гљиве *P. chrysogenum*, *P. cyclopium* и *T. harzianum* су продуковале аргинин и глутамат. Гљива *A. niger* је у подлози ДЗ продуковала аланин, глицин и глутамат. Код гљиве *M. racemosus* присуство детерџента 0,3% концентрације није утицало на квалитативни састав већ само на квантитативни састав аминокиселина, тако да је концентрација аргинина била око 1,5 пута мања, а аланина око 2,5 пута мања у односу на контролу. Међутим, присуство детерџента 0,5% концентрације у хранљивој подлози утицало је на продукцију укупно 5 аминокиселина: аргинин, аланин, валин, серин и глутамат. Квантитативно најзаступљенија аминокиселина била је аргинин. Добијени резултати указују на могућност употребе тестираних гљива у комерцијалној проиводњи аминокиселина.

- Детерџент је испољио стимулативно дејство на активност алкалне инвертазе гљива *P. chrysogenum*, *A. niger* и *T. harzianum*, а инхибиторно дејство на активност алкалне инвертазе *M. racemosus* и *P. cyclopium*. Активност киселе инвертазе гљива је била инхибирана у подлози са детерџентом, изузев код гљиве *P. cyclopium* код које је ензимска активност била стимулисана присуством детерџента.

- Активност протеолитичких ензима гљива *A. niger и T. harzianum* је била стимулисана присуством детерџента у хранљивој подлози за разлику од ензимске активности гљива *P. chrysogenum, P. cyclopium* и *M. racemosus*, која је била инхибирана детерџентом. Добијени резултати указују на могућност употребе поменутих гљива у комерцијалној производњи протеолитичких ензима који би имали практичну примену адитива у формулацији детерџената.

- Активност алкалне фосфатазе је била стимулисана присуством детерџента код гљива *A. niger и T. harzianum* или инхибирана код гљива *P. chrysogenum, P. cyclopium* и *M. racemosus*. Поменуте врсте гљива могле би да имају практичну примену у уклањању фосфата из контаминираних екосистема и редукцији еутрофикације.

- Активност фосфорилазе је била стимулисана присуством детерџента код гљива *A. niger, M. racemosus* и *P. chrysogenum*, или инхибирана код гљива *T. harzianum* и *P. cyclopium*.

- Активност RNaze је била инхибирана присуством детерџента у подлози код свих испитиваних врста гљива, осим код гљива *P. cyclopium* и *M. racemosus.* Најјаче стимулативно дејство детерџента на ензимску активност забележено је код гљиве *P. cyclopium.* Најјаче инхибиторно дејство детерџента на ензимску активност забележено је код гљива *T. harzianum* и *P. chrysogenum*.

- Детерџент додат у хранљиву подлогу испољио је стимулативно или инхибиторно дејство на активност DNaze у зависности од врсте гљиве. Највећу ензимску активност у подлози са детерџентом имала је гљива *P.chrysogenum,* а најмању *T. harzianum*. Међутим, најјаче инхибиторно дејство детерџент је испољио на ензимску активност *A. niger*. Гљива *M. racemosus* је имала већу ензимску активност у подлогама са детерџентом (највећу у подлози Д5) у односу на контролу.

БИОГРАФИЈА

Виолета Јаковљевић је рођена 21.04.1972. године у Крагујевцу. Основну школу и Прву крагујевачку гимназију завршила је са одличним успехом. Као ученик основне и средње школе учествовала је на општинском и републичком такмичењу из историје, биологије, хемије и физике. Природно-математички факултет у Крагујевцу, група Биологија, уписала је 1991. године, а дипломирала 1997. године са просечном оценом 8,37. Након дипломирања започела је радни стаж као приправник у основној школи у Гружи 1998/99. године. Од 2000. до 2012. године радила је као професор биологије у Првој крагујевачкој гимназији, Музичкој школи и основној школи „Ђура Јакшић“ у Крагујевцу. Истовремено је уписала последипломске студије на Природно-математичком факултету у Крагујевцу, група Биологија, смер Биохемија. Специјалистичке студије завршила је 2004. године, а магистарске студије 2009. године чиме је стекла стручно звање магистар биолошких наука. Након завршених магистарских студија, уписана је на докторске академске студије биологије 2009. године. Од јуна 2012. године запослена је истраживачком пројекту Министарства за науку и технолошки развој Републике Србије. Резултате истраживачког рада објавила је као аутор у међународним научним часописима и саопштила на научним скуповима.

СПИСАК РАДОВА

1. Stojanović Jelica, Milićević Jasmina, Gajović Olgica, **Jakovljević Violeta**, Matović Ivana, Mijušković Zoran, Nedeljković Tomislav, (2011): The effects of detergent, sodium tripoly-phosphate and ethoxyled oleyl-cetyl on metabolic parameters of the fungus *Trichothecium roseum* Link**,** Arch. Biol. Sci. Belgrade. 63 (4), str. 1001-1006. **ISSN:** 0354-4664 doi:10.2298/ABS1104001S

   M23, IF $_{2011}$ 0,360

2. Stojanović Jelica, **Jakovljević Violeta**, Matović Ivana, Gajović Olgica, Mijušković Z., Nedeljković T., (2011): Analysis of the aminoacids of some types of fungi cultivated in the presence of detergent. Acta Veterinaria, Beograd, vol. 61, No 4, str 423-428. **ISSN**: 0567-8315 doi:10.2298/AVB1104423S

   M23, IF $_{2011}$ 0,167

3. Jelica Stojanović, **Violeta Jakovljević**, Ivana Matović, Olgica Gajović, Zoran Mijušković, Tomislav Nedeljković, (2010): The influence of detergents, sodium tripoly-phosphates and ethoxyled oleyl-cetyl alcohol on metabolism of the fungi *Penicillium verrucosum* Peyronel. Acta Veterinaria, Beograd, vol 60, No 1, str 67-77. **ISSN**: 0567-8315 doi: 10.2298/AVB1001067S

   M23, IF_{2011} = 0,169

4. Jelica Stojanović, **Violeta Jakovljević**, Ivana Matović, Olgica Gajović, Zoran Mijušković, Tomislav Nedeljković, (2011): Influence of detergent on metabolic activity of fungus *Aspergillus niger*. Natural Science, Vol. 3, No. 6, str. 466-470. **ISSN**: 2150-4091 doi:10.4236/ns.2011.36064

5. **Jakovljević Violeta D**., Milićević Jasmina M., Stojanović Jelica D., Solujić Slavica R., Vrvić Miroslav M. Antioxidant activity of ethanolic extract of Penicillium chrysogenum and Penicillium fumiculosum, Hemijska industrija, 2013 OnLine-First (00):27-27. **ISSN: 0367-598X** doi:10.2298/HEMIND121102027J

   M23,IF_{2013}=0.463

6. **Jakovljević Violeta D.**, Milićević Jasmina M., Stojanović Jelica D., Solujić Slavica R., Vrvić Miroslav M. Influence of detergent and its components on metabolism of Fusarium oxysporum in submerged fermentation, Hemijska industrija, 2013 OnLine-First (00):71-71. **ISSN: 0367-598X** doi:10.2298/HEMIND130620071J

   M23, IF_{2013}=0.463

7. **Jakovljević Violeta D.,** Milićević Jasmina M., Stojanović Jelica D., Vrvić Miroslav M., The ability of fungus Mucor racemosus Fresenius to degrade high concentration of detergent. Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly, 2014 OnLine-First (00):2-2, **ISSN**:1451-9372 doi:10.2298/CICEQ130922002J

M23, IF_{2013}=0.533

Научни радови објављени у зборницима међународних научних скупова

Саопштење са међународног скупа штампано у целини (М33)

1. Stojanović Jelica, **Jakovljević Violeta**, Matović Ivana, Zoran Mijušković, Tomislav Nedeljković, (2010): Biochemical changes of bioproduction of carbon hydrates of *Aspergillus niger* influenced by detergent and its components, Natura Montenegrina, Podgorica, 9 (3): 795-802. **ISSN**: 1451-5776.
2. Stojanović Jelica, **Jakovljević Violeta**, Matović Ivana, Zoran Mijušković, Tomislav Nedeljković, (2010): Biochemical and enzymatic changes of *Aspergillus niger* the influenced by detergent and its components, Natura Montenegrina, Podgorica, 9 (3): 785-793. **ISSN**: 1451-5776.
3. Jelica Stojanović, Jasmina Milićević, Olgica Gajović, **Violeta Jakovljević**, Ivana Matović, Zoran Mijušković, Tomislav Nedeljković. The effects of detergent and its components on metabolic processes of the fungus *Aspergillus niger*. The First International Congress of Ecologists, Banja Luka, Bosnia and Herzegovina, April 20^{th}-21^{st} 2012, str. 69-79. **ISBN**: 978-99938-25-89-0.
4. Jelica Stojanović, **Violeta Jakovljević**, Ivana Matović, Jasmina Milićević, Zoran Mijušković, Tomislav Nedeljković: Potential role of fungi species *Alternaria tenuis* and *Fusarium oxysporum* in biodegradation of commercial detergent. The First International Congress of Ecologists, Banja Luka, Bosnia and Herzegovina, April 20^{th}-21^{st} 2012, str. 79-89. **ISBN**: 978-99938-25-89-0.

Саопштење са међународног скупа штампано у изводу (М34)

1. Stojanović J., Solujić-Sukdolak S., **Jakovljević V**, (2005): The influence of detergent, ethoxyled oleyl-cetyl alcohole and sodium tripolyphosphate on the bioproduction of some organic substances of the fungus species *Penicillium verrucosum* Peyronel, The Sixth European Meeting on Enviromental Chemistry

(EMEC6), Belgrade, Serbia and Montenegro. Programme and The Book of Abstract Poster N^{o} 71, str. 203. **ISBN**: 8671320243

2. Stojanović Jelica, **Jakovljević Violeta**, Matović Ivana, Mijušković Zoran, Nedeljković Tomislav, (2010): Biochemical and enzymatic changes of *Aspergillus niger* the influenced by detergent and its components, IV Internacional Syposium of Ekologists of the Republic of Montenegro, (oktobar 6-10. 2010), Strana 108. **ISBN**: 978-86-908743-3-0.
3. Stojanović Jelica, **Jakovljević Violeta**, Matović Ivana, Mijušković Z., Nedeljković T, (2010): Biochemical changes of bioproduction of carbon hydrates of *Aspergillus niger* the influence by detergent and its components, IV Internacional Syposium of Ekologists of the Republic Of Montenegro, (oktobar 6-10. 2010), Strana 109. **ISBN**: 978-86-908743-3-0.

