

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ  
ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Број 020-421

25.10.2000 год  
НОВИ САД

UNIVERZITET U NOVOM SADU  
TEHNOLOŠKI FAKULTET

*Mr Mirjana G. Antov*

**RASPODELA PEKTINAZA U VODENIM  
DVOFAZNYM SISTEMIMA**

*DOKTORSKA DISERTACIJA*

Novi Sad, 2000.

*Rad na tezi, pod mentorstvom prof. dr Draginje Peričin, za mene je predstavljao prijatno, a nadasve dragoceno iskustvo, na čemu joj se iskreno zahvaljujem.*

*Poštovanim profesorima, dr Suzani Petrović i dr Slavku Kevrešanu, iskazujem zahvalnost na sugestijama, koje su doprinele da rad dobije svoj konačni oblik.*

*Dr Gordani Dimić hvala na pomoći, dobroj volji i strpljenju.*

*Svima, koji su mi na različite načine pomogli, ogromno hvala.*

*I konačno, ali ne i najmanje važno, hvala Mileni za neke lepe časove, podeljene u laboratoriji.*



**UNIVERZITET U NOVOM SADU  
TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj:

**RBR**

Identifikacioni broj:

**IBR**

Tip dokumentacije:

**TD**

Monografska publikacija

Tip zapisa:

**TZ**

Tekstualni štampani materijal

Vrsta rada:

**VR**

Doktorska disertacija

Autor:

**AU**

Mirjana G. Antov

Mentor/Ko-mentor:

**MN**

Dr Draginja Peričin, red.prof.

Naslov rada:

**NR**

Raspodela pektinaza u vodenim  
dvofaznim sistemima

Jezik publikacije:

**JP**

Srpski (latinica)

Jezik izvoda:

**Jl**

Srpski /engleski

Zemlja publikovanja:

**ZP**

Jugoslavija

Uže geografsko područje:

**UGP**

Vojvodina

Godina:

**GO**

2000.

Izdavač:

**IZ**

Autorski reprint

Mesto i adresa:

**MA**

Tehnološki fakultet, Novi Sad,  
Bulevar Cara Lazara 1

Fizički opis rada:

**FO**

7 poglavlja, 88 strana, 188 literaturnih  
navoda, 20 tabela, 13 slika

Naučna oblast:

**NO**

Tehničko-tehnološke nauke

Naučna disciplina:

**ND**

Biohemija

Predmetna odrednica /ključne reči:

**PO**

Vodeni dvofazni sistemi, fenomeni  
raspodele, pektinaze

**UDK:**

577.152.3: 541.12.012

Čuva se:

**ČU**

U biblioteci Tehnološkog fakulteta,  
Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1

Važna napomena:

**VN**

nema

Izvod/abstrakt:

**IA**

U radu je ispitana raspodela pektinaza u vodenim dvofaznim sistemima sastavljenim od polietilen glikola 4000 i jednog od dva dekstrana, sirovog i dekstrana 40000. Konceptija rada je podrazumevala definisanje sistema u kojima su vršeni eksperimenti raspodele, ispitivanje parametara raspodele pektinaza komercijalnog enzimskog preparata u model sistemima i, konačno, kultivaciju *Polyporus squamosus* u dvofaznim sistemima.

Ispitivanje uticaja masenih udela polietilen glikola na raspodelu pektinaza u model sistemu, pri konstantnom udelu sirovog dekstrana od 7.5% (w/w), pokazalo je negativan uticaj na parametre raspodele, te su najveće vrednosti koeficijenta raspodele (K) dobijene pri najmanjem ispitivanom udelu polietilen glikola, 5% (w/w), i iznosili su za endo-pektinazu (endo-p) 1.76, odnosno za egzo-pektinazu (egzo-p) 1.22. Istu zavisnost je pokazalo i ispitivanje u model sistemu sa dekstranom 40000, ali je vrednost  $K_{\text{endo}}$  bila mnogo niža (0.22). Povećanje udela sirovog dekstrana, pri stalnom udelu, 5% (w/w), polietilen glikola, negativno je uticalo na vrednosti parametara

raspodele egzo-p, te su maksimalne vrednosti dobijene pri najmanjem udelu, 3% (w/w), dekstrana ( $K_{\text{egzo}}$  0.79, prinos u gornjoj fazi (Y) 62.04%, stepen prečišćenosti u gornjoj fazi (st.preč.) 5.5).

Sa povećanjem dužine veznih linija u model sistemu sa sirovim dekstranom opadale su vrednosti parametara raspodele pektinaza. Najbolji rezultati ( $K_{\text{endo}}$  1.66,  $Y_{\text{endo}}$  60.85%,  $K_{\text{egzo}}$  0.95,  $Y_{\text{egzo}}$  47.07%) dobijeni su najkraćoj veznoj liniji, dužine 7.44%. Povećanje odnosa zapremina u istom sistemu smanjilo je koeficijente raspodele endo- i egzo-p, kao i njihove stepene prečišćenosti u gornjoj fazi, a u isto vreme povećalo prinose u toj fazi.

Dodatak amonijum sulfata i natrijum sulfata u model sistem polietilen glikol/sirovi dekstran u koncentraciji od po 15 mmol/l povećao je  $K_{\text{endo}}$  1.25, odnosno 1.2 puta, dok je  $K_{\text{egzo}}$  u prisustvu 15 mmol/l amonijum sulfata ili 5 mmol/l natrijum sulfata bio za 60% veći. Povećanje pH vrednosti  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pufera povećalo je koeficijente raspodele oba tipa pektinaza, te je  $K_{\text{endo}}$ , na pH 7.5, bio 0.9, a  $K_{\text{egzo}}$  0.76, na pH 7.0. Najbolja raspodela endo-p u gornju fazu model sistema ostvarena je pri 0.4 mol/l fosfatnog pufera ( $K$  4.21, Y 85.78%, st.preč. 10). Vrednosti iznad 0.1 mol/l fosfatnog pufera nisu imale značajnijeg uticaja na raspodelu egzo-p.

Kultivacija *Polyporus squamosus* je bila moguća u dvofaznom sistemu polietilen glikol/sirovi dekstran, sa pektinom, kao inducerom, pri čemu je ostvareno odvajanje biomase od pektinaza njihovom raspodelom u suprotne faze. U sistemu sastava 5% (w/w) polietilen glikol/4% (w/w) sirovi dekstran, količina produkovane biomase je bila 4.5 puta veća od one u homogenom medijumu, ukupne egzo-p aktivnosti 1.82 puta veća, a endo-p aktivnosti jednaka onoj u homogenom medijumu. Drugog dana kultivacije ostvarene su najveće vrednosti parametara raspodele ( $K_{\text{endo}}$  2.45,  $Y_{\text{endo}}$  80.22%, st.preč.<sub>endo</sub> 7;  $K_{\text{egzo}}$  0.6,  $Y_{\text{egzo}}$  49.83%, st.preč.<sub>egzo</sub> 5.19). Povećanje koncentracije amonijum sulfata za 15 mmol/l u podlozi za kultivaciju u dvofaznom sistemu sastava 5% (w/w) polietilen glikol/4% (w/w) sirovi dekstran, povećalo je koeficijent raspodele endo-p za 81%, vrednost ove aktivnost u gornjoj fazi za 37%, a da nije uticalo na raspodelu biomase *P. squamosus*.

Prisustvo različitih koncentracija fosfata nije uticalo na raspodelu biomase *P. squamosus* u dvofaznom

sistemu. Pri 0.2 mol/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  postignuto je idealno odvajanje biomase od endo-p, uz  $K_{\text{egzo}}$  1.12. Najveća vrednost ukupnih produkovanih aktivnosti oba tipa ostvarena je pri 0.1 mol/l fosfata, uz koeficijente raspodele za endo-p i egzo-p 3.9 i 0.95 i visoke stepene njihove prečišćenosti u gornjoj fazi (5.89 i 14.36, redom).

Kultivacija *P. squamosus* je ostvarena i u dvofaznom sistemu koji je sadržao suve izlužene repine rezance, sa raspodelom biomase u donju fazu. Koeficijenti raspodele su iznosili 4.70, odnosno 2.78, za endo-p, odnosno egzo-p. Prinosi oba enzima u gornjoj fazi su bili 90.71% za endo-p i 85.24% za egzo-p, uz najveće stepene njihove prečišćenosti, 4.26 i 7.98, redom.

Datum prihvatanja teme od strane NN veća:

**DP** 30.maj 2000.

Datum odbrane:

**DO**

27. 12. 2000.

Članovi komisije:

**KO**

Predsednik dr Suzana Petrović,  
red.prof., Tehnološki fakultet

— Mentor dr Draginja Peričin, red.prof.,  
Tehnološki fakultet

Član dr Slavko Kevrešan, red.prof.,  
Poljoprivredni fakultet

UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF TECHNOLOGY

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number:

**ANO**

Identification number:

**INO**

Document type:

**DT**

Monographic publication

Type of record:

**TR**

Textual material, printed

Contents code:

**CC**

Ph.D. Thesis

Author:

**AU**

Mirjana G. Antov

Menthor/co-Menthor:

**MN**

Dr Draginja Peričin, full professor

Title:

**TI**

Partition of pectinases in aqueous  
two-phase systems

Language of text:

**LT**

Serbian (Roman alphabet)

Language of abstract:

**LS**

Serbian/ English

Country of publication:

**CP**

Yugoslavia

Locality of publication:

**LP**

Vojvodina

Publication year:

**PY**

2000.

Publisher:

**PB**

Author's reprint

Publication place:  
**PL** Faculty of Technology, Novi Sad,  
Bulevar Cara Lazara 1

Physical description:  
**PD** 7 chapters, 88 pages, 188 references,  
20 tables, 13 figures

Scientific field:  
**SF** Technical and technological sciences

Scientific discipline:  
**SD** Biochemistry

Subject/Key words:  
**SX** Aqueous two-phase systems, partition  
phenomenons, pectinases

**UC:** 577.152.3: 541.12.012

Holding data:  
**HD** Library of Faculty of Technology,  
Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1

Note:  
**N** non

Abstract:  
**AB**

Partition of pectinases in aqueous two-phase systems composed of polyethylene glycol 4,000 and crude dextran or dextran 40,000 was studied in this work. As the first step, phase diagrams were constructed, than partition of commercial pectinases was studied in model systems and finally, cultivation of *Polyporus squamosus* in aqueous two-phase systems was conducted.

Increasing of the concentration of polyethylene glycol in model system at fixed 7.5% (w/w) crude dextran decreased partition parameters. Maximal values for partition coefficient ( $K$ ) of endo-pectinase (endo-p), 1.76, and exo-pectinase (exo-p), 1.22, were obtained at 5% (w/w) polyethylene glycol. The same was revealed in investigations in model system with dextran 40,000, but  $K_{\text{endo}}$  was lower (0.22). Increasing of concentration of crude dextran at fixed 5% (w/w) polyethylene glycol decreased partition parameters of exo-p, so their maximal values ( $K_{\text{exo}}$  0.79, top phase yield ( $Y$ ) 62.04% and purification factor in top phase 5.5) were obtained at 3% (w/w) crude dextran.



Increasing of the tie-line length caused decreasing of partition parameters and maximal results were achieved at the shortest tie-line 7.44% ( $K_{\text{endo}}$  1.66,  $Y_{\text{endo}}$  60.85%,  $K_{\text{exo}}$  0.95,  $Y_{\text{exo}}$  47.07%) in model system with crude dextran. With increasing of the volume ratio, partition coefficients of endo-p and exo-p were decreased, as well as their purification factor in top phase, while top phase yield for both enzymes had higher values.

The addition of 15 mmol ammonium sulphate/l and 15 mmol sodium sulphate/l in model system, composed of polyethylene glycol and crude dextran, increased  $K_{\text{endo}}$  1.25 and 1.2 times, respectively, while  $K_{\text{exo}}$  in the presence of 15 mmol ammonium sulphate/l or 5 mmol sodium sulphate/l was 60% higher. Increasing of pH of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  buffer favoured partition of both endo-p and exo-p in top phase, so  $K_{\text{endo}}$  was 0.9 at pH 7.5 and  $K_{\text{exo}}$  was 0.76 at pH 7.0. The favourable partition of endo-p in top phase was achieved in the presence of 0.4 mol phosphate buffer/l ( $K$  4.21,  $Y$  85.78% and purification factor in top phase 10). Concentrations of phosphate buffer above 0.1 mol/l didn't have significant influence on partition of exo-p.

Cultivation of *Polyporus squamosus* in polyethylene glycol/crude dextran aqueous two-phase system was accomplished with pectin as inducer and biomass was separated from pectinases by their partition into opposite phases. In system composed of 5% (w/w) polyethylene glycol and 4% (w/w) crude dextran, amounts of produced biomass and exo-p activity were 4.5 and 1.82 times higher, respectively, and endo-p activity equal to those obtained in homogeneous cultivation. At the second day of cultivation the highest values of partition parameters were obtained ( $K_{\text{endo}}$  2.45,  $Y_{\text{endo}}$  80.22%, purification factor for endo-p 7;  $K_{\text{exo}}$  0.6,  $Y_{\text{exo}}$  49.83%, purification factor for exo-p 5.19). Increasing of concentration of ammonium sulphate in two-phase medium for 15 mmol/l increased  $K_{\text{endo}}$  for 81% and endo-p activity in top phase for 37%, but didn't influence partition of biomass.

Presence of phosphate at various concentrations didn't affect partition of biomass in two-phase system. At 0.2 mol  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /l the onesided partition of endo-p was accomplished while  $K_{\text{exo}}$  was 1.12. The highest amounts of produced activities of endo-p and exo-p were obtained at 0.1 mol phosphate/l and partition coefficients were 3.9 and

0.95, respectively, followed by high values of purification factors in top phase (5.89 and 14.36, respectively).

Cultivation of *P. squamosus* was accomplished in two-phase system containing dry sugar beet extraction waste and fungal growth was restricted to bottom phase. Partition coefficients were 4.70 and 2.78 for endo-p and exo-p, respectively. Top phase yields amounted 90.71% for endo-p and 85.24% for exo-p followed by the highest obtained purification factors in top phase (4.26 and 7.98, respectively).