Scientific paper

Antioxidant activity of ethanolic extract of *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium fumiculosum*

Jakovljević D Violeta[1*], Milićević M Jasmina[1], Stojanović D Jelica[1], Solujić R Slavica[2] and Vrvić M Miroslav[3]

[1]*University of Kragujevac, Faculty of Science, Institute of Biology and Ecology, Kragujevac, Serbia*

[2]*University of Kragujevac, Faculty of Science, Institute of Chemistry, Kragujevac, Serbia*

[3]*University of Belgrade, Faculty of Chemistry, Belgrade, Serbia*

Paper received: 02 November 2012

Paper accepted: 09 April 2013

* Corresponding author: email: jakovljevicvioleta@gmail.com

Abstract

The aim of this study was to investigate the biological and chemical activity on two species of fungi of the genus *Penicillium* isolated from wastewater. On the selected species of fungi the different antioxidant activity assays were carried out: DPPH free-radical scavenging activity, total antioxidant activity, Fe^{2+}- chelating ability and Fe^{3+}- reducing power. Total phenol content was also determinate for ethanolic extract of mycelia. *Penicillium chrysogenum* ethanolic extract contained higher total phenolic content and better total antioxidant capacity as well as ferrous ion chelating ability. *Penicillium fumiculosum* ethanolic extract showed higher DPPH free-radical scavenging activity, as well as reducing power. Based on the obtained results it can be concluded that two types of fungi are potential new sources of natural antioxidants.

INTRODUCTION

Numerous pharmaceutical properties of medicinal mushrooms that have been using a traditional oriental medicine are known, including anticancer, antimicrobial, anti-inflammatory, and anti-atherosclerotic. In Western civilization, the research of medicinal properties of fungi and yeast are relatively new as well as their use for therapeutic purposes. These fungi are a significant source of natural antioxidants due to the production of secondary metabolites by themselves. These are compounds such as polysaccharides, triterpenes, and tritenpenoids, various acids (e.g. ganodermic acid) β-glucan, vitamins, alkaloids. Phenolics or polyphenols, including flavonoids are the main a secondary metabolic of medicinal plants, mushrooms and fungi, responsible for their antioxidant, antimutagenic and antitumor activity [1, 2]. Screening of biological activity endophytic fungi showed that they represent a significant source of new bioactive agents with potentially used in medicine, agriculture and industry area. Biologically active ingredients are synthesized into the apex tissue of the hyphal strand of fungi and their extractions are carried out by solvents with different polarity. The biological activity of these substances depends on their chemical structure so that different extraction solvents made of various biologically active substances, with different levels of biological activity. Ethyl acetate extract of endophytic fungus *Xylariaceae sp., Tolypoclaidium sp., Chaetomium glotosum, Chaetomium sp., Creosphaeria sp.*, contains an extraordinary antioxidant activity (3). The aqueous extract of mycelium *Tolypocladium sp.* Ts-1 was isolated from the fruiting body of a wild *Cordyceps sinensis* has strong antioxidant activity and is a potential source of natural antioxidants [4]. The methanolic extracts of the fungi *Fusarium, Aspergillus, Penicillium* and *Mucor* species were isolated from *L. nicotianifolia* showed significant antioxidant potential and the antioxidant nature of the extracts were dependent on the concentration [5]. Many species of fungi isolated

from the soil, such as *Aspergillus fumigatus*, represent a potential source of natural antioxidants [6]. As active participants in the degradation of organic materials, primarily wood waste, fungi are exposed to large amounts of free radicals in nature. In order to survive and perform their task scavenger nature, fungi have developed specific defense of the body against a variety of toxins and free radicals.

The fungi species of genus *Penicillium* are very attractive organism for production of useful protein and biological active secondary metabolites. It was found that the fungi produce pigments that inhibit the cholesterol biosynthesis by binding to the catalytic site HMG-CoA reductase a key enzyme in biosynthesis cholesterol [7] and scavenged DPPH radicals [8-10]. Penicillenols secreted by *Penicillium* sp showed biological activity against HL-60 cell lines [11]. Atrovenetin was isolated as a potential antioxidant in some species of *Penicillium* [12]. Different active substances were isolated from *P. chrysogenum,* like alkaloids, carbohydrates, tannins and terpenoids by using different solvents.

The potential antioxidant activity of two fungal species: *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium fumiculosum* was investigated in this study. The fungi were isolated from wastewater of the river basin of Lepenica and Western Morava, Serbia. Total phenol content was determined by Folin-Ciocalteu method. The antioxidant activity of alcoholic extract of fermentation broth was carried out by four assays: DPPH free - radical scavenging activity, total antioxidant activity, Fe^{2+} - chelating ability and Fe^{3+} - reducing power.

EXPERIMENTAL

Cultivation and extraction of mycelia of tested fungi

The fungal species used in our study were isolated from wastewaters originating from households and flow directly into the riverbed the Lepenica and Western Morava (Serbia).

The identification of fungi was carried out at the Institute of Biology and Ecology of Kragujevac, and became part of the collection of our laboratory. Fungi were grown on potato dextrose agar at room temperature (28 ºC ± 1 ºC) for 7 days. The 250 mL Erlenmeyer flask containing 100 mL of liquid PDB medium were sterilized for 15 min at 121 ºC. The media were inoculated with 1 mL of spore suspension to the specific density and incubated at room temperature for 5 days, with stirring occasionally. After the completion of incubation, mycelia are separated from the liquid medium by filtration and drying at 50 ºC. The dry mycelium was pulverized and extracted with ethanol (1:1, (v/v)) tree times. The supernatant was separated by centrifugation at 5000 rpm for 10 min, fractions were pooled and ethanolic extract was concentrated under reduced pressure to yield the final extract. Alcoholic extract of all tested fungal species was stored in dark at 4 ºC before being used for the bioactivity test.

DPPH radical scavenging assay

1,1-Diphenyl-2-picrylhydracyl (DPPH) radical scavenging activity was done according to the method by Takao *et al.*, with slight modification [13]. Working solution of extracts was made by dilution stock solution (1 mg/mL) of extracts. DPPH was dissolved in methanol to obtain a concentration 8 µg/mL To 1 mL of DPPH solution, 1 mL of various concentrations of the extracts or the standard (ascorbic acid) solution were added separately. The reaction mixtures were incubated at 37 ºC for 30 min, following by absorbance measured at 517 nm using methanol as blank reference. The DPPH scavenging activity (%) of the standard and extracts was determined using following equation:

$$\% \text{ inhibition} = [(Ac - As) / Ac] \times 100 \quad (1)$$

where: Ac is absorbance of control sample and As is the absorbance of test sample

Total antioxidant activity

The total antioxidant activity was determinate by phosphomolybdenum method according to Prieto *at al.,* [14]. To 1 mL of samples or standard the different concentration, 2 mL reagent solution (ammonium molybdate {4 mM}, sodium phosphate {28 mM} and sulphuric acid {0.6 M}) was added and mixed vigorously. All the reaction tubes were incubated at 95 ºC for 90 min. The absorbance was measured at 695 nm against blank (methanol) after cooling at room temperature. Ascorbic acid was used as standard. Reducing capacity of the extract has been expressed as the ascorbic acid equivalents.

Total Phenolic Contents

The total phenolic contents in the extract were determined according to the Folin-Ciocalteu method of Singleton and Rossi with some modifications [15, 16]. To 1 mL of ethanolic extracts, 2 mL of 7.5 % (w/v) sodium carbonate solution was added and vortexed vigorously. After 5 min, 1 mL of 1:10 diluted Folin-Ciocalteu's phenol reagent was added and vortexed again. Same procedure was followed for the standard solution of gallic acid. All the tubes were incubated at room temperature for 30 min and the absorbance was measured at 765 nm. The total phenolic content in the extracts were expressed as gallic acid equivalent in mg/g (GAE mg/g extract).

Measurement of ferrous ion chelating ability

The ferrous ion chelating activity extracts was measured by the decrease in absorbance at 562 nm of the iron (II)-ferrozine complex according to Carter *et al.,* [17] and Yan *et al.,* [18]. To 1 mL sample (with different dilution), 1 mL 0.125 mM $FeSO_4$ was added, followed by 1 mL of 0.3125 mM ferrozine. The test tubes were allowed to equilibrate at room temperature for 10 min. The absorbance was measured at 562 nm against blank. EDTA was used as positive control. The ability of the extract to chelate ferrous ion was calculated using equation:

Chelating effect % = [(Ac - As) / Ac] x 100 (2)

where: Ac is absorbance of control sample and As is absorbance of the test sample.

Reducing power assay

The reducing power assay was conducted as described by Oyaizu [19]. To 1 mL sample extract at different concentration, 2.5 mL 0.2 M phosphate buffer, pH 6.6 and 2.5 mL 1 % potassium ferricyanide was added and mixed vigorously. After incubation at 50 °C for 20 min, 2.5 mL 10 % trichloroacetic acid was added to mixture followed by centrifugation at 3000 rpm for 10 min. Subsequently, 2.5 mL of upper layer of mixture was added to 2.5 mL distilled water and 0.5 mL 0.1 % ferric chloride, and absorbance of resulting solution was read at 700 nm against a blank. Ascorbic acid was used as positive control.

RESULTS

The results of investigation the DPPH scavenger activities of ethanolic extract of fungi tested showed that the maximum decolorization has *Penicillium fumiculosum* (51.34 %), followed by *P. chrysogenum* (37.42 %) at the maximum concentration of 1000 µg/mL. The IC_{50} value against DPPH radical found to be 974 µg/mL for *P. fumiculosum* and 1336 µg/mL for *P. chrysogenum*, as like presented on Figure 1. The results indicate that ethanolic extract of tested fungi may serve as effective radical scavenging with DPPH free radical, converting them in stabile products.

Figure 1.

The results of examinations of the total antioxidant activity of ethanolic extract of tested fungi are shown in Figure 2. By increasing the concentrations of ethanolic extract from

0.0156 mg/mL to 1 mg/mL the total antioxidant activity of the tested fungi was increased too. The total antioxidant activity of *P. chrysogenum* (3.874 µg AA/g) was slightly higher in comparison to fungus *P. fumiculosum* (3.171 µg AA/g).

Figure 2.

The results of ferrous ion chelating activity of alcoholic extract are shown in Figure 3. Ethanolic extract of *P. chrysogenum* showed better chelating activity than *P. fumiculosum* at concentrations from 0.0125 mg/mL to 0.500 mg/mL. By increasing the concentration of the extract from 0.5 mg/mL to 1 mg/mL, the absorbance increased too, but the absorbance values were far higher than the value of the blank absorbance. This method cannot be successfully applied to extract of higher concentrations of fungi tested, hence the results chelating capacity may not be valid. However, ethanolic extract of fungi *P. chrysogenum* showed a better chelating power compared to standard EDTA at concentrations of 0.0125 mg/mL to 0.625 mg/mL.

Figure 3.

The results of the total phenolic content in ethanolic extract of *P. chrysogenum* and *P. fumiculosum* are presented in Figure 4. The total phenolic content in the extract of mycelia is slightly different, but fungus *P. chrysogenum* (2.859 mg GAE/g) showed better yield compared with *P. fumiculosum* (2.109 mg GAE/g).

Figure 4.

The reducing power of the ethanolic extract of mycelium with tested fungi was shown in Figure 5. The reduction potential of the extracts exhibited a dose-dependent activity within a concentration range of 0.015625 mg/mL to 1 mg/mL. Slightly better reducing power has fungus *Penicillium fumiculosum* than *P. chrysogenum* in all concentration of extract, but it is far less in relation to synthetic antioxidant (ascorbic acid).

Figure 5.

DISCUSION

The needs for the discovery and development of effective and safe antioxidants from natural sources have prompted scientists to search for sources of these bioactive resources among filamentous fungi. Antioxidant activity, which was examined using four different assays, was confirmed in bought tested species of *Penicillium*.

Although DPPH scavenger activity of extract of mycelium of tested fungi was lower in comparison to commercial antioxidant (ascorbic acid), activity of extracts concentration at 1 mg/mL was between 37.42 % and 51.34 %. The results of IC_{50} values of these two extracts were still higher than those of tested fungi from genus *Penicillium*. It was found that the percentage inhibition of DPPH free radical ranges from 72 % to 88 % for *Penicillium sp.* NIOMI-02 [20] to 91.1 % in *P. citrinum* [21]. These differences may be attributed to various conditions in which the fungi are grown.

The results suggest that the extract from *Penicillium fumiculosum* mycelia is promising resource of natural antioxidants.

Alcoholic extract of *P. chrysogenum* showed higher total antioxidant capacity than *P. fumiculosum* at concentration of 1 mg/mL.

Phenolic compounds have been reported to be associated with antioxidative action in biological systems, mainly due to their red-ox properties, which can play an important role in absorbing and neutralizing free radicals, quenching singlet and triplet oxygen or decomposing peroxides [22]. Extract of mycelium of *P. chrysogenum* had higher content of total phenol (2.859 mg GAE/g) than extract of *P. fumiculosum* (2.109 mg GAE/g) as like as total antioxidant activity. However, total phenol content found in some fungi of genus *Penicillium* was much higher in relation to this two species. It was found that total phenolic content of *P. granulatum* was 7. 01 mg GAE/g [23], while in endophytic *Penicillium* species was only 1 mg GAE /g [24].

The obtained results indicate that the total phenolic content was correlated with the total antioxidant activity.

Ferrous ions are most effective pro-oxidants and they are commonly found in food system, they can initiate lipid peroxidation and start a chain reaction that leads to the deterioration of food [25]. Their interaction with hydrogen peroxide in biological systems leads to formation of highly reactive hydroxyl radicals [26].

The extracts of the mycelium of fungi tested showed the better chelating capacity compared to standard EDTA at concentrations of 0.00156 to 0.0625 mg/mL. Among two tested fungi, the extract of *P. chrysogenum* showed better ferrous ion chelating capacity. There was positive correlation between chelating activity and total phenol content. The results suggests that *P. chrysogenum* contains phenolic compounds/ligands that are the most effective in sequestering ferrous ions by intercepting all coordination sites of metal ions.

The presence of reductants (antioxidants) causes the reduction of the Fe^{3+}/ferricyanide complex to the ferrous form [27]. The extract of *Penicillium fumiculosum* mycelia has the better reduction potential than *P. chrysogenum*, as confirmed by reducing power assay. In this case, there is no correlation between total phenolic content and reducing power. These results

indicate the presence of some other compounds in extract, instead of phenol, which act as reduktones and inhibit lipid peroxidation by donating a hydrogen atom thereby terminating the free radical chain reaction [28]. These results are consistent with the results of the antioxidant activity of other fungi, such as *Aspergillus candidus*, *A. fumigates*, *Cladosporium sp*, *Chaetomium sp*, and many mushrooms [29, 30], lichens and medicinal plants [31-33].

CONCLUSION

The aim of this study is preliminary examination of whether the selected fungi species could be considered as source of potential natural antioxidants. The results show antioxidative activity of two species of fungi. The highest DPPH free-radical scavenging activities, as well as reducing power were shown by *Penicillium fumiculosum*. On the other hand, ethanolic extract of *Penicillium chrysogenum* showed higher total antioxidant capacity, as well as chelating activity and total phenol content. These results represent a good basis for the further analysis of bioactive substances synthesized in fungi and exhibit different effects on antioxidant activity, which would be beneficial for their selective application in biotechnological processes in the future.

Acknowledgments

This research was financially supported by Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Grant numbers III 43004).

REFERENCES

[1] E.M. Heider, J.K. Harper, D.M. Grant, A. Hoffman, F. Dugan, D.P. Tomer, K.L. O´Neill, Exploring unusual antioxidant activity in a benzoic acid derivative: a proposed mechanism for citrinin, Tetrahedron **62** (2006) 1199–1208.

[2] R. Yawadio Nsimba, H. Kikuzaki, Y. Konishi, Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus spp*. seeds, Food Chem. **106** (2008) 760–766.

[3] P.Y. Zeng, J.G. Wu, L.M. Liao, T.Q. Chen, J.Z. Wu, K.H. Wong, *In vitro* antioxidant activities of endophytic fungi isolated from the liverwort *Scapania verrucosa*, GMR **10** (2011) 3169-3179.

[4] L.P. Zheng, L.W. Gao, J.Q. Zhou, Y.H. Sima, J.W. Wang, Antioxidant activity of aqueous extract of *Tolypocladium sp*. fungus isolated from wild *Cordyceps sinensis,* Afr. J. Biotechnol. **7** (2008) 3004-3010.

[5] N.K. Murthy, K.C. Poshpalatha, C.G. Joshi, Antioxidant activity of endophytic fungus *Phillosticta sp*. isolated from *Guazuma tomentosa*, J. Chem. Res. **3** (2011) 218-225.

[6] D.S. Arora, P. Chandra, Antioxidant activity of *Aspergillus fumigates,* ISRN Pharmacol. **2011** (2011) 11 pages, Article ID 619395, doi:10.5402/2011/619395.

[7] A.W. Albert, Lovastatin and Simvastatin-inhibitors of HMG-CoA reductase and cholesterol biosynthesis, Cardiology **77** (1990) 14-21.

[8] Y. Aniya, T. Yokomakura, M. Yonamine, K. Shimada, T. Nagamine, M. Shimabukuro, H. Gibo, Screening of antioxidant action of various molds and protection of *Monascus anka* against experimentally induced liver injuries of rats, Gen. Pharmacol. **32** (1999) 225-231.

[9] M.A, Dhale, S. Divakar, S. Umesh-Kumar, G. Vijayalakshmi, Isolation and characterization of dihydromonacolin-MV from *Monascus purpureus* for antioxidant properties, Appl. Microbiol. Biotechnol. **73** (2007a) 1197-1202.

[10] M.A. Dhale, S. Divakar, S. Umesh-Kumar, G. Vijayalakshmi, Characterization of dehydromonacolin-MV2 from *Monascus purpureus* mutant, J. Appl. Microbiol. **103** (2007b) 2168-2173.

[11] Z.J. Lin, Z.Y. Lu, T.J. Zhu, Y.C. Fang, Q.Q. Gu, W.M. Zhu, Penicillenols from *Penicillium sp.* GQ-7, an endophytic fungus associated with *Aegiceras orniculatum*, Chem. Pharmaceut. Bull. **56** (2008) 217-222.

[12] Y. Ishikawa, K. Mortimoto, S. Iseki, Atrovenetin as a potent antioxidant compound from *Penicillium* species, JAOCS **68** (1991) 666-668.

[13] T. Takao, N. Watanabe, I. Yagi, K. Sakata, A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish, Biosci. Biotechnol. Biochem. **58** (1994) 1780-1783.

[14] P. Prieto, M. Pineda, M. Aguilar, Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application on the determination of vitamin E1, Anal. Biochem. **269** (1999) 337-341.

[15] V.L. Singleton, R. Orthofer, M. Lamuela-Raventos, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent oxidants and antioxidants, Method Enzymol. **299** (1999)152-178.

[16] V.L. Singleton, J.A. Rossi, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, Am. J. Enol. Vitic. **16** (1965) 144-158.

[17] P. Carter, Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent – ferrozine, Anal. Biochem. **40** (1971) 450-458.

[18] L.Y. Yan, L.T. Teng, T.J. Jhi, Antioxidant properties of Guava fruits: comparison with some local fruits, SAJ **3** (2006) 9-20.

[19] M. Oyaizu, Studies on product of browning reaction prepared for glucose amine, Jap. J. Nut. **44** (1986) 307-315.

[20] M.A. Dhale, A.S. Vijay-Raj, Pigment and amylase production in *Penicillium sp* NIOM-02 and its radical scavenging activity, Int. J. Food Sci. Technol. **44** (2009) 2424-2430.

[21] D.S. Arora, P. Chandra, *In vitro* antioxidant potential of some soil fungi: screening of functional compounds and their purification from *Penicillium citrinum*. Appl. Biochem. Biotechnol. **165** (2011) 639-51.

[22] D. Huang, B. Ou, R.L. Prior, The chemistry behind antioxidant capacity assays, J. Agric. Food Chem. **53** (2005) 1841-1856.

[23] P. Chandra, D.S. Arora, Optimization of antioxidant potential of *Penicillium granulatum* Bainier by statistical approaches, ISRN Microbiol. **2012** (2012) 10 pages, Article ID 452024, doi: 10.5402/2012/452024.

[24] N.K. Murthy, K.C. Pushpalatha, C.G. Joshi, Antioxidant activity and phytochemical analysis of endophytic fungi isolated from *Lobelia nicotianifolia*, J. Chem. Pharm. Res. **3** (2011) 218-225.

[25] C.H. Lin, Y.T. Wei, C.C. Chou, Enhanced antioxidative activity of soybean koji prepared with various filamentous fungi, Food Microbiol. **23** (2006) 628-633.

[26] J.M.C. Gutteridge, B. Halliwell, The deoxyribose assay: an assay both for free hydroxyl radical and for site specific hydroxyl radical production, BJ Letters. **253** (1988) 932-933.

[27] I. Hinneburg, H.J.D. Dorman, R. Hiltunen, Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and species, Food Chem. **97** (2006) 122-129.

[28] R. Xing, H. Yu, S. Lui, W. Zhang, Q. Zhang, Z. Li, P. Li, Antioxidant activity of differently regioselective chitosan sulfates *in vitro*, Bioorg. Med. Chem. **13** (2005) 1387-1392.

[29] M. Kozarski, A. Klaus, M. Nikšić, M. M. Vrvić, N. Todorović, D. Jakovljević, L. J.L.D. Van Griensven, Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*, J. Food Comp. Anal. **26** (2012) 144–153

[30] A. Klaus, M. Kozarski, M. Niksic, D. Jakovljevic, N. Todorovic, L.J.L.D. Van Griensven, Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharides extracted from the basidiomycete *Schizophyllum commune*, LWT - Food Sci. Technol. **44** (2011) 2005–2011

[31] M.F Rios, C.M.G. Pajan, R. H. Galan, A.J.M. Sanchez, I.G. Gallado, Synthesis and free radical scavenging activity of a novel metabolite from the fungus *Colletotrichium gloeosporioides*, Bioorg. Med. Chem. Lett. **16** (2006) 5836-5839.

[32] L.M. Cheung, P.C.K. Cheung, Mushroom extracts with antioxidant activity against lipid peroxidation, Food Chem. **89** (2005) 403-409.

[33] S.S. Ali, N. Kasoju, A. Luthra, A. Singh, H. Sharanabasava, A. Sahu, U. Bora, Indian medicinal herbs as sources of antioxidants, Food Res. Int. **41** (2008) 1-15.