Accepted by the Scientific Board on:

**ASB**

May 30<sup>th</sup> 2000

Defended on:

**DE**

Thesis defend board:

**DB**

Chairman Dr Suzana Petrović,  
Full Professor

Menthor Dr Draginja Peričin,  
Full Professor

Member Dr Slavko Kevrešan,  
Full Professor

## SADRŽAJ

	Strana
1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DEO .....	3
2.1. Opšta razmatranja vodenih dvofaznih sistema .....	3
2.1.1. Teorijski aspekti razdvajanja faza u vodenim dvofaznim sistemima .....	3
2.1.2. Fazni dijagram .....	4
2.1.3. Parametri koji karakterišu fenomen razdvajanja ...	5
2.2. Faktori koji utiču na raspodelu u vodenim dvofaznim sistemima .....	6
2.2.1. Karakteristike supstance koje utiču na raspodelu .....	7
2.2.2. Karakteristike sistema koje utiču na raspodelu .....	8
2.3. Primena vodenih dvofaznih sistema .....	14
2.3.1. Analitička primena .....	14
2.3.2. Primena u razdvajanju proteina, delova ćelija i samih ćelija .....	15
2.3.3. Biološke konverzije u vodenim dvofaznim Sistemima .....	16
2.3.4. Ostale primene .....	19
2.3.5. Način izvođenja operacija u vodenim dvofaznim sistemima .....	20
2.4. Fungalne pektinaze .....	21
2.4.1. Klasifikacija enzima koji razgrađuju pektinske materije .....	21
2.4.2. Sinteza i sekrecija fungalnih pektinaza .....	21
2.4.3. Fungalne pektinaze u patogenezi .....	24
2.4.4. Industrijska proizvodnja pektinaza .....	25
2.4.5. Primena pektinaza .....	26
2.4.6. Pektinaze gljive <i>Polyporus squamosus</i> .....	26
3. MATERIJAL I METODE .....	27
3.1. Komercijani preparat pektinaza .....	27
3.2. Priprema model dvofaznih sistema .....	27
3.3. Mikroorganizam .....	28

3.4. Sastav podloge .....	28
3.5. Inokulacija i uslovi kultivacije .....	29
3.6. Biomasa .....	29
3.7. Rastvorljivi proteini .....	29
3.8. Redukujući šećeri .....	30
3.9. Koncentracija pektina .....	30
3.10. Aktivnost enzima .....	30
3.11. Izračunavanje parametara raspodele .....	30
4. REZULTATI I DISKUSIJA .....	32
4.1. Raspodela pektinaza u model sistemima .....	32
4.1.1. Uticaj masenih udela polimera na raspodelu pektinaza u model sistemima .....	32
4.1.1.1. Fazni dijagram polietilen glikol 4000/sirovi dekstran .....	32
4.1.1.2. Uticaj masenih udela polimera na raspodelu pektinaza u model sistemu polietilen glikol 4000/sirovi dekstran .....	33
4.1.1.3. Fazni dijagram polietilen glikol 4000/dekstran 40000 .....	36
4.1.1.4. Uticaj masenih udela polimera na raspodelu pektinaza u model sistemu polietilen glikol 4000/dekstran 40000 .....	36
4.1.2. Uticaj dužine veznih linija na raspodelu pektinaza u model sistemu polietilen glikol 4000/sirovi dekstran .....	38
4.1.3. Uticaj odnosa zapremine faza na raspodelu pektinaza u model sistemu polietilen glikol 4000/sirovi dekstran .....	39
4.1.4. Uticaj neorganskih soli na raspodelu pektinaza u model sistemu polietilen glikol 4000/sirovi dekstran .....	42
4.1.4.1. Uticaj amonijum i natrijum sulfata .....	42
4.1.4.2. Uticaj fosfata .....	44
4.1.4.3. Uticaj natrijum hlorida .....	47
4.2. Kultivacija <i>Polyporus squamosus</i> u vodenim dvofaznim sistemima polietilen glikol 4000/sirovi dekstran .....	49
4.2.1. Uticaj amonijum sulfata na raspodelu pektinaza tokom kultivacije <i>Polyporus squamosus</i> .....	53
4.2.2. Uticaj fosfata na raspodelu pektinaza tokom kultivacije <i>Polyporus squamosus</i> .....	55
4.2.3. Uticaj pH <sub>i</sub> na kultivaciju <i>Polyporus squamosus</i> u dvofaznom sistemu .....	58

4.2.4. Kultivacija <i>Polyporus squamosus</i> u dvofaznom sistemu sa izluženim repinim rezancima .....	60
4.3. Kultivacija <i>Polyporus squamosus</i> u vodenom dvofaznom sistemu polietilen glikol 4000/ dekstran 40000 .....	65
4.3.1. Uticaj polimera na produkciju biomase i pektinaza gljive <i>Polyporus squamosus</i> .....	67
4.3.2. Uticaj inicijalnih pH vrednosti dvofaznog sistema na produkciju biomase i pektinaza <i>Polyporus squamosus</i> .....	68
5. ZAKLJUČAK .....	71
6. LITERATURA .....	74
7. SKRAĆENICE I OZNAKE .....	88



## 1. UVOD

Brzi razvoj biohemije poslednjih decenija, kako u fundamentalnom, tako i u primenjenom smislu, imao je za potrebu i adekvatan razvoj tehnika koje se u njoj primenjuju. Sigurno je da su među njima separacione tehnike te, koje zauzimaju najznačajnije mesto. Primena različitih fizičko-hemijskih metoda razdvajanja omogućila je izolovanje velikog broja biohemijski važnih jedinjenja. Bez obzira na velike pomake na ovom planu, dalji razvoj separacionih metoda morao bi da zadovolji kriterijum povećane selektivnosti razdvajanja, kao i unapređenja tehnika za izdvajanje i prečišćavanje ekstremno osetljivih proteina, kakvi su npr. enzimi. Jedna od najatraktivnijih, ne samo po pitanju brzine izvođenja i efikasnosti učinka, već i po ekološki prihvatljivom momentu, je separacija u vodenim dvofaznim sistemima.

Vodeni dvofazni sistemi se stvaraju kao rezultat mešanja vodenih rastvora dva međusobno nekompatibilna polimera ili polimera i soli. Oni poseduju nekoliko osobina koje ih čine pogodnim za rad sa biološkim materijalima, a to su visok sadržaj vode u fazama iako one više nisu međusobno mešljive, nizak međupovršinski napon između faza te, shodno tome, brzo uspostavljanje ravnoteže, dok je koeficijent raspodele, koji karakteriše razdvajanje u ovakvim sistemima, veličina pouzdana za prenošenje u veće razmere prilikom projektovanja uređaja u industriji.

Kao efikasna i moderna tehnika, vodeni dvofazni sistemi su našli primenu u biohemiji, mikrobiologiji, tehnici kulture tkiva, medicini, farmakologiji, genetskom inženjeringu i mnogim drugim oblastima nauke.

Vodeni dvofazni sistemi u fundamentalnoj i primenjenoj biohemiji imaju primenu u analitičkim procedurama, procesima enzimske i mikrobiološke konverzije, izolovanju i prečišćavanju intracelularnih enzima, kao i separaciji ćelija i njihovih konstituenata. Sistemi za kultivaciju, zasnovani na vodenim dvofaznim sistemima, takođe pružaju mogućnost zamenjivanja težeg i

nepredvidljivijeg koraka mehaničke separacije ćelija od proizvoda ekstrakcionim procesom čiji su uslovi tako odabrani da omogućavaju njihovo raspodeljivanje u suprotne faze.

Bez obzira na činjenicu da je postignuta kultivacija mikroorganizama u cilju proizvodnje nekoliko ekstracelularnih enzima, o proizvodnji pektinaza u dvofaznim sistemima u literaturi nema podataka. Pektinaze su ekstracelularni enzimi, koji razgrađuju pektinske materije različitim mehanizmima, a proizvode ih kako fungi, tako i bakterije i kvasci. Međutim, upravo su pektinaze fungalnog porekla od najvećeg komercijalnog značaja, imajući veliku primenu u industriji prerade voća i povrća, kao i u proizvodnji vina. Gljiva *Polyporus squamosus* takođe poseduje sposobnost sekrecije ovih enzima, a njena biomasa je po proteinskom sadržaju visokovredna i može se koristiti za ishranu životinja i ljudi.

Cilj ovog rada je bio ispitivanje raspodele pektinaza u vodenim dvofaznim sistemima, sastavljenim od polietilen glikola i dekstrana. Praćenje parametara, koji karakterišu proces raspodele, vršeno je u model sistemima sa komercijalnim preparatom pektinaza, pri čemu je ispitivan uticaj molekulske mase polimera, njihovih masenih udela, dužine veznih linija i zapreminskog odnosa, vrste i koncentracije neorganskih soli, dodatih u sistem, kao i pH sistema.

Ova ispitivanja su, nadalje, poslužila kao osnova za ostvarenje kultivacije gljive *Polyporus squamosus* u dvofaznom sistemu sa ciljem istovremenog dobijanja dva proizvoda, enzima i biomase, koji bi bili razdvojeni u različitim fazama.

Takođe je ispitana mogućnost kultivacije *P. squamosus* i dobijanja pektinaza u vodenim dvofaznim sistemima, koji su, umesto pektina, sadržavali suve izlužene repine rezance, što je bilo motivisano ekonomskim, sa jedne, ali i ekološkim razlozima, sa druge strane.



## 2. TEORIJSKI DEO

### 2.1. Opšta razmatranja vodenih dvofaznih sistema

Za vodene dvofazne sisteme se zna još od 1896. godine, kada je holandski naučnik Beijerinck opisao obrazovanje dve tečne faze prilikom mešanja agara i rastvorljivog skroba ili agara i želatina. Danas se ovaj fenomen označava kao nekompatibilnost polimera i dešava se u organskim sintetičkim rastvaračima, kao i u vodenim sistemima.

#### 2.1.1. Teorijski aspekti razdvajanja faza u vodenim dvofaznim sistemima

Uzrok nekompatibilnosti leži u nemogućnosti polimernih navoja da prodru jedni u druge. Kada se npr. pomešaju dva polimera, rezultat neće biti homogena smeša, nego veći agregati makromolekula sa jakom tendencijom ka razdvajanju faza. Grubo rečeno, postoje četiri teorije o formiranju faznog sistema, kao i načina njegovog modelovanja sa termodinamičkog stanovišta:

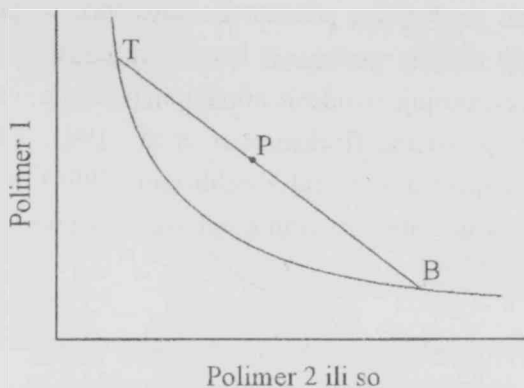
- a) Teorija osmotskih virijalnih jednačina, proistekla iz radova Edmond-a i Ogston-a (Edmond and Ogston, 1968, 1970), a zasnovana na dve teorije - McMillan-Mayer-ovoj (McMillan and Mayer, 1945) i Hill-ovoj (Hill, 1957, 1959), i u novije vreme ima svoju primenu (Gaube et al., 1993; Wu et al., 1998);
- b) Teorija rešetke, nastala na osnovu radova velikog broja istraživačkih grupa tridesetih i četrdesetih godina 20. veka, a osnova je Flory-Huggins-ove teorije (Flory, 1941, 1942; Huggins, 1942) i u novije vreme tzv. UNIQUAC modela (Kang and Sandler, 1987), našla je primenu i u radovima Hartounian-a et al. (1994a,b), Furuya-e et al. (1995) i Sargantanis-a and Karim-a (1997);

- c) Teorija integralne jednačine, proistekla iz savremenog i sveobuhvatnog pristupa Haynes-a et al. (1993);
- d) Dva različita modela, koja se ne mogu svrstati ni u jednu od prethodnih grupa, su teorija doprinosa grupa (Grossman et al., 1993), koja je svoju primenu našla u modelovanju ravnoteže u dvofaznim sistemima sastavljenim od polietilen glikola i dekstrana ili polietilen glikola i fosfata (Grossman and Maurer, 1995; Grossman et al., 1995a,b; Tintiger et al., 1997a,b), i teorija nedostupne zapremine (Guan et al., 1993).

Postojanje tolikog broja modela, koji sa svoje strane dobro opisuju eksperimentalno dobijene fazne dijagrame, ali ne omogućavaju i valjano predviđanje parametara raspodele, odraz je još uvek relativno slabog poznavanja i razumevanja tečnosti i tečnih smeša (Cabezas, 1996).

### 2.1.2. Fazni dijagram

Uobičajeni način predstavljanja vodenog dvofaznog sistema je fazni dijagram. Ovakav sistem je zapravo tercijalni, sastoji se od dva polimera (ili soli i polimera) i vode, ali se zbog jednostavnosti predstavlja kao dvokomponentni (Slika 1). Kriva u faznom dijagramu predstavlja tzv. binodalnu krivu, koja razdvaja heterogenu oblast od homogene; drugim rečima, ukoliko sistem sadrži polimere (ili polimer i so) u takvoj koncentraciji da je njegov sastav predstavljen tačkom iznad binodalne krive, doći će do formiranja dve faze. Dobijene faze se razlikuju po sastavu: u gornjoj fazi preovlađuje polimer 1, a u drugoj polimer 2 (ili so). Sistem prikazan na Slici 1 tačkom P ima gornju fazu čiji je sastav predstavljen tačkom T i donju fazu sastava B. Svi sistemi, čiji se sastavi nalaze na tzv. veznoj liniji T-B daju faze identičnog sastava, ali će se njihove zapremine razlikovati. Važno je naglasiti da je tzv. zapreminski odnos faza,  $V_t/V_b$ , kompleksna funkcija koncentracije polimera, ali i drugih parametara i može se proceniti iz faznog dijagrama. On je proporcionalan odnosu duži (P-B)/(T-P) pod pretpostavkom da se gustina faza ne razlikuje mnogo od 1 (g/ml).



Slika 1. Fazni dijagram dvofaznog sistema

### 2.1.3. Parametri koji karakterišu fenomen razdvajanja

Princip razdvajanja molekula i vodenim dvofaznim sistemima je nejednaka distribucija supstanci između dve faze. Veličina koja opisuje ovu pojavu je koeficijent raspodele,  $K$ , koji je definisan kao odnos koncentracija posmatrane supstance u gornjoj i donjoj fazi:

$$K = \frac{C_t}{C_b} \quad (1)$$

gde je  $C_t$  koncentracija supstance u gornjoj fazi,

$C_b$  koncentracija supstance u donjoj fazi.

Koeficijent raspodele predstavlja veličinu pouzdanu za prenošenje razmera iz manjih u veće prilikom projektovanja uređaja, tzv. "scale up" (Kroner et al., 1978) i, mada po teoriji ne zavisi od koncentracije posmatrane supstance (Kula, 1979), najnovija istraživanja su pokazala da to nije slučaj (Blazquez et al., 1998).

Koeficijent raspodele se može posmatrati kao suma nekoliko, manje ili više, nezavisnih parametara:

$$\ln K = \ln K_{el} + \ln K_{hfob} + \ln K_{hfil} + \ln K_{konf} + \ln K_{lig} \quad (2)$$

gde su  $K_{el}$ ,  $K_{hfob}$ ,  $K_{hfil}$ ,  $K_{konf}$  i  $K_{lig}$  redom koeficijenti raspodele, koji zavise od električnih, hidrofobnih, hidrofilnih, konformacionih i ligandnih efekata između sistema i supstance. Svakim od članova ovog zbira može se manipulisati u cilju

povećanja selektivnosti razdvajanja posmatrane supstance. U poslednje vreme se kao veoma atraktivna metoda povećanja koeficijenta raspodele preko njegove ligandne komponente primenjuje uvođenje afinitetnih liganada, vezanih za jedan od konstituenata dvofaznog sistema (Birkenmeier et al., 1991; Bhide et al., 1995; Garg et al., 1996, Kopperschlager and Kirchberger, 1996), a na ovaj način se omogućuje i potpuno razdvajanje izoenzima njihovom raspodelom u različite faze (Otto and Birkenmeier, 1993).

Važna veličina u razvijanju procesa u vodenim dvofaznim sistemima na industrijskom nivou je prinos jednog ekstrakcionog koraka. U slučaju da se proizvod želi dobiti razdvojen od ostalih jedinjenja koja imaju afinitet prema donjoj fazi, od značaja je njegov prinos u gornjoj fazi:

$$Y_t(\%) = \frac{100}{1 + \left(\frac{V_t}{V_b} K\right)^{-1}} \quad (3)$$

$Y_t$  određena je, kako koeficijentom raspodele, tako i odnosom zapremina, te se obe ove veličine moraju uzeti u obzir prilikom planiranja procesa (Andersson and Hahn-Hagerdal, 1990).

## 2.2. Faktori koji utiču na raspodelu u vodenim dvofaznim sistemima

Da bi se u dvofaznom sistemu postiglo željeno ili zadovoljavajuće razdvajanje i prinos u odabranoj fazi, neophodno je napraviti pravi izbor polimera (ili polimera i soli) od kojih je sistem sastavljen, molekulske mase polimera, koncentracije konstituenata sistema, vrste i koncentracije soli koje se dodaju u sistem, kao i pH vrednosti, zatim dužine veznih linija, odnosa zapremine faza i temperature, prilagodivši ih supstanci koja se želi izdvojiti, a uzimajući u obzir da raspodela zavisi i od njenih karakteristika - molekulske mase, naelektrisanja i hidrofilitnosti/ hidrofobnosti. Proizilazi, dakle, da će raspodela zavisiti od međusobnog uticaja supstance i dvofaznog sistema.

## 2.2.1. Karakteristike supstance koje utiču na raspodelu

### a) Molekulska masa

Andreasen (1994) je praćenjem raspodele dvadeset proteina u dva dvofazna sistema pokazalo je da je njihova molekulska masa bila u strogoj korelaciji sa odnosom koeficijenata raspodele.

Iz ovoga se može zaključiti da je koeficijent raspodele funkcija molekulske mase supstance, kako je i definisano Bronsted-ovom jednačinom:

$$\ln K = \frac{\lambda M}{kT} \quad (4)$$

gde je  $M$  molekulska masa supstance,

$k$  Bolcmanova konstanta,

$T$  apsolutna temperatura,

$\lambda$  parametar koji karakteriše fazni sistem i interakcije supstance.

Bez obzira što se  $K$  ne može izračunati iz prethodne jednačine, jer se vrednosti  $\lambda$  u višefaznim sistemima ne znaju, iz nje se mogu izvesti neki generalni zaključci o uticaju molekulske mase na koeficijent raspodele. Za velike vrednosti  $M$  samo male promene vrednosti  $\lambda$  imaće veliki uticaj na  $K$ . Za velike molekule i čestice, kao što su ćelije, fage i DNA koeficijent raspodele se kreće u rasponu od 0.001 do 100, za proteine uglavnom varira u rasponu 0.1 i 1.0, dok je njegova vrednost za male jone oko 1 (Albertsson, 1986).

### b) Naelektrisanje i hidrofobnost/hidrofilnost

Naelektrisanje supstance nije karakteristika sama po sebi, već zavisi i od uslova koji vladaju u njenom okruženju. Npr. naelektrisanje proteina određeno je njegovom primarnom strukturom (tj. izoelektričnom tačkom), ali i sredinom u kojoj se nalazi, te stoga nije nezavisna promenljiva. Tako je nemoguće razlučiti do koje mere će naelektrisanje, kao karakteristika proteina, uticati na fenomen raspodele, a da u to ne bude uključen i uticaj sastava sistema. Isto važi i za hidrofilnost/hidrofobnost proteina, koja je relativan pojam, a opšte zaključke je

gotovo nemoguće izvući, jer se uticaji naelektrisanja, hidrofobnosti i hidrofилности međusobno prepliću (Eiteman, 1995a).

Ipak, ispitivanje ponašanja dva genetskim inženjeringom modifikovana lizozima iz *Escherichia coli* u dvofaznom sistemu, koja su nosila jednako ukupno naelektrisanje, ali različite polarnosti, je ukazalo na njihove različite koeficijente raspodele (Fan et al., 1998).

Istražujući uticaj hidrofobnosti proteina na raspodelu, Hagarova and Breirer (1995) su, u sistemu polietilen glikol-dekstran, zaključili da njihov afinitet prema donjoj, dekstranom bogatoj fazi raste sa porastom koncentracije dekstrana i smanjenjem koncentracije polietilen glikola. Hemijskom modifikacijom primarnih amino grupa jednog od proteina 2,4,6-trinitrobenzen sulfonskom kiselinom povećan je njegov afinitet prema manje polarnoj polietilenom bogatoj fazi. Takođe, genetskim inženjeringom omogućeno uvođenje dva tetrapeptida, različite hidrofobnosti, u protein pokazalo je snažan uticaj na njegovu raspodelu u dvofaznom sistemu (Hassinen et al., 1994).

U vezi sa ovim je i zapažanje da nativni i denaturisani biomolekuli pokazuju različito ponašanje prilikom raspodele u dvofaznim sistemima, ne samo usled promene same konformacije, već i zbog izlaganja prethodno sakrivenih funkcionalnih grupa koje mogu uticati na hidrofилnost (Albertsson, 1970).

### 2.2.2. Karakteristike sistema koje utiču na raspodelu

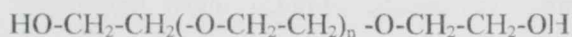
Najvažnije momente u izboru dvofaznog sistema predstavljaju odgovori na pitanja u kom sistemu i pod kojim uslovima se raspodela može izvršiti sa željenim ishodom, da li fizičke osobine sistema omogućavaju brzo i lako razdvajanje faza i, ako postoji potreba, na koji način se supstanca kasnije može izolovati iz jedne od faza, kao i kakva je zakonska regulativa u pogledu primene supstanci razdvojenih u odabranom sistemu.

U literaturi se od polimera, kako prirodnih, tako i sintetičkih, koji se koriste u dvofaznim sistemima, uglavnom pominju polietilen glikol i dekstran, kao i derivati skroba, a u poslednje vreme i novi kopolimer etilen i propilen oksida (Planas et al., 1996), polietilen imin (Kwon et al., 1996), polivinil alkohol

(Persson et al., 1989), derivati celuloze (Johansson et al., 1997), pululan (Nguyen et al., 1988), maltodekstrini (Szlag and Guiliano, 1988), alginati i kazeinati (Pacek et al., 2000), agarozna (Medin and Janson, 1993), prirodne gurne (Sarubbo et al., 2000), pa i čak i pektin u kombinaciji sa mlekom (Macašek et al., 1998). U slučaju dvofaznog sistema tipa polimer - so, najčešće se koriste soli poput  $MgSO_4$ ,  $Na_2SO_4$ ,  $(NH_4)_2SO_4$  i  $K_2HPO_4$ , mada se pominju i sistemi sa natrijum citratom (Eiteman, 1995b; Marcos et al., 1998). Nov dvofazni sistem sastavljen od smeše katjonskih i anjonskih površinski aktivnih materija primenili su Tong et al. (1997) za razdvajanje jedinjenja porfirina.

Bez obzira na mnoštvo jedinjenja koja mogu činiti dvofazni vodeni sistem, čini se da su u svetlu već spomenutih pitanja od interesa prilikom izbora sistema, odnosno polimera, najpogodniji upravo najčešće spominjani polietilen glikol i dekstran.

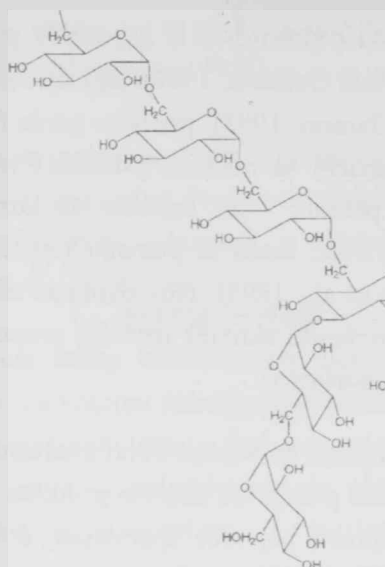
Polietilen glikol je linearni sintetički polimer (Slika 2), čija se molekulska masa kreće u opsegu 200-40000. Detaljno je testiran za primenu u farmaceutске svrhe i uključen je u farmakopeje većine zemalja. U SAD je od 1973. godine dozvoljena njegova upotreba u prehrambenim proizvodima.



Slika 2. Formula polietilen glikola

Dekstran je prirodni polimer, koji proizvodi bakterija mlečno-kiselog vrenja *Leuconostoc mesenteroides*. Sastavljen je od jedinica glukoze, povezanih  $\alpha$ -1,6-glikozidnim vezama, dok vrsta veze na mestima grananja može biti tipa  $\alpha$ -1,2-,  $\alpha$ -1,3- ili  $\alpha$ -1,4 (Slika 3).

U odnosu na dekstran, polietilen glikol ima hidrofobniji karakter (Albertsson, 1986).



Slika 3. Formula dekstrana

#### a) Molekulska masa polimera

Koeficijent raspodele neke supstance može zavisiti od molekulske mase polimera. U literaturi je najbolje obrađen uticaj molekulske mase dva, već spomenuta kao najčešće korišćena, polimera - polietilen glikola i dekstrana.

Ukoliko je npr. potrebno povećati vrednost koeficijenta raspodele u dvofaznom sistemu sa polietilen glikolom, najbolji rezultati se mogu očekivati smanjenjem njegove molekulske mase. Ovaj zaključak se može smatrati i generalnim s obzirom da je potvrđen u ekperimentima raspodele pululanaze, 1,4- $\alpha$ -glukan fosforilaze, i leucil-tRNA-sintetaze (Kula, 1979),  $\beta$ -glukozidaze (Tjerneld et al., 1985; Nguyen et al., 1988; Persson et al., 1989), endo- $\beta$ -glukanaze (Tjerneld et al., 1985; Nguyen et al., 1988), glukoamilaze (Hayashida et al., 1990), alkalne proteaze (Hotha and Banik, 1997),  $\beta$ -galaktolaktaze (Nguyen et al., 1988; Gonzalez et al., 1990),  $\beta$ -amilaze i glukoamilaze (Furuya et al., 1995), pa i kulture ćelija *Nicotinia tabacum* i *Lavandula vera* (Ilieva et al., 1995). Isti efekt je smanjenje molekulske mase ovog polimera imalo na koeficijent raspodele lipozoma, bez obzira na njihovo naelektrisanje (Moldavski and Kohen, 1996). Naime, sa smanjenjem molekulske mase polietilen glikola raste njegov hidrofilni karakter, pa se može očekivati veća



tendencija jedinjenja poput proteina i ćelija hidrofилne površine ka fazi koja, zbog dovoljne količine rastvarača (vode), može da omogući dobru solubilizaciju (Kim, 1986). Međutim, prilikom planiranja dvofaznih sistema za kultivaciju treba biti oprezan sa granicom do koje se može smanjiti molekulska masa ovog polimera, jer se pokazalo da pritom može doći do smanjenja, pa i snažne inhibicije ćelijskog rasta (Umakoshi et al., 1996).

Istraživanja raspodele proteina, koja su izveli Albertsson et al. (1987), pokazala su da polimeri donje faze visokih molekulskih masa favorizuju njihovu preraspodelu u gornju fazu, što je u sistemima sa dekstranom kao polimerom donje faze i potvrđeno na konkretnim primerima više enzima:  $\beta$ -glukozidaze (Tjerneld et al., 1985; Persson et al., 1989), endo- $\beta$ -glukanaze (Tjerneld et al., 1985), celulaze (Persson et al., 1991), izoleucil-tRNA sintetaze i  $\alpha$ -glukozidaze (Kula, 1979),  $\beta$ -amilaze (Furuya et al., 1995). Izuzetak je  $\beta$ -glukoamilaza jer je koeficijent raspodele ovog enzima opadao sa povećanjem molekulske mase dekstrana (Hayashida et al., 1990).