Scientific paper

Influence of detergent and its components on metabolism of *Fusarium oxysporum* in submerged fermentation

Jakovljević D Violeta[1*], Milićević M Jasmina[1], Stojanović D Jelica[1], Solujić R Slavica[2] and Vrvić M Miroslav[3]

[1]University of Kragujevac, Faculty of Science, Institute of Biology and Ecology, Kragujevac, Serbia

[2]University of Kragujevac, Faculty of Science, Institute of Chemistry, Kragujevac, Serbia

[3]University of Belgrade, Faculty of Chemistry, Belgrade, Serbia

Paper received: 20 June 2013

Paper accepted: 06 September 2013

*Corresponding author: e-mail: Jakovljević D Violeta, jakovljevicvioleta@gmail.com

Abstract

The influence of detergent and its components (sodium tripolyphosphate and ethoxylated cetyl oleyl alcohol) at 0.1 % concentration on the enzymatic and metabolic activity of *Fusarium oxysporum* during exponential growth was investigated in this paper. The fungus *Fusarium oxysporum* was isolated from wastewater originating from households which contain detergent. The following biochemical parameters were analyzed: pH, redox potential, proteolytic activity, production of carbohydrates, free and total organic acids, proteins and total dry weight biomass. The detergent had influence on the significant decreasing of redox potential, slight increasing of pH and quantity of glucose and total organic acids, while the proteolytic activity was triple insensive in relation to control. The sodium tripolyphosphate had influence on the slight decreasing of pH, significant increasing of redox potential and quantity of glucose and free and total organic acids, whereas the proteolytic activity was intsensive only 5th and 6th day. The total dry weight biomass of the fungus *F. oxysporum* was slightly inhibited by ethoxylated alcohol but significantly inhibited by detergent and sodium tripolyphosphate.

Keywords: biomass, carbohydrates, ethoxylated cetyl oleyl alcohol, organic acids, proteins, proteolytic activity, sodium tripolyphosphate

INTRODUCTION

Over 2000 years, mankind has used surface-active components or their ingredients in the various aspects of daily life, personal care products, laundry washing, chemical cleaning and cosmetics. Chemical surfactants are amphiphilic compounds, which can reduce surface and interfacial tension by accumulating at the interface of immiscible fluids, and increase the solubility and mobility of hydrophobic or insoluble organic compounds [1, 2]. Their main application is in the manufacturers of detergent. A modern detergent powder is complicated multicomponent mixture consisting of active substances (surfactants), builders (sodium phosphates, sodium carbonate, sodium silicate, zeolith), bleach (perborate, percarbonate), weting agents, optical brightners, softeners, enzymes [3]. Based on ionization of polar head surfactans are divided into four group: anionic, cationic, nonionic and amfotheric. The most widely used in all regions of the world are linear alkyl benzene sulfonates (LASs), alcohol ether sulfates (AESs), aliphatic alcohols (AEs), alcohol sulfates (ASs) and alkaline salts of fatty acids (soap). The linear chain alkylbenzene sulphonate types (LAS) are the most popularly used synthetic anionic surfactant as major ingredient in domestic and industrial detergents more than 30 years [4]. Alcohol ethoxylated are presently the largest volume nonionic surfactants. Growth in use of linear primary AE has been rapid over the past 20 years because of their many desirable qualities such as rapid biodegradation, low to moderate foaming ability, superior cleaning of manmade fibers, tolerance of water hardness and ability to perform in cold water [5]. Builders boost the efficiency of surfactants by counteracting hard water, emulsifying oil and grease, and preventing soil from redepositing. Phosphates are an environmentally delicate chemical and a commonly used detergent builder. Phosphorus is in the form of sodium tripolyphosphate ($Na_5P_3O_{10}$) and is used to soften hard water and suspend

dirt in the water. But, by dissolving in water phosphates create orthophosphates which are more toxic and because of that phosphates can be substituted with a phosphate free Zeolite ($Na_2Al_2Si_3O_{10}$ x $2H_2O$ - Aluminium silicate) [6]. Increased use of household's detergents leads to their accumulation in the wastewater and natural aquatic ecosystems, causing a number of harmful effects on the microbial community and hydrobionts [7]. Numerous investigations showed that detergent causes anaerobic condition in aquatic ecosystems, disrupts cells structure of live beings, changes activities of their enzymes, *etc.* [8]. Various reports are available on the simulative effect of nonionic and ionic surfactants in fermentation broth of microorganism, this resulted in many fold increases in the production and secretion of enzyme such as cellulase [9], phytase [10], amylase [11]. Inclusion of nonionic surfactants, Tween 80 into culture medium increases extracellular protease activity without altering of enzyme properties (12). Also, it was found that addition of detergent have enhancing effects on extracellular production of some metabolites with microorganism [13] and may be useful method for over-production of hydrophobic compounds by means of biological process. The Fusarium oxysporum is mesophilic fungus ubiquitous in soils worldwide. It commonly inhabits aquatic ecosystems and wastewater with high rate of organic matter. The fungus *Fusarium oxysporum* produce severe hydrolytic enzymes which were found to be active on a wide range of natural substrates of either vegetable or animal origin, *e.g.* lipases, cellulases, hemicellulases, pectinases, xylanases, *etc*. Lignocellulolytic enzyme were produced by *F. oxysporum* has been used for conversion of lignocellulosic material to ethanol [14].

The aim of this study was to investigate how commercial detergent (Merix, Henkel, Serbia) and it's mainly components at concentration of 0.1 % influence on metabolic process of fungus *Fusarium oxysporum* under submerged fermentation during exponential growth phase. The submerged culture technique is widely used for biotechnological application as it

is intrinsically less problematic, making it more releable and reproducible easier to monitor and to control key operational parameters and it is more flexible.

EXPERIMENTAL

Isolation of *Fusarium oxysporum* and cultivation

The fungus species *Fusarium oxysporum* was isolated from the river basin of Lepenica (the place of wastewater flood, sewage). Identification of fungus from a sample of wastewater was carried out at the Institute for Biology and Ecology, University of Kragujevac. The fungus was maintained in a chamber with a constant temperature at (4 ± 0.5) °C, on potato-dextrose agar slant (PDA), in sterile conditions. A monosporial culture was developed by the method of exhaustion on a poor agar, in Petri dishes, in sterile conditions. Mesopeptonic agar was used for sterility control. During the experiment, the fungus was cultivated in the sterile Czapek Dox's liquid medium of the following composition (Table 1).

Table 1. Composition of growth media in 1000 ml distillated water

Growth medium	Mark	c / g dm^{-3}							
		$NaNO_3$	K_2HPO_4	$MgSO_4 x 7H_2O$	$FeSO_4 x 7H_2O$	Sucrose	Detergent*	TTP**	AOC***
Control	K	3	1	0.5	0.01	30			
K + 0.1 % D	D	3	1	0.5	0.01	30	1		
K + 0.1% TTP	TTP	3	1	0.5	0.01	30		1	
K + 0.1 % AOC	AOC	3	1	0.5	0.01	30			1

*Detergent "Merix", Henkel, Krusevac

**Sodium tripolyphosphate

***Ethoxylated cetyl oleyl alcohol

Erlenmeyer flasks with growth mediums were sterilized at 120 °C for 20 min (autoclave pressure, 0.14 MPa). The pH control was adjusted about 4.70 before sterilization with 0.1 mol/dm^3 HCl.

Inoculation and sampling

The liquid growth mediums were stored in Erlenmeyer flask (100 ml of medium in 250 ml flask). Each flask was inoculated with one ml spore suspension of ($1x10^4$ CFU ml^{-1}) in three replicates. Erlenmeyer flasks were placed on an electric shaker (Kinetor-m, Ljubljana) thus enabling uniform and constant mixing. All experiments were carried out at room temperature, under alternate light and dark for 8 days. Sampling was started at 4th day after inoculation and repeated every day until the 8th day of the experiment which corresponding exponential growth phase of fungus. The exponential growth phase was confirmed by screening test on solid state fermentation (results of this test were no shown in this paper).

Measurement of pH and redox potential

pH-meter (type MA-5705, the product "Iskra", Kranj) was used to measuring value of pH and electrochemical potential. Redox potential was determined by Petersen's method [15].

Assays of Proteolytic Activity

Activity for the alkaline protease was determined spectrophotometrically by Anson's method, with casein as substrate [16]. Reaction mixture incubated at 37 ℃ for 10 min and arrested by addition of 1 ml 5% trichloroacetic acid (TCA). The mixture was centrifuged at 4.000 rpm min^{-1} and to the supernatant 5 ml of 6 % Na_2CO_3 and 1ml diluted Folin-Ciocalteu's phenol reagent were added. The resulting solution was incubated at room temperature for 30 min and absorbance of the blue color developed was read at 660 nm using tyrosine standard. One unite enzyme activity (IU) was defined as the amount of enzyme that liberated 1µg of tyrosine from casein per minute under assay condition.

Protein assay

Protein was determined according to Kjeldahl, on the basis of the nitrogen amount present in the fungus tissue [17], according to the Eq. (1):

The quantity of proteins (mg) = 6.25 x quantity of nitrogen (1)

Determination of concentrations total and free organic acids

Concentrations of free and total organic acids were determinate by ion exchange chromatography method. To 10 ml of fermentation broth was added 50 ml of ethanol (70 %) and reaction mix was incubated at 70 °C in water bath for 1 h. The mixture was filtered through Whatman filter paper No. 1 and filtrate was concentrated at (50 to 60) °C under reduced pressure to final extract volume of 40 ml. Active charcoal was added to extract following by incubation (30 to 45) min in the water bath at 70 °C. After incubation, the extract was filtrated to remove active charcoal, the residue was made up to a volume of 100 ml with distilled water. Ten milliliters aliquots of filtrate were sampling for determination of concentration the free organic acids by titration 0.1 mol/dm^3 NaOH. Phenolphthalein (0.1 %) was used as indicator. The residual of sampling (90 ml) was passed through a cationic column (Amberlite IR-120) previously activated, to the volumetric flask of 250 ml. By washing the column with distilled water volumetric flask was supplemented to 250 ml. To determination of concentration the total organic acids, 25 ml aliquots were sampling and titration was carried out as previously described [18]. The results were presented as a percentage.

Determination of monosaccharides quantity

Monosaccharides, glucose and fructose were determined after passing 225 ml of filtrate through a previous activated anion column of type Amberlite IR-120 and after evaporation of filtrate to volume 5 to 10 ml. A small volume of sample was inflicted on paper chromatography Whatman N°1 and descending chromatography was performed. The quantity

of glucose and fructose was measured by the spectrophotometer at 600 nm, followed by reaction with suitable reagent to produce a blue-green complex [19].

Determination of dry weight biomass

The mycelia previously removed from fermentation broth were washed with sterile distilled deionization water several times. Both filter paper and mycelia were then dried in an oven at 80 °C to a constant weight. The dry weight of the mycelia was determined by subtracting the initial weight of the filter paper from the weight of mycelia and filter paper.

RESULTS

The effects of detergent and its main components at a concentration of 0.1 % on the metabolism of fungus *Fusarium oxysporum* are presented on Figs 1 to 7. These effects were observed by the following biochemical parameters: pH, redox potential, proteolytic activity, quantity of proteins, organic acids and carbohydrates from 4^{th} to 8^{th} day, whereas total dry weight biomass was measured on 8^{th} day.