Proizilazi, dakle, da se generalni zaključak, kao u slučaju polietilen glikola ne može izvesti, ali ono, što se kao opšte može reći, je da molekulska masa dekstrana ima značajniji uticaj na raspodelu u oblasti njenih nižih vrednosti (Kula, 1979; Hayashida et al., 1990). Ovo se može smatrati povoljnom okolnošću ako se u eksperimentima raspodele koriste dekstrani molekulskih masa jednakih ili većih od  $10^5$ , kao što je to slučaj kod većine enzima, jer se takav skup frakcionisan dekstran, uske raspodele molekulskih masa, može se zaminiti znatno jeftinijim sirovim dekstranom (Kula, 1979; Tjerneld et al., 1985; Venancio et al., 1996). Visoka vrednost viskoziteta rastvora sirovog dekstrana može prerasti u prednost zbog bržeg razdvajanja faza, a koncentracije pri kojima sirovi dekstran stvara dvofazni sistem su niže od onih za frakcionisane dekstrane (Tjerneld et al., 1985). Što se tiče uticaja molekulskih masa dekstrana na raspodelu kulture ćelija, za *Nicotinia tabacum* i *Lavandula vera* je nađeno da njeno smanjenje povećava afinitet ćelija prema gornjoj fazi (Ilieva et al., 1995).

*b) Koncentracija konstituenata faznog sistema, dužina veznih linija i zapreminski odnos*

Smanjenjem koncentracije polietilen glikola i dekstrana, bilo je moguće povećati koeficijent raspodele za  $\alpha$ -glukozidazu (Kroner and Kula, 1978) i glukoamilazu (Hayashida et al., 1990), mada je efekt smanjenja koncentracije dekstrana na raspodelu manji od onog koji nastaje smanjenjem koncentracije polietilen glikola (Kroner and Kula, 1978; Kula, 1979; Hayashida et al., 1990). Sličan efekt na raspodelu ćelija biljnog tkiva imalo je smanjenje koncentracije polietilen glikola, ali je uticaj koncentracije dekstrana bio obrnut (Ilieva et al., 1995). Iz ovoga se može zaključiti da je poželjno da koncentracija polimera bude što je moguće niža, a da pritom ipak omogući stvaranje dvofaznog sistema. Ovo je bitno i zbog ekonomskih razloga. Međutim, pri izboru optimalne koncentracija polimera, koja nije samo funkcija koeficijenta raspodele, nego i prinosa u jednoj od faza, mora se voditi računa i o zapreminskom odnosu kao zavisno promenljivoj veličini (Andersson and Hahn-Hagerdal, 1990).

U tesnoj povezanosti sa koncentracijom konstituenata faznog sistema je i dužina veznih linija (Slika 1), te su slični njihovi uticaji na raspodelu. Tako se može reći da povećanje dužine veznih linija vodi smanjenju koeficijenta raspodele više enzima (Cole, 1993; Furuya et al., 1995, 1996; Hotha and Banik, 1997), a takođe inhibira rast bakterijskih ćelija u dvofaznom sistemu (Umakoshi et al., 1996). Ovo se objašnjava činjenicom da povećanjem dužine ovih linija raste i međupovršinski napon (Albertsson, 1986) i hidrofobnost (Umakoshi et al., 1996).

Dvofazni sistemi, čiji se sastavi nalaze na istoj veznoj liniji imaju faze jednakog sastava, ali različitih zapremina. Ispitivanje uticaja zapreminskog odnosa duž istih veznih linija je pokazalo da ova veličina ima negativan uticaj na koeficijent raspodele (Hotha and Banik, 1997). Osim koeficijenta raspodele i prinosa enzima, zapreminski odnos menja i stepen prečišćenosti enzima, a veličina ovih promena je u funkciji dužine veznih linija i prisustva soli u sistemu (Marcos et al., 1998).

### *c) Vrsta i koncentracija jona i pH vodenog dvofaznog sistema*

Utvrđeno je da u mnogim faznim sistemima jonski sastav ima veliki uticaj na raspodelu supstanci (Andersson et al., 1985; Andreasen, 1994; Kroner and Kula, 1978; Umakoshi et al., 1996), a u novije vreme postoje pokušaji da se on i predvidi kroz opšti model sistem za sve elektrolite (Pfffenig et al., 1998). Ovaj uticaj obično se pripisuje stvaranju elektrostatičkog potencijala u prisustvu soli, usled različitih koeficijenata raspodele jona suprotnog naelektrisanja (Albertsson, 1986), ali i delovanju jona na intermolekulske sile između supstance i molekula polimera (Abbott et al., 1990). Ustanovljeno je da soli utiču na ravnotežnu koncentraciju polimera u fazama, i da, prisutni u dovoljnoj koncentraciji, menjaju nagib veznih linija (Zaslavsky et al., 1988), što je potvrđeno i korišćenjem novih metoda kolonske hromatografije (Planas et al., 1997), a takođe i da menjaju zapreminski odnos faza (Kwon et al., 1996). Uglavnom je odnos između različitih jona taj, koji utiče na raspodelu, mada od značaja može biti i koncentracija neke od soli (Albertsson, 1986). Pri tome će uticaj pojedinih soli na raspodelu proteina zavisi i od naelektrisanja proteina u datom sistemu, određenog pH vrednošću sistema, odnosno izoelektričnom tačkom proteina. Generalno se može reći da sulfati i fosfati povećavaju, a hloridi i nitrati smanjuju koeficijent raspodele proteina koji nose negativno naelektrisanje, dok je za pozitivno naelektrisane proteine situacije obrnuta (Albertsson, 1986). U blizini izoelektrične tačke proteina efekat jona je minimalan (Albertsson, 1970).

Soli koje se u literaturi o dvofaznim sistemima najčešće ispituju su sulfati i hloridi (Albertsson, 1986; Kuboi et al., 1995; Umakoshi et al., 1996; Gunduz and Korkmaz, 2000), dok se uticaj fosfata često opisuje kao dramatičan (Pfffenig et al., 1998). Kao što je poznato, disocijacija polivalentnih anjona zavisi od pH, što za sobom kao posledicu ima i različite koeficijente raspodele na različitim pH vrednostima. Ovo je posebno izraženo u slučaju fosfata, čiji monovalentni jon ima koeficijent raspodele 0.96, dok je K dvovalentnog jona 0.74 u sistemu polietilen glikol - dekstran (Johansson, 1970). Stoga se na pH vrednostima iznad 7.0 stvara veliki međufazni potencijal - donja faza postaje negativno naelektrisana, pa se proteini čija je izoelektrična tačka ispod pH 7.0, većim delom raspodeljuju u gornjoj fazi. Povećani koeficijenti raspodele su sa povećanjem koncentracije fosfata dobijeni za enzime (Andersson et al., 1985; Hustedt et al., 1978; Kroner

and Kula, 1978), negativno naelektrisane lipozorne (Moldavski and Cohen, 1996) i visoko vredne rekombinantne proteine (Umakoshi et al., 1996).

U vezi sa ovim je i uticaj pH na raspodelu supstanci u dvofaznim sistemima. Na primerima nekoliko enzima pokazano je da povećanje pH u prisustvu fosfatnog pufera izaziva značajan porast koeficijenta raspodele u polimernim dvofaznim sistemima (Hustedt et al., 1978; Kula, 1979), dok isto nije imalo uticaja u prisustvu TRIS pufera (Hustedt et al., 1978). Međutim, nestabilnost većine enzima na povišenim pH vrednostima čini da ovaj način povećanja efikasnosti raspodele ima svojih ograničenja. Zavisnost koeficijenta raspodele od pH pruža mogućnost razdvajanja proteina iz prirodnih izvora u kojima su oni prisutni u obliku kompleksnih smeša, npr. proteina belanceta primenom protivstrujne ekstrakcije u dvofaznom sistemu (Shibusawa et al., 1998).

Efekt pH na raspodelu ćelija u dvofaznim sistemima, zasnovan na različitim karakteristikama njihovih površina i intenzitetu interakcija sa komponentama sistema, je primenjen na razdvajanje ćelija različitih sojeva *Chlorella* (Burczyk and Hyrc, 1992), kao i patogenih bakterija izolovanih iz hrane (Pedersen et al., 1998).

### **2.3. Primena vodenih dvofaznih sistema**

Vodeni dvofazni sistemi su kao efikasna i moderna separaciona tehnika našli široku primenu ne samo u fundamentalnoj i primenjenoj biohemiji, već i u mnogim drugim granama nauke. Generalno, vodeni dvofazni sistemi se primenjuju u analitičke svrhe, za razdvajanje proteina, celova ćelija i celih ćelija i kao pogodna sredina za odvijanje procesa enzimske i mikrobiološke konverzije.

#### **2.3.1. Analitička primena**

Raspodela u vodenim dvofaznim sistemima primenjena za analitičke svrhe se može smatrati tehnikom komplementarnom tehnikama centrifugiranja i elektroforeze. Mattiasson and Ling (1980) su uveli tzv. PALA (Partition Affinity Ligand Assay) analitičku tehniku za razdvajanje komponenata u analizi. U novije vreme vodeni dvofazni sistemi se koriste za uklanjanje inhibitora iz uzoraka za analizu PCR (Polymerase Chain Reaction) tehnikom (Lantz et al., 1997). U

literaturi je takode opisana metoda ekstrakcije hema i tri porfirinska reagensa od analitičkog interesa u vodenom dvofaznom sistemu, sastavljenom od smeše katjonskih i anjonskih površinski aktivnih materija (Tong et al., 1997).

### 2.3.2. Primena u razdvajanju proteina, delova ćelija i samih ćelija

Ekstrakcija i prečišćavanje intracelularnih proteina mikrobiološkog porekla zasnovani na raspodeli u vodenim dvofaznim sistemima se u praksi pokazalo kao moćna tehnika koja daje visoke prinose i pruža mogućnost izvođenja sa velikim kapacitetom, uz relativno lako i precizno prenošenje parametara koji ga karakterišu u veće razmere (Kroner and Kula, 1978; Kroner et al., 1978; Hustedt et al., 1978; Hustedt et al., 1988). Na ovaj način je izvršena separacija i prečišćavanje mnogobrojnih intracelularnih enzima (Kroner and Kula, 1978; Kroner et al., 1978; Hustedt et al., 1978; Hustedt et al., 1988; Gonzalez et al., 1990; Venancio et al., 1996; Marcos et al., 1998; Rito-Palomares and Lyddiatt, 1996). Nužna pretpostavka za ostvarenje ovog je odabir takvog dvofaznog sistema koji će omogućiti razdvajanje ostataka ćelija od proteina njihovom raspodelom u suprotne faze. S obzirom na svoju veličinu, ćelije i njihovi ostaci se raspodele u jednoj od faza, obično u donjoj, te je za visok prinos enzima potrebno postići dobar kompromis između koeficijenta raspodele i zapreminskog odnosa faza. Pri ovome treba voditi računa o uticaju ćelija i njihovih ostataka na koeficijent raspodele i na promenu uslova formiranja dvofaznog sistema (Gonzalez et al., 1990; Rito-Palomares and Lyddiatt, 1996; Rito-Palomares and Cueto, 2000).

U slučajevima kada je potrebno postići selektivnije razdvajanje proteina, npr. za njihovu primenu u kliničkim i dijagnostičkim ispitivanjima ili za primenu u prehrambenoj industriji, koristi se metoda tzv. afinitetne raspodele (Bhide et al., 1995; Otto and Birkenmeier, 1993; Kopperschlager and Kirchberger, 1996; Ekblad et al., 2000; Estela Da Silva and Teixeira Franco, 2000).

Osim za prečišćavanje intracelularnih enzima, vodeni dvofazni sistemi se koriste i za razdvajanje i prečišćavanje proteina iz prirodnih kompleksnih smeša (Cole, 1993; Shibusawa et al., 1998; Isgrove et al., 1998), kao i za razdvajanje rekombinantnih fuzionih peptida tokom fundamentalnih medicinskih istraživanja (Pulliam et al., 1997).

Princip razdvajanja ćelija ili delova ćelija zasnovan je na različitim fizičko-hemijskim osobinama njihove površine i interakcijama sa polimerima iz sistema, a pokazao se kao veoma koristan u slučajevima kada konvencionalne tehnike razdvajanja ne pokazuju dovoljnu selektivnost ili kada je potrebno brzo izvršiti separaciju. Tako su vodeni dvofazni sistemi našli primenu u fundamentalnim istraživanjima, npr. plazma membrana cijanobakterija (Norling et al., 1997), kulture ćelija sisara (Morre and Morre, 2000), zatim za identifikaciju, nakon raspodele, sličnih vrsta algi, koje je teško razlikovati s obzirom na nedostatak morfoloških markera na njihovoj površini (Burczyk and Hyrc, 1992) i kao praktična metoda izdvajanja i razdvajanja patogenih bakterija iz hrane (Pedersen et al., 1998).

### 2.3.3. Biološke konverzije u voderim dvofaznim sistemima

Vodeni dvofazni sistemi su se pokazali kao pogodan medijum za procese enzimskih i mikrobioloških konverzija, koji se u literaturi često nazivaju i ekstraktivnim biokonverzijama. Prvi zadatak u postavljanju ovakve konverzije je razdvojiti proizvod od biokatalizatora njihovom raspodelom u različite faze sistema. Uprkos postojanju mnogobrojnih, već navedenih, teorijskih modela, praktičan model za predviđanje raspodele biokatalizatora i proizvoda zapravo još uvek ne postoji. Nadalje, stvari se komplikuju činjenicom da se raspodela biokatalizatora, proizvoda, pa i samih konstituenata dvofaznog sistema može menjati u toku procesa biokonverzije, s obzirom da biomasa i metaboliti menjaju sastav faza (Planas et al., 1997).

Prednosti ekstraktivnih biokonverzija su u mogućnostima povećanja prinosa i produktivnosti u odnosu na konvencionalne ekstrakcije (Zijlstra et al., 1998) i lakog projektovanja u industrijskim razmerama (Andersson and Hahn-Hagerdal, 1990). Povećanje prinosa je moguće postići smanjenjem inhibicije proizvodom usled njegovog uklanjanja neposredno po nastanku (Kim and Weigand, 1992) ili sprečavanjem njegovog raspadanja, skraćivanjem vremena boravka u blizini biokatalizatora (Kaul and Mattiasson, 1986). Može se reći da su ovakve tehnike neophodne u slučajevima stvaranja veoma toksičnih ili nestabilnih proizvoda (Kasche and Galunsky, 1995). Dalje, ekstraktivne biokonverzije pružaju mogućnost kontinualnog izvođenja operacije uz zadržavanje i ponovnu upotrebu biokatalizatora, čime se takođe značajno povećava ukupna produktivnost. Integracijom delova procesa u kom se izvodi biokonverzija i

izdvajanje i prečišćavanje proizvoda smanjuje se broj koraka u operacijama njegovog dobijanja (Zijlstra et al., 1998).

S obzirom da je odabrani vodeni dvofazni sistem sa odgovarajućom raspodelom biokatalizatora praktično idealan i takav samo na početku procesa, velike su šanse da se ne dobije očekivana raspodela proizvoda. Ovo se u slučaju nepovoljnog razvoja događaja može prevazići dodatkom specifičnih ekstraktanata u sistem, kakvi su npr. afinitetni ligandi povezani sa polimerima (Kopperschlager and Birkenmeier, 1990) ili modifikacijom proizvoda u smislu koji će poboljšati njegovu raspodelu (Carlsson et al., 1996).

#### *a) Enzimske biokonverzije*

Već je rečeno da je osnovni uslov za efikasnu biokonverziju u vodenim dvofaznim sistemima potpuna separacija biokatalizatora, u ovom slučaju enzima, i proizvoda u različite faze. Na taj način enzim se može zadržati i ponovo koristiti recikliranjem faze u kojoj se nalazi. Međutim, raspodela enzima, kao i većine makromolekula, nije jednostrana, pa tokom kontinualnih procesa može doći do njihovog ispiranja iz reaktora. Ovaj nedostatak se može otkloniti korišćenjem imobilizovanih enzima (Kasche and Galunsky, 1995; Hernandez-Justiz et al., 1998) ili enzima kovalentno vezanih za polietilen glikol (Mukataka et al., 1992) ili dekstran (Kitano et al., 1996).

Generalno, polimeri mogu uticati na proteine na dva načina - direktno, dakle, interakcijom između polimera i proteina, i indirektno preko interakcije između polimera i vode. Sa svoje strane, voda utiče na aktivnost enzima na konformacionom, reakcionom i difuzionom novou (Andersson and Hahn-Hagerdal, 1990). Pokazalo se da polimeri dvofaznih sistema ne utiču značajno na specifične aktivnosti enzima, dok efekti na enzimsku stabilnost variraju od blago pozitivnih do isto tako neznatno negativnih (Zijlstra et al., 1998).

Tipični proizvodi enzimske biokonverzije u vodenim dvofaznim sistemima su šećeri, dobijeni hidrolizom prirodnih supstrata kao što su škrob (Larsson and Mattiasson, 1988; Hayashida et al., 1990; Liakopoulou-Kyriakides et al., 1996; Karakatsanis et al., 1997), celuloza (Tjerneld et al., 1985) i laktoza (Nguyen et al., 1988), lako degradabilni proizvodi, poput antibiotika (Kasche and Galunsky, 1995; Hernandez-Justiz et al., 1998) i njihovih prekursora (Andersson et al.,

1984) i steroidni hormoni (Kaul and Mattiasson, 1986). Vodeni dvofazni sistemi su se pokazali i kao pogodan medijum za organske sinteze katalizovane enzimima (Kitano et al., 1996).

### *b) Mikrobiološke biokonverzije*

Pored već spomenutog momenta, koji važi za enzimске biokonverzije (separacija biokatalizatora od proizvoda njihovom raspodelom u suprotne faze), sledeći neophodan uslov koji mora biti zadovoljen da bi mikrobiološka konverzija u dvofaznom sistemu, ili kako se u literaturi često naziva ekstraktivna kultivacija, imala smisla je stvaranje takvih uslova, koji će omogućiti rast ćelija i proizvodnju enzima, po aktivnosti i stabilnosti sličnih onih u homogenom medijumu. O karakteristikama enzima u dvofaznom sistemu je već bilo reči, te sledi kratak osvrt na uticaj faznog sistema na rast ćelija.

Kultivacija ćelija je ostvarena u dvofaznim sistemima sastavljenim od neutralnih polimera, polimera sa jonskim grupama i polimera i soli. Pokazalo se da vodeni dvofazni sistemi mogu menjati površinu ćelije kroz direktnu interakciju između polimera i ćelijske membrane (zida). Tako se zna da polietilen glikol narušava strukturu membrane, što za posledicu ima njenu povećanu permeabilnost prema jonima; on takođe smanjuje, mada u minimalnom iznosu, aktivitet vode, što može uticati na kinetiku i energetski bilans bakterijskog rasta usled tzv. fiziološkog stresa ćelije; uticaj polietilen glikola na polarnost rastvora očituje se u smanjenju ove osobine. Prenos kiseonika je u vodenim dvofaznim sistemima veličina uslovljena prisustvom polimera i to kroz promene u površinskom naponu i viskozitetu. Kakav će zbirni uticaj svih ovih efekata na ćeliju, sa svojim individualnim karakteristikama, biti, gotovo je nemoguće predvideti (Andersson and Hahn-Hagerdal, 1990). Bakterijski i fungalni rast pri umerenim koncentracijama neutralnih polimera jedva da je različit od onog u medijumu bez polimera, do trenutka kada transport kiseonika postane ograničavajući faktor zbog povećanog viskoziteta medijuma (Zijlstra et al. 1998). Takođe je primećeno da može doći do inhibiranja bakterijskog rasta sa povećanjem dužine veznih linija i zapreminskog odnosa faza, kao i u prisustvu polietilen glikola niskih molekulskih masa u medijumu za kultivaciju (Kuboi et al., 1995; Umakoshi et al., 1996).



Polimeri sa jonskim grupama u sistemu za ekstraktivnu kultivaciju bakterija mlečno-kiselog vrenja otvorili su mogućnost poboljšanja raspodele proizvoda, a inhibitorni efekt ovakvih polimera bio je prevaziđen prethodnom adaptacijom ćelija (Kwon et al., 1996).

Proizvodi mikrobioloških konverzija u vodenim dvofaznim sistemima su jedinjenja malih molekulske masa, kao npr. aceton, butanol i etanol (Kim and Weigand, 1992), mlečna kiselina (Planas et al., 1996,1997; Kwon et al., 1996; Min et al., 1998) i vodonik (Taguchi et al., 1996), ali i jedinjenja velikih molekulske masa, kakvi su enzimi (Andersson et al., 1985; Nguyen et al., 1988; Persson et al., 1989,1991; Chen and Lee, 1995; Hotha and Bank, 1997).

Zanimljiv pristup izolovanju i prečišćavanju intracelularnih enzima i visoko vrednih rekombinantnih proteina predstavili su Kuboi et al. (1995) i Umakoshi et al. (1996) tzv. integrisanjem procesa kultivacije, razbijanja ćelija i ekstrakcije proizvoda u dvofaznom medijumu.

Treba reći da je izvedena kultivacija i ćelija biljnih kultura u dvofaznom medijumu uz proizvodnju enzima (Ilieva et al., 1995,1996), koja se u širem kontekstu može smatrati ekstraktivnom biokonverzijom.

#### 2.3.4. Ostale primene

Vodeni dvofazni sistemi mogu biti veoma korisni i u farmaceutskoj industriji sa tehnološke tačke gledišta; naime, pomoću njih se iz preparata lipozoma, uz dobro odabrane uslove, može ukloniti višak aktivne supstance, koja nije ušla u sastav lipozoma (Moldavski and Cohen, 1996).

Vodeni dvofazni sistemi novog sastava su našli primenu i u toksikologiji: dodatkom pektina u mleko moguće je formirati interesantan dvofazni sistem, koji omogućava da se iz mleka, pod nedenaturišućim uslovima, izdvoje teški metali (Macašek et al., 1998).



### 2.3.5. Način izvođenja operacija u vodenim dvofaznim sistemima

Mogućnosti izvođenja procesa raspodele u vodenom dvofaznom sistemu su veoma široke i kreću se u granicama od jednostavnog šaržnog do potpuno kontinualnog, sa recirkulacijom biokatalizatora i polimera.

Pregledom literature stiče se utisak da se operacije u ovakvim sistemima najčešće izvode kao šaržne (Chen and Lee, 1995; Kwon et al., 1996; Liakopoulou-Kyriakides et al., 1996), pri čemu je prednost ovakvog izvođenja u njegovoj jednostavnosti. Naime, kada se na laboratorijskom nivou odabere fazni sistem koji omogućava željenu raspodelu supstanci i odgovarajuću stabilnost i aktivnost biokatalizatora, proces je lako preneti u veće razmere za npr. konvencionalne reaktore sa mešanjem. Proizvod se dobija jednostavnim odvajanjem faze u kojoj se nalazi nakon njene separacije stajanjem ili centrifugiranjem (Kula, 1979; Albertsson, 1970; Hustedt et al., 1988; Solano-Castillo and Rito-Palomares, 2000). Nedostaci ovakvog načina vođenja procesa se očituju u niskim prinosima prilikom dobijanja proizvoda malih molekularnih masa ili proizvoda koji se ravnomerno raspodeljuju između faza, kao i u slučaju dobijanja nedovoljno stabilnih proizvoda s obzirom da proizvod ostaje u reakcionoj smeši onoliko koliko traje šaržni proces. I konačno, a što je naročito važno za procese mikrobioloških degradacija, ukupna produktivnost procesa je znatno manja od one koja se postiže u kontinualnim procesima (Zijlstra et al., 1998).

Kontinualni procesi sa recirkulacijom biokatalizatora i polimera (Taguchi et al., 1996; Hayashida et al., 1990) mogu kompenzovati većinu navedenih nedostataka, ali su zato znatno komplikovaniji za izvođenje i zahtevniji po pitanju opreme. Prednosti recirkulacije biokatalizatora u ovakvim procesima su ekonomske, zbog njegovog ponovnog korišćenja, povećanja efikasnosti izražene kroz prinos po jedinici biokatalizatora i dobijanju faze koja sadrži samo proizvod. U slučaju mikrobioloških konverzija recirkulacija biokatalizatora omogućava visoku koncentraciju ćelija, uštedu u supstratu manje otpadnih materija. Treba, međutim, imati u vidu kako recirkulacija utiče na aktivnost i stabilnost biokatalizatora, uzimajući u obzir i same troškove njenog izvođenja (Andersson and Hahn-Hagerdal, 1990). Recirkulacija polimera u kontinualnom sistemu ima minimalan uticaj na stabilnost i produktivnost procesa ukoliko je broj ponavljanja ciklusa ograničen na pet (Rito-Palomares and Lyddiatt, 1996).

Izbor, stoga, često pada na ponovljene ekstraktivne šaržne procese kao optimalan izbor, u kojima se faza koja sadrži proizvod s vremena na vreme zamenjuje novom (Andersson et al., 1985; Tjerneld et al., 1985; Persson et al., 1991; Planas et al., 1996, 1997; Kuboi et al., 1995; Umakoshi et al., 1996).

## **2.4. Fungalne pektinaze**

Pektinaze su enzimi koji razgrađuju pektinske materije različitim mehanizmima. Njih proizvode, kako plesni, tako i bakterije i kvasci (Fogarty and Kelly, 1983), ali su upravo fungalne pektinaze te koje imaju najveću primenu u industriji. Ovi enzimi su značajni i kao sastavni deo kompleksa enzima koji razgrađuju ćelijski zid biljaka tokom procesa biljne patogeneze.

### **2.4.1. Klasifikacija enzima koji razgrađuju pektinske materije**

Enzimi koji razgrađuju pektinske materije se dele u tri grupe i to deesterifikacione, depolimerizacione i protopektinaze. Unutar grupe depolimerizacionih pektinaza kriterijum za dalju podelu predstavlja supstrat na koji deluju sa najvećim afinitetom, mehanizam delovanja, koji može biti hidrolitički ili transeliminativan, i mesto veze u molekulu pektinske supstance, na koju enzim deluje, te tako postoji endo odnosno egzo tip enzima. U Tabeli 1 data je klasifikacija ovih enzima.

### **2.4.2. Sinteza i sekrecija fungalnih pektinaza**

Regulatorni mehanizmi, koji upravljaju sintezom i sekrecijom fungalnih pektinaza još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni, dok je karakterisanje ovih enzima kao konstitutivnih, delimično induktivnih ili induktivnih otežano zbog preplitanja efekata indukcije i kataboličke represije, kao i u slučajevima mnogih mikrobioloških enzima (Priest, 1983). Stvari se nadalje komplikuju usled još uvek nedovoljno definisane strukture pektina, kao i zbog uticaja različitih tehnika kultivacije na regulatorne fenomene sinteze i sekrecije pektinaza, mada ne treba zaboraviti i uticaj specifičnosti svake fungalne vrste.

Ipak, može se reći da mehanizmi regulacije sinteze ovih enzima kod plesni uključuju indukciju polimernim pektinskim materijama i podlozi, kao i monomerima od kojih su sastavljene (Keen and Horton, 1966; Aguilar and

Hutron, 1987; Polizeli et al., 1991; Pardo i sar., 1991; Fraissinet-Tachet and Fevre, 1996; Guevara et al., 1997; Kapat et al., 1998; Levin and Forchiassin, 1998; Yakoby et al., 2000), ali i regulaciju mehanizmima kataboličke represije (Keen and Horton, 1966; Aguilar and Huitron, 1987; Polizeli et al., 1991; Fraissinet-Tachet and Fevre, 1996; Guevara et al., 1997; Taragano et al., 1997; Levin and Forchiassin, 1998). Represija sinteze pektinaza proizvodom takode je jedan od mehanizama regulacije (Aguilar and Huitron, 1986; Solis et al., 1990), a da li će krajnji proizvod razgradnje pektina delovati kao inducer ili represor zavisi od njegove koncentracije i vremena dodavanja u medijum (Aguilar and Huitron, 1987).