The fungus *F. oxysporum* showed on the express or slight decrease of pH value of fermentation broth. The maximum values of pH measured on 4^{th} day in all variation of liquid growth medium except in control. The maximum deviation of pH value was observed in the medium with D and TTP at 0.1 % concentration compared to control. The detergent at 0.1 % concentration influenced on the significant increase of pH value whereas the TTP at 0.1 % concentration influenced on the significant decrease of pH value, as shown in Fig 1.

Figure 1

Redox potential of the fungus *F. oxysporum* grown in all variants of liquid nutrient medium had a positive value throughout the experimental period, with exception in medium with detergent (negative value). Increasing values of redox potential proceeded in parallel with the

development of mycelia, the maximum values were measured on 7th day (control medium) and on 8th day (TTP and AOC media). The results are shown in Fig 2.

Figure 2.

The proteolytic activities of the fungus *F. oxysporum* in the liquid growth medium according to Czapek (the control) and the variants of liquid medium with D, TTP and AOC were particularly expressed on 6th or on 7th day. Presence of AOC in medium had stimulating effect while the presence of detergent had inhibitory effect on proteolytic activity during the experimental period. The results are shown in Fig 3.

Figure 3.

Protein production increased in parallel with exponential mycelial growth but concentrations of total protein was different in relation with type of medium. The highest amount of protein was produced by fungus in medium with TTP on the 7th day whereas the least amount of protein measured in medium with detergent at the same time of experiment. The results are shown in Fig 4.

Figure 4.

The concentration of total organic acids in the control medium and in the medium with AOC was considerably or significantly smaller on the 8th day compare to the 4th day. Contrary, the fungus *F. oxysporum* produced higher percent of total organic acids in the medium with D and TTP, at the same time. The fungus produced different concentration of free organic acids depending on the type of medium. The percentage of free organic acids was lesser in medium with detergent, but it was higher in the medium with TTP and AOC. The TTP showed strong inhibitory effect on the production of free organic acids in the early exponential growth phase but a strong stimulatory effect in the late exponential growth phase. The results are shown in Fig 5.

Figure 5

The concentration of glucose which was produced by the fungus *F. oxysporum* was significantly higher in the growth medium with D and AOC at concentration of 0.1 % on the 8th day in relation to the control. The presence of AOC in growth medium reduced the concentration of fructose to half while the presence of D influenced on increase of concentration of fructose. The detergent showed the strongest stimulating effect on the bioproduction of glucose whereas ethoxylated cetyl oleyl alcohol was the strongest stimulator of the fructose bioproduction compare to control, as **Fig 6** shown.

Figure 6.

The amount of the total dry weight biomass of the fungus *Fusarium oxysporum* grown in the control nutritious medium was significantly or slightly higher compare to the biomass of the same fungus grown in the variants of liquid media with D, TTP and AOC. Detergent and the sodium tripolyphosphate of 0.1 % concentration showed the most significant inhibitory effect on the total dry weight biomass bioproduction in relation to the control (about 50 %). The results are shown in **Fig 7**.

Figure 7.

DISCUSION

For the regular growing and development of microorganisms optimal pH environment is necessary. It affects the morph-physiological characteristics and biochemical properties of microorganisms. With addition of detergent and its components in growth media occurs the different initial pH value but these differences aren't influence on the spores germinating and development of mycelia. St Leger *et al.* [20] observed that *F. oxysporum* tolerate a wide range of pH. However, these pollutants change metabolic activity of fungus on a different ways, which reflects on fungal growth and total dry weight biomass. The changes of pH value resulting from utilization of nutrients from growth media. Simultaneously with changes in pH

values and redox potential is changing too. This implies the role of organic acids in pH homeostasis and growth of fungus in a flexible media with detergent and its components. Increase of glucose and fructose concentration in the medium leads to acidification or pH reduction indicating that the acidity of medium originates from organic acids which are released by glycolysis and Krebs cycle. Production of organic acids depends both on the microorganism and source of P in which the microorganism growth. Many researchers observed that the accumulation of oxalic acid in the cytoplasm can help regulate cytoplasmic pH. Strasser *et al.* [21] reported that oxalic acid is produced in citoplasm of *Aspergillus niger* with litlle or no participation of the tricarboxylic acids cycle. Chemical composition of commercial detergent is very complex and consists of a mixture of active components, builders, fillers, phosphates, bleach, *etc*. Each of these components can react with active center of the enzyme, leading to their inhibition or activation, which reflects on growth and development of fungi. On the other hand, the individual components of detergent as substrates for nutrition are far more acceptable for fungi. As we predicted, the treatment with detergent, AOC and TTP led to the production of different amounts of free and total organic acids. The quantity of free organic acids was insignificantly lesser in the medium with detergent but it was significantly higher in the medium with TTP and AOC at the end of experimental period. Many researchers observed that many fungi species produce different organic acids in medium with polyphosphates because of solubilization of P. In the case of the total organic acids bioproduction, the TTP is behaving as a significant stimulator while the detergent is insignificant stimulator of bioproduction. At the same time, the AOC is behaving as an inhibitor of the total organic acids bioproduction.

The presence of detergent, AOC and TTP in the liquid growth medium affects on the production of different protein concentration during the fungal exponential growth. With culture aging, fungus produced higher amount of proteins in control and AOC media probably

due to increasing of N consumption from these media. On the 7th day of the experiment, significant changes of proteins bioproduction were observed in medium with D and TTP. The production of protein was rapidly decreased in D medium whereas the opposite effect was observed in TTP medium. These results are in accordance with the results of other authors which observed that According to Scervino *et al.* [22] consumption of N increase with decreasing of phosphates concentration which is in agreement with results of this study. Also, our previous studies on other filamentous fungi [23, 24] confirmed that pollutants such as LAS detergent type have inhibitory effect on protein bioproduction.

The proteolytic activity of the fungus *F. oxysporum* was expressed in late exponential phase of fungal growth (6th or 7th day). Inclusion of AOC in growth medium showed significant stimulatory effect on proteolityc activity whereas the treatment with the detergent and TTP had inhibitory effect on proteolytic activity. As well known, numerous microorganisms have ability to sinthetized different proteases depending on type of medium. The protease of *Bacillus* species showed excellent stability and compatibility with some commercial detergents [25]. However, anionic surfactants, such as SDBS and SDS express strong inhibitory effect on enzymes activity in the most of microorganisms [26, 27]. Polar heads of SDS or SDBS bind to the active site of the enzyme through ionic interaction which causes conformational changes of enzymes. Nonionic surfactants type of ethylene oxides, bind to active site of enzymes through hydrogen bonds in order to enhance of conformation flexibility. In agreement with observations of Pradhan and Sukla [28] and Scervino *et al.* [29] our experiment confirms the hypothesis that solubilization of P is related with releasing of organic acids in medium. Many researches observed relation between the beginning of autolysis after depletion of the exogenous carbon source and proteolytic activity to a greater or lesser degree in various species of filamentous fungi [30-32]. However, it is not uncommon for the maximum of proteolytic activity to coincide with the growth phase [33] which it was

confirmed by our investigation. Similar observations with *A. fumigatus* and *N. crassa* suggest that this phenomen can be widespread among fungi.

The concentration of carbohydrates (glucose and fructose) was measured in fermentation broth of growth medium on the 8th day. Fungal metabolism of carbohydrates is influenced by the composition of growth medium. When sucrose is only carbon source, the fungus utilizes preferably glucose than fructose for its metabolism which is consistent with the results of Peynaud and Domercq [34]. Because of that, the concentration of glucose is very low compare to fructose in liquid medium by Czapek. As well known, under aerobic condition the fungus *Fusarium oxysporum* metabolize of glucose via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway resulting in high acetic acids production whereas under anaerobic condition metabolize of glucose via pentose phosphate pathway (PPP) resulting in high ethanol production [35]. The inclusion of D, AOC and TTP leads to decreasing of glucose incorporation in biomass and its higher concentration in medium. The detergent shows the highest inhibitory effect on metabolism glucose. Interesting, TTP and detergent are added in medium shows the stimulatory effect on metabolism fructose and its incorporation in fungal biomass. On the contrary, AOC shows the highest inhibitory effect on metabolism fructose and it's incorporated in biomass. This striking difference in the utilization of sugars could be caused either by differences in the transport systems or by the subsequent intracellular metabolism of the sugars [36]. Probably, detergent and TTP influence on synthesis of inducible enzymes involving in regulation of carbohydrates metabolism or some degradation products have a role of competitive inhibitor of these enzymes. These results are in accordance with the results of other authors and our previous studies on other filamentous fungi [37, 38].

The total dry weight biomass which the fungus *Fusarium oxysporum* produced during the exponential growth was measured on 8th day. The total amount of biomass of the fungus

grown in control is higher compare to media with the detergent, AOC and TTP. These results confirm that these compounds behavior as inhibitors on the bioproduction of biomass. Detergent and the sodium tripolyphosphate at 0.1 % concentration show the significant inhibitory effect on the total biomass (about 50 %), while the AOC show little inhibitory effect compare to control.

CONCLUSION

Based on the obtained results it can be concluded that detergent and its components influence on fungal metabolism in different way. These pollutants no express fungicide effect, but they have inhibitory influence on total dry weight biomass production at different rates. Inclusion of pollutants in growth medium causes production of different metabolites which could have practical application in biotechnology. The alkaline protease from fungus is stimulated by the presence of AOC, so it could have potentially utilization for catalysis and application in detergent formulation. High solubilization of P in medium with TTP indicate potential role of *F. oxysporum* in bioremediation of environment. The production of higher amount of organic acids is stimulated by detergent and its components so the fungus could be apply in different industrial area. The fungal ability to produce different amount of glucose and fructose could be practically apply in biotechnology.

Acknowledgments

This research was financially supported by Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Grant numbers III 43004).

REFERENCES

[1] E.Z. Ron, E. Rosenberg, Biosurfactants and oil bioremediation, Curr. Opin. Biotechnol. **13** (2002) 249- 252.

[2] C.N. Mulligan, Environmental applications of biosurfactants, Environ. Pollut. **133** (2005) 183-198.

[3] J. Palicka, Development and trends in the European laundry detergent market, Proceedings of 3rd International Symposium "Forum Chemiczne", Warsaw, **1997,** pp. 37-42.

[4] G.-G. Ying, Fate, behaviour and effects of surfactants and their degradation products in the environment. Environ. Int. **32** (2006) 417–431.

[5] S.S. Talmage, Environmental and Human Safety of Major Surfactants Lewis Publishers, Boca Raton, 1994.

[6] V. Pattusamy, N. Nandini, K. Bheemappa, Detergent and Sewage Phosphates entering into Lake Ecosystem and Its Impact on Aquatic Environment, International Journal of Advanced Research **1** (2013)129-133.

[7] V. Chaturvedi, A. Kumar, Toxity of sodium dodecyl sulfate in fishes and animals, IJABPT **1** (2010) 630-633.

[8] J.L. Berna, J. Ferrer, A. Moreno, D. Prats, F. Ruiz, The fate of LAS in the environment, Tenside Surf. Det. **26** (1989) 101–107.

[9] A.G. Pardo, Effect of surfactants on cellulose production by *Nectria catalinensis*, Curr. Microbiol. **33** (1996) 275–8.