Ispitivanja regulatornih mehanizama sinteze i sekrecije pektinaza kod fungi na molekularnom nivou ukazala su na mogućnost da se katabolička represija reguliše na nivou translacije (Shinmyo et al., 1978; Maldonado et al., 1989), te da se može poništiti dodatkom cAMP-a u medijum (Angelova et al., 1987; Baracat-Pereira et al., 1999), a da je indukcija regulisana na nivou transkripcije (Maldonado et al., 1989, 1994; Whitehead et al., 1995), pri čemu se smatra da je indukcija različitih tipova pektinaza nezavisno kontrolisana (Fonseca and Said, 1995).

Maksimalne aktivnosti pektinaza postižu se kultivacijama plesni na kompleksnim pektinskim polimerima, što se objašnjava ne samo maksimalnom indukcijom, već i nedostatkom kataboličke represije (Aguilar and Hutron, 1990; Riou et al., 1991; Jain et al., 1990; Kollar, 1998).

Dosad navedene konstatacije su se odnosile na regulaciju sinteze pektinaza pri submerznim uslovima, a najnovija istraživanja su pokazala da tehnika kultivacije itekako ima uticaja na ove mehanizme (Acuna-Argulles et al., 1995). Naime, prilikom kultivacija fungi na čistim podlogama proizvodnja ovih enzima je manje osetljiva na kataboličku represiju i represiju krajnjim proizvodom (Solis-Pereyra et al., 1993, 1996).

U literaturi takode postoje podaci o konstitutivnoj prirodi pektinaza koje proizvode neke plesni (Tuttobello and Mill, 1961; Aguilar and Huitron, 1990; Riou et al., 1991; Johnston and Williamsn, 1992a,b; Cary et al., 1995; Fraissinet-Tachet and Fevre, 1996; Kapat et al., 1998; Kollar, 1998), koje, produkovane u niskim tzv. bazalnim aktivnostima, služe kao aktivatori sinteze ostalih induktivnih pektinaza (Leone and Van Den Heuvel, 1987).

Tabela 1. Klasifikacija pektinaza po Sakai-u et al. (1993)

---

**Pektinesteraza (PE)**

(Pektin metilhidrolaza, EC 3.1.1.11). Katalizuje deesterifikaciju metoksil grupa pektina, pri čemu se dobija pektinska kiselina.

**Depolimerizacioni enzimi**

Enzimi koji hidrolizuju glikozidne veze:

**Polimetilgalakturonaza (PMG)**

Endo-PMG, katalizuje nasumično cepanje  $\alpha$ -1,4-glikozidnih veza u, prvenstveno visoko esterifikovanom, pektinu.

Egzo-PMG, katalizuje sekvencionalno cepanje  $\alpha$ -1,4-glikozidnih veza sa neredukujućeg kraja pektinskog lanca.

**Poligalakturonaza (PG)**

Endo-PG (EC 3.2.1.15, poli(1,4- $\alpha$ -D-galakturonid) glukan-hidrolaza), katalizuje nasumičnu hidrolizu  $\alpha$ -1,4-glikozidnih veza u poligalakturonskoj kiselini.

Egzo-PG (EC 3.2.1.67, poli(1,4- $\alpha$ -D-galakturonid) galakturono-hidrolaza), katalizuje hidrolizu  $\alpha$ -1,4-glikozidnih veza u poligalakturonskoj kiselini po sekvencionalnom mehanizmu.

---

Enzimi koji cepaju  $\alpha$ -1,4-glikozidne veze transeliminacijom sa neredukujućeg kraja, pri čemu se dobija galakturonid sa nezasićenom vezom između C<sub>4</sub> i C<sub>5</sub>.

**Polimetilgalakturonat liaza (PMGL)**

Endo-PMGL (EC 4.2.2.10, poli(metoksigalakturonid)liaza), katalizuje nasumično cepanje  $\alpha$ -1,4-glikozidnih veza u pektinu.

Egzo-PMGL, katalizuje postepenu razgradnju pektina transeliminativnim mehanizmom.

**Poligalakturonat liaza (PGL)**

Endo-PGL (EC 4.2.2.2, poli(1,4- $\alpha$ -D-galakturonid)liaza, katalizuje nasumično cepanje  $\alpha$ -1,4-glikozidnih veza u pektinskoj kiselini transeliminacijom.

Egzo-PGL (EC 4.2.2.9, poli(1,4- $\alpha$ -D-galakturonid) egzoliaza), katalizuje sekvencionalno cepanje  $\alpha$ -1,4-glikozidnih veza u pektinskoj kiselini transeliminacijom.

**Protopektinaza**

Enzim koji oslobadja visokopolimerizovani rastvorljivi pektin iz protopektina.

---

Mehanizam po kome se prvo odvija sekrecija pektinaza u niskim konstitutivnim aktivnostima, koje razgrađuju pektinske materije, a potom nastali degradacioni proizvodi indukuju sintezu ostalih pektinaza, se naziva sekvencionalnim, i pokazuje dobru koordinaciju kataboličkih puteva kod fungi u cilju kompletne degradacije pektinskog polimera (Riou et al., 1991; Fonseca and Said, 1995; Peričin i sar., 1996; Fraissinet-Tachet and Fevre, 1996).

Razdvajanje i prečišćavanje pektinaza produkovanih tokom kultivacije fungi na pektinskim supstratima i onih u komercijalnim preparatima je pokazalo da se enzimi, koji ispoljavaju istu katalitičku funkciju, pojavljuju u različitim oblicima (Cooke et al., 1976; Kester and Visser, 1990; Riou et al., 1991; Behere et al., 1993; Stratilova et al., 1993; Johnston et al., 1994; Fonseca and Said, 1995; Reignault et al., 1994; Fraissinet-Tachet and Fevre, 1996; Guevara et al., 1997; Levin and Forchiassin, 1998). Različitost formi pektinaza može biti posledica kako posttranslacionih modifikacija, tako i genetskih heterogenosti, ali im je biološki značaj isti - dobra adaptacija metaboličkih puteva tokom rasta mikroorganizma i vođenje istih katalitičkih reakcija različitim metaboličkim putevima (Vladutiu and Vladutiu, 1995).

### 2.4.3. Fungalne pektinaze u patogenezi

Biološka komunikacija između biljnog patogena i njegovog domaćina je zapravo kompleksna interakcija signala i odgovora. Prvi enzimi iz grupe enzima patogena, u literaturi poznatoj pod skraćenicom CWDE (Cell Wall Degrading Enzymes), koji započinju ovakvu komunikaciju su pektinaze, upravo zbog dostupnosti pektinskih materija enzimskom napretku. Uloga pektinaza se odnosi na razgradnju regiona sa pektinom u ćelijskom zidu biljke, čime se ne omogućava samo brza penetracija patogena i kolonizacija tkiva domaćina, već i obezbeđuju hranljive materije, neophodne za njegov rast (Bateman, 1972; Cervone et al., 1987; Sakai et al., 1993; Peričin et al., 1994).

Potreba za prevencijom procesa biljnih bolesti izazvanih plesnima doprinela je poslednjih godina intenzivnom istraživanju pektinaza, kao esencijalne komponente enzimskog kompleksa patogena (Johnston et al., 1994; Whitehead et al., 1995; Cary et al., 1995; Fraissinet-Tachet et al., 1995; Fraissinet-Tachet and Fevre, 1996; Guevara et al., 1997; Kollar, 1998; Kapat et al., 1998; Levin and Forchiassin, 1998; Yakoby et al., 2000). Do sada je okarakterisan veliki broj gena

koji kodiraju sintezu pektinaza kod fitopatogenih fungi, čime se otvaraju mogućnosti da se do detalja upozna i utiče na proces njihove ekspresije (Annis and Goodwin, 1997; Lang and Dornenburg, 2000).

#### 2.4.4. Industrijska proizvodnja pektinaza

Generalno, postoje dve osnovne tehnike za kultivaciju fungi u cilju proizvodnje pektinaza, a to su kultivacija na čvrstim podlogama ("solid-state") i u tečnosti ili tzv. submerzna ("submerged") kultivacija. Obe imaju u svojim prednosti, ali i nedostataka. Kontrola parametara kultivacije je lakša tokom njenog vođenja u tečnosti, ali su prinosi mali, dok obrnuta situacija važi za solid-state proces. U novije vreme se u literaturi često preporučuje ovaj poslednji način dobijanja pektinaza, prvenstveno zbog manje potrebe za vodom i mogućnosti kontaminacije, kao i, već spomenute, manje podložnosti sinteze pektinaza kataboličkoj represiji (Solis-Pereyra et al., 1993,1996).

Kultivacija fungi u cilju dobijanja pektinaza u vodenim dvofaznim sistemima, koja pruža teorijsku mogućnost elegantne zamene mehaničkog odvajanja biomase od enzima ekstrakcionim procesom, po dosadašnjim saznanjima nije ostvarena.

U literaturi se uglavnom mogu naći podaci o šaržnim kultivacijama fungi (Sakai et al., 1993), mada su one izvedene i u dolivnom sistemu i barbotажnom bioreaktoru (Peričin et al., 1990; Moresi et al., 1991).

Što se sastava medijuma za kultivaciju fungi u cilju proizvodnje pektinaza tiče, on, pored ostalih neophodnih sastojaka, treba da sadrži pektin (Fogarty and Kelly, 1983), ili, u ekonomski prihvatljivijoj verziji, otpatke prehrambene industrije bogate pektinskim materijama, kao što su jabučni trop, rezanci šećerne repe ili kore južnog voća (Bailey and Pessa, 1990; Peričin et al., 1992a; Fonseca and Said, 1994, Grohmann and Bothast, 1994).

Primenom tehnika koje se izvode na molekularnom nivou kod industrijski važnih fungi - producera pektinaza, a koje se odnose na fuzije protoplasta (Solis et al., 1996), korišćenje fungalnih transpozona (Kempken, 1999) i intervencije na nivou ekspresije (Lang and Dornenburg, 2000), omogućio bi se veliki napredak u programima za poboljšanje vrste i, u skladu sa tim, povećanje prinosa pektinaza ili željenog enzima iz ovog kompleksa.

#### 2.4.5. Primena pektinaza

Pektinaze, koje se koriste u prehrambenoj industriji, su velikim delom fungalnog porekla, i to uglavnom iz vrsta roda *Aspergillus*. Njihovom upotrebom se postiže povećanje prinosa i koncentracije aro natičnih i bojenih materija tokom proizvodnje voćnih sokova i vina, olakšano ceđenje, filtracija i bistenje. Jedan od enzima pektinaznog kompleksa, endo-pektinaza, se potreblljava za maceraciju biljnog tkiva pri pripremi pirea i kašastih sokova. Ovom vrstom tretmana, s obzirom da ćelija ostaje intaktna, vitamini, bojene i aromatične materije ostaju saćuvane od procesa oskidacije (Beveridge, 1997; Hernandez et al., 1997; Pimenta-Braz et al., 1998; Revilla and Gonzalez-SanJose, 1998). U poslednje vreme primena pektinaza dobija novu dimenziju u skladu sa savremenim trendoviam proizvodnje tzv. funkcionalne hrane (Lang and Dornenburg, 2000).

Pored uobićajenih tehnika, koje se koriste prilikom primene pektinaza u industriji, a odnose se na šaržne procese, u literaturi se preporučuje upotreba enzimskog membranskog reaktora (Giorno et al. 1998) i kontinualnog reaktora sa imobilizovanim pektinazama, ćime bi se postigao ne samo ekonomski efekt, zbog mogućnosti ponovne upotrebe enzima, već i poboljšale organoleptićke osobine proizvoda (Iwasaki et al., 1998; Alkorta et al., 1998).

#### 2.4.6. Pektinaze gljive *Polyporus squamosus*

Dosadašnja istraživanja su pokazala da gljiva *Polyporus squamosus* proizvodi pektinaze u submerznim uslovima kultivacije (Perićin et al., 1992b). Pektinazni kompleks se sastoji od endo- i egzo-pektinaza, a ne sadrži pektin liazu i esterazu (Perićin et al., 1992c). Endo-pektinaze su induktivne, a egzo-pektinaze delimićno induktivne prirode (Antov, 1996). U regulaciji sekrecije je zastupljen sekvencionalni mehanizam (Perićin i sar., 1996), a niski bazalni nivoi egzo-pektinaze mogli su se detektovati primenom metode koncentrisanja u interfazi (Perićin et al., 1997). Pektinaze gljive *Polyporus squamosus* se pojavljuju u multipnim formama (Perićin et al., 1992c). Širovi enzimski kompleks je bio pogodan za dobijanje bistrog soka jabuke, kao i za tretiranje šire i vina (Perićin i sar., 1996, Perićin et al., 1998-1999).



### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Komercijalni preparat pektinaza

U ekperimentima raspodele u model sistemima za pripremu tzv. osnovnog rastvora pektinaza korišćen je komercijalni preparat Vinoxym, proizvođača Novo Nordisk (Danska). Pri ispitivanju uticaja dužine veznih linija, odnosa zapremina, sastava dvofaznog sistema pri fiksnoj koncentraciji jedne od komponentata i uticaja neorganskih soli Vinoxym je bio razblažen u 10 mmol/l acetatnom puferu, pH 5.0.

Kada je ispitivan uticaj koncentracije i pH fosfatnog pufera na raspodelu pektinaza u model sistemu, Vinoxym je bio razblažen u fosfatnom puferu  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  čiji je opseg koncentracija bio 0.0067-0.4 mol/l, a pH vrednost varirala u granicama 5.5-7.5.

#### 3.2. Priprema model dvofaznih sistema

Polimeri, koji su korišćeni za pripremu vodenih dvofaznih sistema, su bili polietilen glikol 4000 (PEG) prosečne molekulske mase 3500-4500 (Merck, Nemačka) i dva dekstrana različitih molekulskih masa - dekstran (DEX), prosečne molekulske mase 40000 (Zdravlje, Leskovac, Jugoslavija) i sirovi dekstran, prosečnih molekulskih masa većih od 500000. Njihov maseni udeo je nadalje izražavan u procentima. Rastvor sirovog dekstrana u vodi, 10 % (w/w), sadržavao je približno 5 mg/ml redukujućih šećera, određenih DNS metodom (Miller, 1959), sa glukozom kao standardom.