[10] A. Ebune, S. A1-Asheh, Z. Duvnjak, Effects of phosphate, surfactants and glucose on phytase production and hydrolysis of phytic acid in canola meal by *Aspergillus ficuum* during solid-state fermentation, Bioresource Technol. **54** (1995) 241-247.

[11] R.N.A. Rahman, L.P. Geok, M. Basri, A.B. Sale, Physical Factors Affecting the Production of Organic Solvent-tolerant Protease by *Pseudomonas aeruginosa* strain k, Bioresource Technol. **96** (2005) 429-436.

[12] E.C. Evans, A. Abdullahi, Effect Of Surfactant Inclusions On The Yield and Characteristics Of Protease From *Bacillus Subtilis*, Proc. Rom. Acad. Series B **2** (2012) 108–112.

[13] M. Muramatsu, C. Ohto, S. Obata, E. Sakuradani, S. Shimizu, Various oils and detergents enhance the microbial production of farnesol and related phenyl alcohols, J. Biosci. Bioeng. **106** (2008) 263–267.

[14] C. Xiros, P. Christakopoulos, Enhanced ethanol production from brewer's spent grain by a *Fusarium oxysporum* consolidated system, Biotechnol. Biofuels. 2 (2009) Doi:10.1186/1754-6834-2-4.

[15] G.K. Petersen, Redox measurements: Their Theory and Technique. Radiometer A/S, Copenhagen, Denmark, 1966.

[16] M.L. Anson, The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. J. Gen. Physiol. **22** (1938) 79-89.

[17] J.J. Laukevics, A.F. Apsite, U.E. Viesturs, R.P. Tengerdy, Solid substrate fermentation of wheat straw to fungal protein, Biotechnol. Bioeng. **26** (1984) 1465-1474.

[18] W.A. Bulen, J.E. Varner, R.C. Burrell, Separation of organic acids from plant tissues, Anal. Chem. **24** (1952) 187-190.

[19] D. Veličković, A contribution to Study of Aminoacidic Composition Dynamics of the Protein Complex and Free Amino Acids in Apple Fruits During the Vegetative Period and Storage, PhD Thesis, University of Belgrade, Belgrade, Serbia, 1971

[20] R.J. St Leger, L. Joshi, D. Roberts, Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*, Appl. Environ. Microbiol. **64** (1998) 709 -713.

[21] H. Strasser, W. Burgstaller, F. Schnner, High-yield production of oxalic acids for metal leaching process by *Aspergillus niger*, FEMS Microbiol. Lett. **119** (1994) 365-370.

[22] J.M. Scervino, V.L. Papinutti, M.S. Godoy, M.A. Rodriguez, I. Della Monica, M.J. Pettinari, A.M. Godeas, Medium pH, carbon and nitrogen concentrations modulate the phosphate solubilization efficiency of *Penicillium purpurogenum* through organic acid production, J. Appl. Microbiol. **110** (2011) 1215–1223.

[23] P.E.A. Asea, R.M.N. Kucey, J.W.B. Stewart, Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil, Soil Biol. Biochem. **20** (1988) 459–464.

[24] J. Stojanović, P. Barbić, D. Veličković, J. Vučetić, Z. Prolić, Influence of detergent on the biochemical processes of some fungi under in vitro conditions, Acta Veterinaria **44** (1994) 329-336.

[25] M. Mala, S. Srividya, Partial purification and properties of a laundry detergent compatible alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* species Y, Indian J. Microbiol. **50** (2010) 309–317.

[26] S.Ž. Grbavčić, D.I. Bezbradica, I.M. Karadžic, Z.D. Kneževic-Jugovic, Lipases And Proteases Produced By Indigenous *Pseudomonas Aeruginosa* Strain As Potential Detergent Additives, Hem. Ind. **63** (2009) 331–335.

[27] L.T. Izrael Zivkovic, G.D. Gojgic-Cvijovic, K.R. Gopcevic, M.M. Vrvic, I.M. Karadzic, Enzymatic characterization of 30 kDa lipase from *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, J. Basic Microbiol. **49** (2009) 452-62.

[28] N. Pradhan, L.B. Sukla, Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil, Afr. J. Biotechnol. **5** (2005) 850–854.

[29] J.M. Scervino, M.P. Mesa, I.D. Mónica, M. Recchi, N.S. Moreno, A. Godeas, Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization, Biol. Fertil. Soils. **46** (2010) 755–763.

[30] S. White, M. McIntyre, D.R. Berry, B. McNeil, The autolysis of industrial filamentous fungi, Crit. Rev. Biotechnol. **22** (2002) 1-14.

[31] F. Santamaria, F. Reyes, Proteases produced during autolysis of filamentous fungi, Trans. Br. Mycol. Soc. **91**(1988) 217-220.

[32] F. Reyes, R. Lahoz, P. Cornago, Autolysis of *Neurospora crassa* in different culture conditions and release of *β*-N-acetyl-glucosaminidase and chitinase, Trans. Br. Mycol. Soc. **68** (1977) 357-361.

[33] G.U.L. Braga, R.H.R. Destefano, C.L. Messias, Oxygen consumption by *Metarhizium anisopliae* during germination and growth on different carbon sources, J. Invert. Pathol. **74** (1999) 112-119.

[34] E. Peynaud, S. Domercq, Sur les espbces de levures fermentant selectivement le fructose, Annales de l'Institut Pasteur, **89** (1955) 346-351. (in France)

[35] G. Panagiotou, S.G. Villas-Bôas, P. Christakopoulos, J. Nielsen, L. Olsson, G. Panagiotou, Intracellular metabolite profiling of *Fusarium oxysporum* converting glucose to ethanol, J. Biotechnol. **115** (2005) 425-34.

[36] W. Emmerich, F. Radler, The Anaerobic Metabolism of Glucose and Fructose by *Sucharomyces bailii*, J. Gen. Microbiol. **129** (1983) 3311-3318.

[37] J. Stojanović, V. Jakovljevic, I. Matović, O. Gajović, Z. Mijušković, T. Nedeljković, Influence of detergent on metabolic activity of fungi *Aspergillus niger*, Natural Science **3** (2011) 466-470.

[38] J. Stojanović, J. Milićević, O. Gajović, V. Jakovljević, I. Matović, Z. Mijušković, T. Nedeljković, The effects of detergent, sodium tripoly-phosphate and ethoxyled oleyl-cetyl at metabolic parameters of the fungus *Trichothecium roseum* Link, Arch. Biol. Sci. **63** (2011) 1001-1006.

SCIENTIFIC PAPER

THE ABILITY OF FUNGUS *MUCOR RACEMOSUS* FRESENIUS TO DEGRADE HIGH CONCENTRATION OF DETERGENT

Violeta D Jakovljević[1*], Jasmina M Milićević[1], Jelica D Stojanović[1] and Miroslav M Vrvić[2]

[1]*Institute for Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia*

[2]*Department of Biochemistry, Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Belgrade, Serbia*

Received 22.9.2013.

Revised 5.12.2013.

Accepted 13.12.2013.

* Corresponding author: Jakovljević Violeta, Institute for Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34 000 Kragujevac, Serbia, tel. 034 336 223, fax034 335 040, email: jakovljevicvioleta@gmail.com

Abstract

The ability of fungus *Mucor racemosus* Fresenius to decompose high concentration of commercial detergent (MERIX, Henkel, Serbia) was investigated in this study. Fungus was cultivated in liquid growth medium by Czapek with addition of detergent at concentration 0.5% during 16 days. The biochemical changes of pH, redox potential, amount of free and total organic acids, and activity of alkaline phosphatase were evaluated by analysis of fermentation broth. Simultaneously, biodegradation percentage of anionic surfactant of tested detergent was confirmed by MBAS assay. At the same time, the influence of detergent on fungal growth and total dry weight biomass was determined. Detergent at concentration 0.5% influenced on decreasing of pH value and increasing of redox potential as well as increasing of free and total organic acids. Enzyme activity of alkaline phosphatase was reduced by detergent at concentration 0.5%. The fungus was decomposed about 62% of anionic surfactant during 16 day. Due to fungus was produced higher dry weight biomass (53%) in relation to control.

Keywords: biomass, biodegradation of detergent, enzyme activity, organic acids, pH, redox potential

Highlights

- Native isolate of fungus *Mucor racemosus* Fresenius was tested to high concentration of detergent
- Influence of detergent on changes of fungal biochemical parameters
- Fungus decomposed 62% of anionic surfactant during 16 days which it was confirmed by MBAS assay
- Detergent at concentration of 0.5% reduced about 60% of fungal alkaline phosphatase activity

INTRODUCTION

Over 2000 years, mankind has used surface-active components or their ingredients in the various aspects of daily life, personal care products, laundry washing, chemical cleaning and cosmetics. The most of the surfactants are used in the form of detergent powders. A modern detergent powder is a complicated multicomponent mixture consisting of surfactants, builders, bleach, enzymes and auxiliaries [1, 2]. Usually, a detergent powder contains about 20-25% surfactants.

According to statistical date, worlds annually production of surfactants is about 12.5 million tones, and in the EU it is about 2.99 million tons. Approximately 64% of surfactant is produced in detergents for washing and cleaning. It is estimated that the rate of surfactant production increases annually about 0.5 million tons. Increased usage of detergents in households has led to their accumulation in wastewater and natural aquatic ecosystems, causing many harmful effects on microbial communities and hydro-bionics [3]. The main condition for the relatively safe usage of surfactants is their easy and ultimate biodegradation [4]. Surfactants used in detergent formulation should be degraded at least 80% in terms of primary biodegradation. Detergents as pollutants get into the environment through industrial and municipal wastewater, pesticide application or deposit of waste activated sludge [5]. Discharging of sewage and surfactants in their final appearance in the sediment, the toxicity to aquatic organisms and bioaccumulation in the food chain, along with emissions of CO_2, SO_2 and NO_x, are the main problem today. Products with a high content of surfactants, such as detergents, inhibit the growth of unicellular algae; impede the process of purifying water creating foam, which make it difficult to dissolve oxygen that is necessary for living things breathing and photosynthesis, and cause eutrophication [6]. Due to these facts the maximal allowable concentration of detergent in wastewater which effluents in public sewage is 4 mg L^{-1} and 0.5 mg L^{-1} in natural recipients, according to Legislative acts [7]. Numerous studies have focused on the discovery of new biosurfactants that would replace synthetic as well as on the development of new species of microorganisms that may degrade synthetic surfactants and complex chemical compounds in nature. Filamentous fungi are attractive microorganisms for the study of biodegradation of organic matter due to their well-developed defense mechanisms and the structure of the cell wall. Fungi are recognizing for their superior capability to produce a large variety of extracellular proteins, organic acids and the other

metabolites, as a result of adaptation to severe environmental constraints [8]. Many reports have shown that surfactants change conformation of protein which can influence on enzymatic activity, stability and specificity or disrupt the structure of cell membranes, depending on the concentration of surfactants and type of microorganism.

Mucor racemosus Fresenius is a dimorphic fungus (genus *Mucor*) whose growth induced by carbon dioxide and hexose sugar in the direction of creating a multipolar bud as in yeast or in the direction of branched aerial hyphens [9]. When grown on synthetic and organic substrates *M. racemosus* produces various enzymes such as invertase, alkaline phosphatase, protease, lipase which have application in biotechnology and bioremediation.

The objective of this study was to evaluate the ability of fungus *M. racemosus* Fresen. to degrade commercial powder detergent ("Merix", Henkel, Krusevac, Serbia) at very high concentration (5 g L^{-1}) which is thousands fold higher than law regulated concentrations that may be found in sewage water and natural recipients and lethal for the most microorganisms. Simultaneously, we investigated the influence of detergent on the growth and biochemical characteristics of fungus.

EXPERIMENTAL

Isolation of *Mucor racemosus* Fresenius and cultivation

The fungus species was isolated from wastewater samples of the Rasina River, downstream where the industrial wastewaters of factory Henkel, Serbia, discharge into river. Sample of wastewater was taken in late May 2010. Sample was taken in a sterile container and transferred to the microbiology laboratory where it is disposed of in a refrigerator at 4°C. Within 24 hours, the different dilutions of sample were transferred on Petri plates with malt agar and streptomycin to prevent bacterial growth. The plates were then maintained at room temperature for 5 days. Positive cultures were subculture on malt agar and potato dextrose agar for the isolation of a pure, single colony for identification. The identification of fungus *Mucor racemosus* Fresenius (1976) was based primarily on the macroscopic and microscopic morphology and was carried out by systematic keys. The fungus was maintained on potato-dextrose-agar (PDA) slant grown at 30°C, stored at 4±0.5°C, and subculture monthly in sterile conditions. During the experiment, the fungus was cultivated in the sterile modified Czapek Dox's liquid medium of the following composition (g L^{-1}): $NaNO_3$-3, K_2HPO_4-1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$–0.25, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$–0.01, sucrose-30, distilled water up to1000 mL (control-K) and the same medium with additional 5 g of detergent to obtain concentration of 0.5 % (medium D5).

Erlenmeyer flasks with liquid growth medium were sterilized at 121°C for 20 min (autoclave pressure, 0.14 MPa). The pH control was adjusted before sterilization about 4.70 with 1 mol dm^{-3} HCl.

Inoculation and sampling

The liquid growth media were stored in Erlenmeyer flasks (200 mL of medium in 250 mL flask). One positive control without detergent with spores, one test flask with detergent and with spores and one negative control with detergent but without spores were used in this experiment. Inoculation of media was occurred with 2 mL spore suspension (5×10^6 conidia mL^{-1}). Erlenmeyer flasks in three replicates were placed on an electric shaker (Kinetor-m, Ljubljana) thus enabling uniform and constant mixing. All experiments were carried out at room temperature, under alternate light and dark for 16 days. Sampling was started three days after inoculation and repeated every third day until the end of the experiment. Mycelium was removed by filtration through Whatman filter paper No. 1 and mycelial dry weight was determined. Filtrate was harvested by centrifugation at 10,000*g* for 10 min (+4°C) and the supernatant was used as crude enzyme extract.

Measurement of pH and redox potential

pH and redox potential were measured by digital electric pH meter (PHS-3BW Microprocessor pH/mV/Temperature Meter) type of Bante with glass electrode model 65-1.

Determination of dry weight biomass

The mycelia previously removed from fermentation broth were washed with sterile distilled deionization water several times. Both filter paper and mycelia were then dried in an oven at 80°C to a constant weight. The dry weight of the mycelia was determined by subtracting the initial weight of the filter paper from the weight of mycelia and filter paper.

Determination of anionic surfactant

Anionic surfactant was determined by spectrophotometric methods using methylene blue. The concentration of methylene blue-active substance (MBAS) in the detergents was determined according to Standard Methods for the Examination of water and wastewater [10]. Absorbance measurements of the extracts were done using Perkin-Elmer Lambda 25 UV-Vis spectrophotometer set at 652 nm wavelength against blank chloroform. The concentrations of the residual surfactant present in test detergent in terms of MBAS were calculated using calibration curve with the SDS as the standard. The percentage of degradation was then calculated using the Eq. (1):

$$\%\,\text{Degradation} = 100 - [(A_{625}\,\text{exp} - A_{625}\,\text{blank}) / A_{625}\,\text{std}] \times 100 \quad (1)$$

Where: A_{625} exp is absorbance of test sample, A_{625} blank is absorbance of blank sample and A_{625} std is absorbance of standard sample at 625 nm.

Determination of free and total organic acids concentrations

Concentrations of free and total organic acids were determined by ion exchange chromatography method. To 10 mL of fermentation broth was added 50 mL of ethanol (70%) and reaction mix was incubated at 70°C in water bath for 1 h. The mixture was filtered through Whatman filter paper No. 1 and filtrate was concentrated at 50-60°C under reduced pressure to final extract volume of 40 mL. Active charcoal was added to extract following by incubation 30 min in the water bath at 70°C. After incubation, the extract was filtrated to remove active charcoal; the residue was made up to a volume of 100 mL with distilled water. Ten milliliters aliquots of filtrate were sampling for determination of free organic acids concentration by titration 0.1 mol dm^{-3} NaOH. Phenolphthalein (0.1%) was used as indicator. The residual of sampling (90 mL) was passed through a cationic column (Amberlite IR-120) previously activated, to the volumetric flask of 250 mL. By washing the column with distilled water volumetric flask was supplemented to 250 mL. To determination of concentration the total organic acids, 25 mL aliquots were sampling and titration was carried out as previously described [11]. The results were presented as a percentage.

Assay of Alkaline Phosphatase Activity (EC 3.1.3.1)

Alkaline phosphatase activity was assayed with β-glycerophosphate as substrate. The reaction mixture contained an equal volume of 0.05 mol dm^{-3} glycol buffer (pH 9) with activator (Mg^{2+}), substrate and fermentation broth. After the incubation at 37°C for 30 min reaction was stopped by adding 10% TCA and reaction mixture was stored at ice for 15 min. NH_4-molybdate solution was used for color development and determination of liberated inorganic phosphate (Pi). The absorbance was measured using Perkin-Elmer Lambda 25 UV-Vis spectrophotometer at 660 nm [13]. One unit of enzyme activity (IU) represented the amount of enzyme that released 1 µg of inorganic phosphate per min under the assay conditions.

Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate and results were expressed as means ± standard deviation. For statistical analysis, were used the following tests: Mann-Whitney, Kruskal-Wallis and test for correlation coefficient by SPSS (Chicago, IL) statistical software

package (SPSS for Windows, ver. XIII, 2004). Coefficient of correlation was tested at the level of significance 0.05 and 0.01.

RESULTS AND DISCUSSION

The influence of detergent at 0.5% concentration on the changes of pH, redox potential, the concentration of organic acids, enzyme activity and total dry weight biomass were examined. At the same time, fungal ability to degrade anionic surfactants of tested commercial detergent and utilize degradation products as carbon and energy sources was tested. These parameters were monitored during the different physiological growth phases of fungus *M. racemosus* Fresen. The results are shown on Figures 1 to 6.

Chemical compositions of growth media and experimental conditions have influence on fungal development and total biomass. Many investigations showed that Czapek Dox's liquid medium has good properties for fungal cultivation and high biomass production [14]. Chemical composition of growth media influenced on growth of *Mucor racemosus* Fresen. as Figure 1 shows. The fungus cultivated in medium without detergent (K medium) showed monophasic exponential growth from inoculation until the stationary phase which was achieved on 9th day. After short stationary phase, autolysis began on 12th day and it influenced on slightly decreasing of biomass until the end of experiment. But changes of biomass weren't statistically significant in this period. An early fungal growth phase from inoculation until 3rd day before exponential growth (from 3rd to 6th day) was observed in medium with 0.5% detergent. After 6th day, growth was temporary inhibited and second exponential growth phase was observed from 9th to 16th day. Detergent at 0.5% concentration stimulated growth and mycelial dry weight biomass in relation to the control.

Figure 1.

Figure 2 shows the percentage of biodegradation of anionic component of tested detergent by fungus *Mucor racemosus* Fresen. The biodegradation was evaluated in liquid medium supplemented with detergent at concentration of 0.5% (D5 medium) and with spores of fungus. Also, one negative control with detergent and without spores (nkD5) was evaluated. A negative control experiment was carried in order to exclude any reduction of anionic surfactant concentration caused by non-biological reactions such as adsorption of surfactants to the bottles wall. Negative control of detergent showed that anionic component of tested detergent had chemical stability and minimal adsorption to the bottles wall in experimental conditions. Tested detergent contains 20% of anionic surfactant which is confirmed by MBAS assay. When concentration of anionic surfactant was expressed in mg

mL^{-1} it was obtained that initial concentration of anionic surfactant was 1000 mg mL^{-1} in D5 medium. During first 3 days, the fungus decomposed 18% of initial concentration of anionic surfactant in D5 medium. The fungus decomposed the highest percentage of anionic surfactants (56.16%) during exponential growth phase from 3rd to 6th day. In the following ten days the fungus degraded anionic surfactants continuously but in a lesser percentage. During the whole experimental period, the fungus removed 62.2% of anionic surfactant *i.e.*, 620 mg mL^{-1}, in relation to the negative control (nkD5). The highest amount of removed surfactant the fungus utilized as source for biomass rebuilt. Due to this fact the higher dry weight biomass (about 53%) was measured in medium D5 compare to control. As it could be seen in Fig. 2 the strong linear relationship exists between percentage of biodegradation of anionic surfactant and duration of experiment. Based on the equation of regression curve $y = 4.119x + 4.691$ (Fig. 2), it would be predicted that the fungus will remove 80% of parent anionic surfactant of tested detergent in these experimental conditions for 18.28 days. These results indicate that anionic components of tested detergent satisfying required the limit of 80% biodegradability. According to Jerebkova *et al.*, [20] *Pseudomonas* cultures in continuous bioreactors decomposed 70% of anionic surfactant after 20 days. However, Schleheck *et al.*, [21] revealed that *Citrobacter* spp. has ability to degrade over 90% of anionic surfactant after 35 hours of growth. Hosseini *et al.*, [22] showed that *Acinetobacter johnsoni* strains can utilize 94% of the original SDS levels after 5 days. The results of these bacterial strains are far better in compare with our results but tested concentrations were lesser than applied concentration in this study. Also, pure anionic components are used for test of biodegradation by mention bacterial strain whereas the commercial detergent used in this study is very complex. However, among numerous filamentous fungi species which were isolated from wastewater only the *M. racemosus* Fresen. had ability to grow in a medium containing 0.5% detergent. This concentration exhibited a fungicidal effect on all the other tested fungi (unpublished date). Therefore, biodegradation process is very complex and is dependent on numerous factor such as type of surfactants and its concentration, microorganisms species, experimental conditions, availability of oxygen *etc.*, [23, 24].

Figure 2.

This study evaluated changes of pH and redox potential during fungal growth because of these parameters are very important for regular growth and development. It effects on the morph-physiological characteristics and biochemical properties of microorganisms. The optimum external pH for fungal growth is located under acidic conditions from 4.5 to 5.