Binodalne krive i vezne linije dva različita fazna sistema su određivane prema Blazquez-u et al. (1998). Sadržaj dekstrana je meren u polarimetru (Perkin-Elmer 141) na 589 nm. (Andersson et al., 1985). Merenjem suve materije određivana je ukupan sadržaj polimera u fazi.

Dvofazni sistemi za raspodelu pektinaza u model ekperimentima su pripremani prema Hotha-i and Banik-u (1997) rastvaranjem polimera u osnovnom rastvoru pektinaza intenzivnim mešanjem na vorteks aparatu, pri čemu je ukupna

masa dvofaznog sistema bila 10 g. Dvofazni sistem je ostavljan 12 časova u građuisanom sudu na sobnoj temperaturi da se faze razdvoje, zatim je gornja faza pažljivo razdvajana pipetom, a donja faza isto tako pažljivo izvlačena kroz međufazni sloj. U uzorcima je određivana aktivnost pektinaza i koncentracija proteina.

### 3.3. Mikroorganizam

Gljiva *Polyporus squamosus* MMOL 87 deponovana je u Državnom institutu kontrole farmaceutskih proizvoda u Sofiji (Bugarska), pod šifrom No 10308.C9.71, a dobijena je od Instituta za biotehnologiju u Moskvi (Rusija). Mikroorganizam je održavan u laboratorijskim uslovima na kosom Saboroaud maltoznom agaru, pri temperaturi od 4°C. Inokulum je dobijen spiranjem rasta sa kosog agara u erlemmajer bocu od 300 ml, koja je sadržala 100 ml osnovnog medijuma i kultivacijom u trajanju od 48 časova na tresilici pri 200 obrt/min i 28°C.

### 3.4. Sastav podloge

Osnovna podloga za kultivaciju vegetativnih ćelija, koje su korišćene kao inokulum, je preuzeta iz rada Aguilar-a and Huitron-a (1990) i sadržavala je po litru 2 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3 g ekstrakta kvasca i 5 g pektina, stepena esterifikacije 60 % (Green Ribbon 150° US-SAG, Obipektin, Švajcarska). Sastojci podloge su bili rastvoreni u destilovanoj vodi, a početni pH ( $\text{pH}_i$ ) je podešavan na 5.0.

Kultivacije u dvofaznom medijumu sa dekstranom 40000 su za osnovu imale podlogu koja je sadržala 2 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 3 g ekstrakta kvasca i 5 g pektina (Green Ribbon 150° US-SAG) u 1 litru 0.15 mol/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 5.0, i, kao dodatak, 7 % (w/w) PEG i 7.5 % (w/w) DEX. Kada je ispitivan uticaj  $\text{pH}_i$ , njegova vrednost je u dvofaznom medijumu podešavana na 3.3, 4.5, 5.0 i 6.0.

U eksperimentima sa sirovim dekstranom podloga za kultivaciju *Polyporus squamosus* u kontrolnim homogenim kultivacijama je sadržala 4 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  i 5 g pektina, stepena esterifikacije 60 % (Green Ribbon 150° US-SAG, Obipektin, Švajcarska) ili 5 g suvih izluženih repinih rezanaca po litru 0.1 mol/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , a  $\text{pH}_i$  je bio podešen na 5.0 ili na 7.0. Heterogeni, vodeni

dvofazni medijum, je, u dodatku, sadržavao 5 % (w/w) PEG i 4 % (w/w) sirovog dekstrana, ili, u drugoj kombinaciji, 7.5 % (w/w) PEG i 7.5 % (w/w) sirovog dekstrana. U kultivacijama, u kojima je ispitivan uticaj  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , ova so je dodavana u medijum za kultivaciju u količini od 2g ili 4g na litar podloge. Koncentracija  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  je varirala od 0 do 0.2 mol/l u kultivacijama vodenim u cilju ispitivanja uticaja fosfata. Sterilizacija je vršena na 121°C u toku 30 minuta.

### 3.5. Inokulacija i uslovi kultivacije

Erlenmajer boce od 100 ml, koje su sadržavale 30 ml dvofaznog medijuma sa dekstranom 40000, kao i erlenmajer boce od 300 ml, sa 50 ml homogenog ili dvofaznog medijuma sa sirovim dekstranom, inokulisane su sa 5 % (v/v) inokuluma i postavljene na tresilicu, pri 300 obrt/min i 28°C.

Separacija faza u uzorcima iz heterogenih kultivacija vršena je u centrifugi na 3000 obrt/min u toku 5 minuta, a zatim je dođ a faza još jednom centrifugirana (10000 obrt/min, 10 minuta, Sorvall RC-5B) da bi odvojila od biomase. Biomasa je od kultivacione tečnosti u slučaju homogenog medijuma odvajana filtracijom.

### 3.6. Biomasa

Biomasa je sušena na 105°C do konstantne mase, merena na analitičkoj vagi, a zatim je u njoj određivan sadržaj RNA metodom po Munro-u and Flecku-u (1966). Proizvedena biomasa je prikazana kao masa RNA izražena u mg.

### 3.7. Rastvorljivi proteini

Koncentracija rastvorljivih proteina u uzorcima iz model sistema i kultivacija određivana je metodom po Lowry-ju et al. (1951), sa BSA kao standardom. Smetnje u analitičkoj proceduri, koje uzrokuje polietilen glikol velikih molekulskih masa (20000) (Howe et al., 1964), nisu dektovane kada je određivan protein u prisustvu PEG 4000, što je u saglasnosti da literaturnim navodima. Naime, Honig and Kula (1976) su pokazali da su interference PEG 4000 u određivanju koncentracije proteina po Lowry-ju neznatne, do vrednosti udela polietilen glikola od 23 % (w/w), koji je bio veći od onih, primenjenih u ovom radu.

### 3.8. Redukujući šećeri

Koncentracija redukjućih šećera je određivana DNS metodom po Miller-u (1959), a kao standard je korišćena gluk. oza.

### 3.9. Koncentracija pektina

U ekperimentima u model sistemu određena je koncentracija pektina (Barbier and Thibault, 1982), a njegov koeficijent raspodele je izračunat po formuli (2).

### 3.10. Aktivnosti enzima

Aktivnost endo-pektinaze (endo-p) je određivana praćenjem promene viskoziteta reakcione smeše (Peričin et al., 1992c). Jedinica aktivnosti je bila definisana kao ona količina enzima, koja smanjuje početnu vrednost specifičnog viskoziteta reakcione smeše za 20 % u toku 1 minuta na pH 4.5 i 30°C.

Aktivnost egzo-pektinaze (egzo-p) je određivana metodom po Aguilar-u and Huitron-u (1990). Jedinica aktivnosti je definisana kao ona količina enzima koja katalizuje stvaranje 1  $\mu$ mol galakturonske kiseline na pH 5.0 i 45°C u toku 1 sata.

U uzorcima faza iz model sistema i kultivacija određivana je dekstranazna aktivnost (Rogalski et al., 1998).

### 3.11. Izračunavanje parametara raspodele

Koeficijenti raspodele endo-p i egzo-p su računati na osnovu analogije sa formulom (1) kao:

$$K = \frac{\text{aktivnost}_t}{\text{aktivnost}_f} \quad (5)$$

gde su aktivnost<sub>t</sub> i aktivnost<sub>f</sub>, odgovarajuće aktivnosti u gornjoj i donjoj fazi, redom.

Prinos u gornjoj fazi je računat iz formule (3) kao:

$$Y (\%) = \frac{100}{1 + \left(\frac{V_t}{V_b} K\right)^{-1}} \quad (3)$$

gde su  $Y$ ,  $V_t$  i  $V_b$  prinos u gornjoj fazi  $i$ , redom, zapremine gornje i donje faze.

Dužina veznih linija je definisana formulom (Furuya et al., 1995):

$$\text{Dužina vezne linije (\%)} = \left[ \left( w_{DEX}^t - w_{DEX}^b \right)^2 + \left( w_{PEG}^t - w_{PEG}^b \right)^2 \right]^{1/2} \quad (6)$$

gde su  $w^t$  i  $w^b$  maseni udeli dekstrana i polietilen glikola, u gornjoj i donjoj fazi, redom, izraženi u procentima.

Specifične aktivnosti su određivane kao količnik aktivnosti i koncentracije proteina, a stepen prečišćenosti u gornjoj fazi (st. preč.) u model sistemima kao odnos specifičnih aktivnosti u gornjoj fazi i osnovnom rastvoru pektinaza. Stepenn prečišćenosti u gornjoj fazi u dvofaznim sistemima za kultivaciju određivan je kao odnos specifičnih aktivnosti u gornjoj fazi i homogenoj kultivaciji.

Dobijene vrednosti parametara su izražene svojim srednjim vrednostima izračunatim iz najmanje tri merenja (čija su vrednosti varirale u opsegu  $\pm 5$  %) dobijenim iz tri ponavljanja za svaku ekperimentalnu tačku.

## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

U okviru ovog poglavlja biće predstavljeni rezultati ispitivanja raspodele pektinaza u vodenim dvofaznim sistemima sastavljenim od polietilen glikola 4000 i dve vrste dekstrana - sirovog i dekstrana 40000. Eksperimenti su koncipirani tako da su prvo definisani dvofazni sistemi u kojima su vršeni eksperimenti raspodele, zatim su ispitivani parametri raspodele pektinaza komercijalnog enzimskog preparata u model sistemima, da bi, nakon toga, na osnovu dobijenih rezultata, bili postavljeni ogledi kultivacije *Polyporus squamosus* u dvofaznim sistemima.

Poznato je da fungi imaju sposobnost produkcije širokog spektra hidrolitičkih enzima, kao i da se njihova sinteza može indukovati prisustvom supstrata u podlozi. Da bi se dvofazni sistem održao kao takav, kako u model, tako i kultivacionim sistemima, potrebno je da ni komercijalni enzimski preparat niti proizvodni mikroorganizam ne poseduju aktivnost, koja će razgrađivati dekstran. Rezultati analize komercijalnog preparata pektinaza, kao i svi uzorci kultivacionih tečnosti na dekstranaznu aktivnost su bili negativni.

### 4.1. Raspodela pektinaza u model sistemima

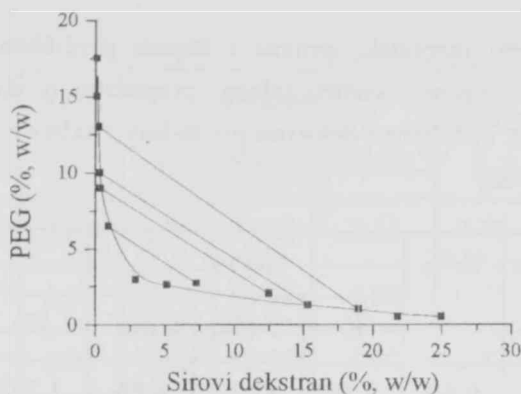
Iz teorijskog poznavanja raspodele proteina u dvofaznim sistemima poznato je da se ovaj fenomen dešava kao posledica zbirnog delovanja više različitih efekata, čiji je konačni uticaj teško predvideti, te se metod pronalaženja dvofaznog sistema, koji daje željenu ili najbolju moguću raspodelu ciljne supstance svodi na princip probe i greške.

#### 4.1.1. Uticaj masenih udela polimera na raspodelu pektinaza u model sistemima

##### 4.1.1.1. Fazni dijagram polietilen glikol 4000/sirovi dekstran

U prvim eksperimentima raspodele pektinaza u model sistemima korišćeni su polietilen glikol 4000 i sirovi dekstran. Dvofazni sistem, koji su sačinjavali ovi

polimeri, bio je definisan konstruisanjem faznog dijagrama, odredivanjem binodalne krive i veznih linija (Slika 4).



Slika 4. Fazni dijagram dvofaznog sistema polietilen glikol 4000/ sirovi dekstran

#### 4.1.1.2. Uticaj masenih udela polimera na raspodelu pektinaza u model sistemu polietilen glikol 4000/sirovi dekstran

Uticaj masenih udela polietilen glikola i sirovog dekstrana je u model sistemu ispitan tako što je udeo jednog od polimera menjan, uz nepromenjen udeo drugog polimera. Praćeni su koeficijenti raspodele, prinosi u gornjoj fazi i stepeni prečišćenosti endo-p i egzo-p u gornjoj fazi u odnosu na njihovu specifičnu aktivnost u komercijalnom preparatu (Tabele 2 i 3). Aktivnosti endo-p i egzo-p su u osnovnom rastvoru, dobijenom razblaživanjem komercijalnog enzimskog preparata, bile 23.26 (U/ml) i 4287.36 (U/ml), redom, a koncentracija proteina 0.32 (mg/ml).

Povećanje udela polietilen glikola pri stalnom udelu sirovog dekstrana od 7.5 % (w/w) smanjilo je iznose koeficijenata raspodele oba enzima, kao i njihove stepene prečišćenosti u gornjoj fazi. U isto vreme je povećanjem masenog udela PEG u dvofaznom sistemu povećan i odnos zapremina faza. Najveće vrednosti koeficijenata raspodele, pri 7.5 % (w/w) dekstrana, dobijene su pri najnižem udelu PEG od 5 % (w/w) i iznosile su 1.76 za endo-p i 1.22 za egzo-p. Najveći stepeni prečišćenosti su dobijeni pri istim uslovima i njihove vrednosti su bile 6.66 za endo-p, odnosno 7.30 za egzo-p. Ovakvo ponašanje oba tipa pektinaza se može objasniti povećanjem hidrofobnosti gornje faze sa povećanjem masenog udela

polietilen glikola i težnjom enzima ka manje hidrofobnoj sredini, te se može reći da je u skladu sa ponašanjem nekih enzima, opisanim u literaturi (Hustedt et al., 1978; Kula 1979, Hayashida et al., 1990).