Fungi generally alter the pH of the medium in which they grow, due to uptake of the anions or cations in the medium [25, 26]. Therefore, the varied changes witnessed in the pH values of the culture media are a result of the utilization of nutrients from growth media [27]. Based on literature data, the fungus no develops at pH above 9. This study proved the evidence that *M. racemosus* Fresen. could tolerate wide range of environmental pH, from 4.75 to 9.80. Figure 3 shows that pH values of fermentation broth were changed during the growth of fungus from inoculation until the 16th day. The initial pH values media were 4.75 in K medium and 9.80 in D5 medium before inoculation. Also one negative control (nkD5) with detergent but without spores was tested. The pH values of inoculated growth media were changed in relation to their composition and growth phases of fungus. pH value of K medium was increasing from inoculation until 6th day. During stationary and autolysis phases pH value decreased slightly but these changes weren't statistically significant. Contrary, pH value of D5 medium was decreasing in exponential growth phase. The highest decreasing of pH value was observed in medium D5 between 3rd and 6th day (from 9.36 to 6.46 units) which corresponding to primary exponential growth phase. These changes of pH were expressed lesser in secondary exponential growth phase. Interestingly, final pH values of different media were very similar beside the differences between the initial pH values were very significant.

Figure 3.

Figure 4 illustrates that redox potential values of fermentation broth were changed during the growth of fungus from inoculation until the 16th day. The initial redox potential values were 130 mV in K and -148 mV in D5 media before inoculation. One negative control (nkD5) with detergent but without spores was tested also. The redox potential of K medium was decreasing during exponential growth phase (from inoculation until 6th day), whereas it was slightly increasing throughout stationary and autolysis phases. During biphasic exponential growth of fungus in D5 medium, the redox potential was increasing more intensively in primary than in secondary exponential growth phase. The decreasing of redox potential value was measured in D5 medium on 9th day only.

Figure 4.

Organic acids play a key role for alkali tolerance, especially for the intracellular ionic homeostasis. Organic acids were produced by fungi into medium can exist in free (FOA), and in bound form. Sum of amount both, free and bound organic acids represents amount of total organic acids (TOA). Figure 5 shows concentrations of free organic acids (FOA) and of total

organic acids (TOA) in fermentation broth measured during the fungal growth. Concentration of free organic acids (FOA) in fermentation broth was increased slowly or remarkably with culture age progressing, according to type of media. Amount of FOAs in K medium was in range from 0.04% to 0.06% during exponential phase, but when autolysis began the amount of FOAs was increasing from 0.06% to 0.09%. The significant deviation of FOAs production was measured in D5 medium in relation to control. The concentration of FOAs was increased from 0.02% to 0.06% in primary exponential growth phase on 6th day but the most significant increasing was observed on 12th day in secondary exponential growth phase from 0.06% to 0.12%. Maximal concentration of FOAs in detergent medium was higher about 50% compare to K medium, as Fig. 5 shows. Concentration of total organic acids (TOAs) was variable depending on the medium type and phases of fungal growth. In the early phase of fungal growth on 3rd day, concentration of TOAs was very uniform across the different media. The differences began manifesting on 6th day, when higher amount of TOAs was observed in K medium (0.625%) than in D5 medium (0.4%). The concentration of TOAs was increased negligible in K medium whereas the concentration of TOAs was decreased negligible in medium D5 until 9th day. Very significant increasing the concentration of TOAs was observed in D5 medium (from 0.35% to 1.5%) during fungal growth from 9th to 16th day. The maximal amount of TOAs in detergent medium was higher in relation to control (Figure 5). By statistically analysis of TOAs was determined that very significant differences were between K and D5 media. This result could be explained by decreasing of TOAs concentration in D5 medium from inoculation until 9th day and its drastically increasing from 9th to 16th day. High correlation coefficient between concentrations of FOAs and TOAs r = 0.771, $p < 0.01$ suggest that amount of TOAs changes in towards increasing of FOAs rather than bound acids amount. Correlation coefficient between pH and FOAs r = - 0.517, $p < 0.05$ indicates that strength rather than quantity of organic acids influence on pH value. There are many evidences show that the primary biodegradation begins with oxidation of the external methyl group (ω-oxidation) followed by stepwise shortening of the alkyl chain via oxidative cleavage of C2 units (β-oxidation). These processes lead to the formation of sulpho-phenyl carboxylic acids (SPACs) [28, 29]. Wang *et al.*, [30] reported that acetic, propionic, iso-valeric acids are dominant in process waste activated sludge digestion. The existing of correlation between organic acids and fungal biomass indicates that some of organic acids mentioned above originate from detergent degradation, probably ($r = 0.600$, $p < 0.01$).

Figure 5.

Phosphatase represents a large group of phosphatase enzymes acting on various phosphate esters. Phosphomonoesterase is the best-studied group of phosphatase which hydrolyzes monoesters of phosphoric acid. Optimal pH value for activity of these enzymes is 9. Many alkaline phosphatases have a specific effect on substrate. This study revealed that *M. racemosus* Fresen. has good capacity to produce alkaline phosphatase in K medium, as Figure 6 illustrates. The highest enzyme activity (73.23 IU mL^{-1}) in this medium was observed during exponential growth phase on 6^{th} day and was rapidly decreasing until the end of experiment. The maximal phosphatase activity was about 2.5 fold higher than phosphatase activity in medium with detergent. Because of specific effect of enzyme on β-glycerophosphate, higher enzyme activity is expected in K medium considering to the composition of growth medium. Also enzyme easily hydrolyzed monoesters which originated from carbohydrate metabolism than esters bonds in alkyl chain of surfactants. According to Koffi *et al*., [31] SDS display a strong inhibitory effect (about 98%) on phosphatase activity. The maximal value of phosphatase activity (27.478 IU mL^{-1}) in D5 medium was noted during autolysis phase. According to observed results, enzyme activity was inhibited by detergent (about 60%) in relation to control.

Figure 6.

CONCLUSIONS

This study claims that *Mucor racemosus* Fresen. is effective in biodegradation of anionic surfactant of tested commercial detergent in applied concentrations which is thousands folds higher than law regulated concentrations that may be found in sewage water and natural recipients and lethal for the most microorganisms. To our opinion this fungal resistance to tested detergent could be explained by fungal morpho-anatomical characteristics as well as its physiological adaptation on presence of detergent in its habitat. The fungus could be successful applied in biological treatment of natural ecosystems as well as wastewater treatment plants. The results of this investigation showed that fungal alkaline phosphatase remained about 40% activity in the presence of detergent due to fungus could be applied in removing organic phosphates and decreasing eutrophication aquatic ecosystem.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors sincerely thank Editor and anonymous reviewers for suggestions on improving this paper. This research was financially supported by Serbian Ministry of Education, Science and Technological Development (Grant number III 43004).

REFERENCES

[1] E.Z. Ron, E. Rosenberg, Curr. Opin. Biotechnol. **13** (2002) 249-252.

[2] C.N. Mulligan, Environ. Pollut. **133** (2005) 183-198.

[3] V. Chaturvedi, A. Kumar, IJABPT, **1** (2010) 630-633.

[4] I.M. Banat, R.S. Makkar, S.S. Cameotra, Appl. Microbiol. Biotechnol. **53** (2000) 495-508.

[5] A. Petterson, M. Adamson, G. Dave, Chemosphere **41** (2000) 1611-1620.

[6] M. Raimbault, EJB Electronic. J. Biotech. **1** (1998) 174-188.

[7] European Parliament Regulation (EC) No 648/2004 of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 on detergents, In Official Journal of the European Union, EC No 684/2004 (2004).

[8] V.G. Lilly, H.L. Barnett, Physiology of the fungi, McGraw-Hill Book Co., New York, Toronto, London (1951), p. 464.

[9] P. Borgia and P.S. Sypherd, J. Bacteriol. **130** (1977) 812-817.

[10] APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association, Washington, USA (1989) p. 1 268.

[11] W.A. Bulen, J.E. Varner, R.C. Burrell, Anal. Chem. **24** (1952) 187-190.

[12] M. Somogyi, J. Biol. Chem. **195** (1952) 19-23.

[13] J.K. Heinonen, R.J. Lahti, Anal. Biochem. **113** (1981) 313-317.

[14] J. Mehta, M. Jakhetia, S. Choudhary, J. Mirza, D. Sharma, P. Khatri, Eur. J. Exp. Biol. **2** (2012) 2061-2067.

[15] A. Peksel, C.P. Kubicek, Turk. J. Chem. **27** (2003) 581-590.

[16] Z. Barboráková, R. Labuda, G. Häubl, D. Tančinová, JMBFS **1** (2012) 466-477.

[17] M. Velan, S. SheebaVarma, P. Gnanambigai, M.B. Lakshmi, IJCEES **3** (2012) 318-323.

[18] D. Schleheck, A.M. Cook, Arch. Microbiol. **183** (2005) 369-377.

[19] A.Y. Kagalwala, K. Kavitha, IJLBPR **1** (2012) 128-138.

[20] H. Jerabkova, B. Kralova, J. Nahlik, Int. Biodeteriorat. Biodegradat. **44** (1999) 233-241.

[21] D. Schleheck, M. Lechner, R. Schonenberger, Appl. Environ. Microb. **69** (2003) 938-944.

[22] F. Hosseini, F. Malekzadeh, N. Amirmozafari, N. Ghaemi, Int. J. Environ. Sci. Tech. **4** (2007) 127-132.

[23] F. Ahimou, P. Jacques, M. Deleu, Enzyme Microb. Technol. **27** (2000) 749–754.

[24] H. Zhong, G.M. Zeng, J.X Liu, X.M. Xu, X.Z. Yuan, H.Y. Fu, G.H. Huang, Z.F. Liu, Y. Ding, Appl. Microbiol. Biotechnol. **79** (2008) 671–677.

[25] E. Moore-Landecker, Fundamentals of Fungi, Prentice Hall, Upper Saddle River, New York (1996), p.574.

[26] D.H. Griffin, Fungi Physiology, Wiley-Liss, New York (1994), p.468.

[27] M. Orlowski, Microbiol. Rev. **55** (1991) 234-258.

[28] A.M. Cook, Tenside Surfact. Det. **35** (1998) 52-56.

[29] J.D. Van Hamme, A. Singh, O.P. Ward, Microbiol. Mol. Biol. Rev. **67** (2003) 503–549.

[30] Q.H. Wang, M. Kuninobu, H.I. Ogawa, Y. Kato, Biomass Bioenerg. **16** (1999) 407-416.

[31] D. Koffi., B. Faulet, J. Gonnety, M. Bédikou, L.P. Kouame, I.A. Zoro Bi, S.L. Niamke, Sci. Nat. **7** (2010) 221-235.

DIAGNOSIS PRESS™
© J. "Biotechnology & Biotechnological Equipment"

C E R T I F I C A T E

The editorial office of *Biotechnology & Biotechnological Equipment* certifies that the article entitled

Detergent like stressor and nutrient in the metabolism of *Penicillium chrysogenum*

Authors: VIOLETA D JAKOVLJEVIĆ, JASMINA M MILIĆEVIĆ and JELICA D STOJANOVIĆ

has been accepted for publication in *Biotechnology & Biotechnological Equipment*.

Sofia, *Executive editor:*

2013-10-28 */S. Pavlova/*

6 Damyan Gruev Str., 1612 Sofia, Bulgaria
Tel./Fax (+359 2) 66 46 88, (+359 2) 963 23 02,
(+359 2) 963 4139
E-mail: diagnosisp@gmail.com
Website: www.diagnosisnet.com
www.diagnosisnet.com/bbeq