Tabela 2. Koeficijenti raspodele, prinosi i stepeni prečišćenosti u gornjoj fazi endo-p i egzo-p komercijalnog preparata u dvofaznim vodenim sistemima PEG/sirovi dekstran pri stalnoj vrednosti udela dekstrana od 7.5 % (w/w)

PEG (%, w/w)	dekstran (%, w/w)	$V_t/V_b$	endo-p			egzo-p		
			K	Y (%)	st.preč.	K	Y (%)	st.preč.
5.0	7.5	0.60	1.76	51.22	6.66	1.22	42.12	7.30
7.5	7.5	1.46	1.26	64.78	6.55	0.76	52.59	5.62
10.0	7.5	1.60	0.80	63.50	5.34	0.61	57.06	4.17

Što se prinosa pektinaza u gornjoj fazi sistema tiče, on je, nasuprot prethodnim parametrima, sa povećanjem udela polietilen glikola imao pozitivan trend, tako da je najveći deo egzo-p aktivnosti, u iznosu od 57.06 %, raspodeljen u gornju fazu u sistemu sastava 10% (w/w) PEG/ 7.5% (w/w), odnosno u sistemu sa najvećom vrednošću odnosa zapremina faza (1.6), koja je bila dovoljno velika da kompenzije smanjenje koeficijenta raspodele ovog enzima.

Kako je, kao što je već rečeno, prinos funkcija, kako koeficijenta raspodele, tako i odnosa zapremina faza, maksimalna vrednost za endo-p, 64.78 %, ostvarena je u sistemu sastava 7.5 % (w/w) PEG/ 7.5 % (w/w) sirovi dekstran, a ne u sistemima sa najvećim  $V_t/V_b$ , ili  $K_{endo}$ .

U narednoj seriji eksperimenata je ispitano je kako maseni udeo sirovog dekstrana utiče na parametre raspodele pektinaza (Tabela 3). S obzirom da su najveće vrednosti  $K_{endo}$  i  $K_{egzo}$ , pri stalnom udelu dekstrana, dobijene kada je udeo polietilen glikola u sistemu bio 5 % (w/w), ova vrednost je održavana konstantnom. Ispitani udeli dekstrana bili su manji od 7.5 % (w/w), sa ciljem redukcije viskoziteta u dvofaznom sistemu.



Tabela 3. Koeficijenti raspodele, prinosi i stepeni prečišćenosti u gornjoj fazi endo-p i egzo-p komercijalnog preparata u dvofaznim vodenim sistemima PEG/sirovi dekstran pri stalnoj vrednosti udela PEG od 5 % (w/w)

PEG (%, w/w)	dekstran (%, w/w)	$V_i/V_b$	endo-p			egzo-p		
			K	Y (%)	st.preč.	K	Y (%)	st.preč.
5.0	3.0	2.07	1.36	73.78	7.31	0.79	62.04	5.50
5.0	5.0	0.80	2.43	66.03	4.30	0.75	37.50	4.24
5.0	6.0	0.63	1.81	52.26	4.00	0.73	31.49	4.95

Najveći koeficijent raspodele endo-p je dobijen u sistemu sastava 5 % (w/w) PEG/ 5 % (w/w) sirovi dekstran i iznosio je 2.43, dok je najveći  $K_{egzo}$  bio 0.79 i postignut je pri 3 % (w/w) dekstrana i 5 % (w/w) PEG. Povećanje udela dekstrana je imalo negativan uticaj na stepene prečišćenosti oba tipa pektinaza. Maksimalne vrednosti ovog parametra su bile 7.31 za endo-p i 5.50 za egzo-p, i dobijene su pri 3 % (w/w) dekstrana, uz stalni udeo polietilen glikola od 5 % (w/w).

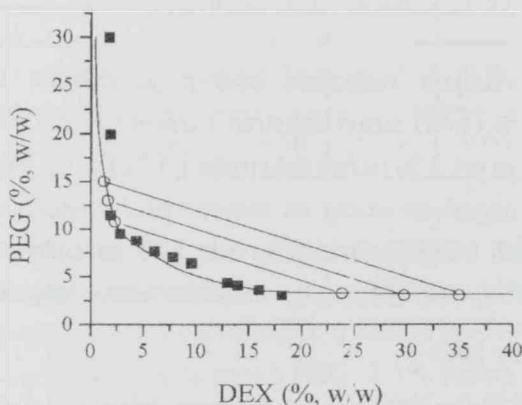
Sa povećanjem masenog udela sirovog dekstrana u faznom sistemu, uz nepromenjen udeo drugog polimera, smanjen je zapreminski odnos faza, kao i prinos, kako endo-p, tako i egzo-p, u gornjoj fazi. Tako su najbolje vrednosti ovog parametra dobijene u sistemu sa najmanjim udelom dekstrana, 3 % (w/w), pri stalnih 5 % (w/w) polietilen glikola, i iznosile su 73.78 % za endo-p i 62.04 % za egzo-p aktivnost.

Iz rezultata predstavljenih u Tabeli 3 se vidi da promena masenog udela sirovog dekstrana na različite načine utiče na koeficijente raspodele endo-p i egzo-p, te se opšti zaključak, poput onog, iz literature, da se koeficijent raspodele enzima može povećati smanjenjem koncentracije (odnosno udela) dekstrana (Kroner and Kula, 1978; Hayashida et al., 1990), ne može izvesti. Ovo se može objasniti polidisperznošću sirovog dekstrana i različitom raspodelom frakcija molekularskih masa u sistemima različitog sastava (Cabezas, 1996), što može prouzrokovati različite uticaje i na raspodelu dve vrste aktivnosti. Ono što se,

ipak, kao zajedničko može izvesti, je smanjenje orinosa oba enzima u gornjoj fazi sa povećanjem sadržaja dekstrana, tj. sa smanjenjem zapreminskog odnosa, kao i smanjenje stepena njihove prečišćenosti u gornjoj fazi uslovljenim povećanjem hidrofobnosti ove faze sa povećanjem udela dekstrana u sistemu.

#### 4.1.1.3. Fazni dijagram polietilen glikol 4000/dekstran 40000

Kao što je već rečeno, prvi korak u radu sa dvofaznim sistemima predstavlja konstrukcija faznog dijagrama, odnosno binodalne krive i veznih linija. Na Slici 5 je prikazan fazni dijagram sistema sastavljenog od polietilen glikola 4000 i dekstrana 40000 (DEX), kao i položaj veznih linija.



Slika 5. Fazni dijagram dvofaznog sistema polietilen glikol 4000/dekstran 40000

#### 4.1.1.4. Uticaj masenih udela polimera na raspodelu pektinaza u model sistemu polietilen glikol 4000/dekstran 40000

U dvofaznom sistemu, predstavljenim Slikom 5, ispitan je uticaj masenih udela polimera na raspodelu komercijalnih pektinaza (Tabela 4). Eksperimenti su vođeni tako da je udeo dekstrana bio konstantan i iznosio 7.5 % (w/w), dok je udeo drugog polimera bio menjan u granicama 7.5-12.5 % (w/w). U osnovnom rastvoru, dobijenom razblaživanjem komercijalnog preparata, endo-p aktivnost je bila 2.08 (U/ml), egzo-p 284.48 (U/ml), a koncentracija proteina 0.037 (mg/ml).

Tabela 4. Uticaj masenog udela polietilen glikola na parametre raspodele pektinaza komercijalnog enzimskog preparata u model sistemu pri stalnoj vrednosti udela dekstrana 40000 od 7.5 % (w/w)

PEG (%, w/w)	DEX (%, w/w)	endo-p			egzo-p		
		K	Y(%)	st.preč.	K	Y(%)	st.preč.
7.5	7.5	0.22	39.39	0.42	2.04	85.77	1.28
9.0	7.5	0.16	34.46	0.22	0.60	66.35	0.67
10.0	7.5	0.06	17.36	0.34	0.69	70.72	1.35
12.5	7.5	0.04	13.00	0.17	0.60	69.16	0.79

Promena udela polietilen glikola jednako je uticala na raspodelu oba tipa enzimskih aktivnosti; naime, sa povećanjem udela ovog polimera opadao je koeficijent raspodele endo-p i egzo-p, njihovi prinosi, kao i stepen prečišćenosti u gornjoj fazi, računat u odnosu na specifične aktivnosti pektinaza komercijalnog preparata. Maksimalne postignute vrednosti svih parametara raspodele su, dakle, dobijene u sistemu sa 7.5 % (w/w) polietilen glikola i 7.5 % (w/w) dekstrana 40000, odnosno u sistemu sa najmanjim ispitivanim udelom PEG. Ovi rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima, po kojima se koeficijenti raspodele enzima (Kroner and Kula, 1978; Hayashida et al., 1990) i ćelija (Ilieva et al., 1995) povećavaju sa smanjenjem koncentracije (odnosno udela) polietilen glikola i mogu se objasniti težnjom pektinaza ka manje hidrofobnoj sredini, odnosno sredini sa manjim udelom hidrofobnijeg polimera, a to je, kao što je već rečeno, polietilen glikol (Albertsson, 1986).

Iako je opšti trend ponašanja pektinaza u sistemu sa dekstranom 40000 sledio onaj, zabeležen u sistemu sa sirovim dekstranom, maksimalna dobijena vrednost koeficijenta raspodele endo-p (0.22) je bila 8 puta manja od maksimalne u prisustvu sirovog dekstrana, odnosno 5.73 puta manja od one u sistemu istog sastava, 7.5 % (w/w) PEG/7.5 % (w/w) dekstran, (Tabele 2 i 4). Stepem prečišćenosti se kretao se u granicama 0.17-0.42, što je predstavljalo slab rezultat, imajući u vidu onaj dobijen u prisustvu sirovog dekstrana (Tabela 2).

U model sistemu sa dekstranom 40000 maksimalna postignuta vrednost koeficijenta raspodele egzo-p je bila 2.04, što je ujedno predstavljalo i najveću dobijenu vrednost ovog parametra u sistemima sa obe vrste dekstrana (Tabele 2,3,4), ali su, pri istoj kombinaciji polimera, koja je dala najbolji  $K_{\text{egzo}}$ , stepeni njegove prečišćenosti bili od 3.3 do 5.7 puta manji od onih dobijenih u sistemu sa sirovim dekstranom.

Ovo su i bili razlozi zbog kojih su uticaji ostalih faktora na raspodelu pektinaza proučavani u model sistemima sa sirovim dekstranom. Upotreba sirovog dekstrana bila je motivisana ekonomskim razlozima, koji su se u literaturi pokazali opravdanim (Tjerneld et al., 1985; Venancio et al., 1996).

#### **4.1.2. Uticaj dužine veznih linija na raspodelu pektinaza u model sistemu polietilen glikol 4000/sirovi dekstran**

Dešava se da se u literaturi efekt povećanja koncentracije (ili udela) jednog polimera na koeficijent raspodele enzima, pri stalnoj koncentraciji (ili udelu) drugog, u potpunosti poistovećuje sa efektom koji izaziva povećanje dužine veznih linija, kao npr. u radu Kuboi-a et al. (1995), što je samo delimično tačno. Naime, promena koncentracije jednog polimera, uz nepromenjenu koncentraciju drugog činioca faznog sistema, deluje na koeficijent raspodele i na prinos u gornjoj fazi i kroz zapreminski odnos faza. Da bi se ispitao sam uticaj dužine veznih linija na parametre koji karakterišu raspodelu enzima, potrebno je da se koncentracije oba polimera odaberu tako, da se svi ispitivani dvofazni sistemi razdvoje u faze jednakih zapremina.

U sledećim eksperimentima ispitan je uticaj dužine veznih linija raspodelu pektinaza u model sistemu, a udeli polietilen glikola i sirovog dekstrana odabrani da obezbede da odnos zapremina faza bude jednak jedinici (Tabela 5).

Povećanje dužine veznih linija smanjilo je koeficijente raspodele, kako endo-p, tako i egzo-p aktivnosti, a, s obzirom na jednaku vrednost zapreminskog odnosa u svim eksperimentalnim tačkama, na isti način je uticalo i na prinos u gornjoj fazi. Najbolji rezultati su dobijeni u dvofaznom model sistemu sastava 5 % (w/w) PEG/4 % (w/w) sirovi dekstran, sa dužinom vezne linije od 7.44 % - koeficijenti raspodele endo-p i egzo-p su bili 1.66, odnosno 0.95, a prinosi u gornjoj fazi 60.85 % za endo-p, odnosno 47.07 % za egzo-p. Ovakav efekt je

dužina veznih linija imala na više enzima (Cole, 1993; Furuya et al., 1995, 1996; Hotha and Banik, 1997), a on se može objasniti promenama u hidrofobnosti (Albertsson, 1986) i međufaznom potencijalu (Umakoshi et al., 1996).

Tabela 5. Uticaj dužine veznih linija na parametre raspodela endo-p i egzo-p komercijalnog enzimskog preparata u dvofaznom sistemu PEG/sirovi dekstran pri  $(V_t/V_b)=1$

PEG (%, w/w)	dekstran (%, w/w)	dužina veznih linija (%)	endo-p			egzo-p		
			K	Y (%)	st.preč.	K	Y (%)	st.preč.
5.0	4.0	7.44	1.66	60.85	5.92	0.95	47.07	4.64
5.3	6.6	13.98	1.25	56.05	5.27	0.83	46.81	4.60
5.6	7.8	17.36	0.93	45.97	6.14	0.69	38.70	4.73
6.5	9.4	22.30	0.65	40.00	5.63	0.57	37.13	5.84

Promene u stepenu prečišćenosti u gornjoj fazi oba tipa pektinaza sa promenom dužine veznih linija nisu po trendu pratile promene koeficijenta raspodele. Tako je najveći stepen prečišćenosti endo-p dobijen na veznoj liniji od 17.36 % i iznosio je 6.14, dok je najbolje prečišćavanje egzo-p (5.84 puta) postignuto na veznoj liniji koja je odgovarala sistemu sastava 6.5 % (w/w) PEG/9.4 % (w/w) sirovi dekstran. Razlike u stepenu prečišćenosti oba enzima verovatno su bile posledica neselektivne raspodele ostalih proteina, izazvane već spomenutom polidisperznošću sirovog dekstrana.

#### 4.1.3. Uticaj odnosa zapremina faza na raspodelu pektinaza u model sistemu polietilen glikol 4000/sirovi dekstran

Dvofazni sistemi, čiji su sastavi predstavljeni tačkama na istoj veznoj liniji, nakon razdvajanja, daju gornje i donje faze međusobno jednakog sastava, ali različitih zapremina. Kako je za efikasnu separaciju i dobar pr nos potrebno uzeti u obzir i zapreminski odnos faza (Andersson and Hahn-Hagerdal, 1990), u Tabeli 6 predstavljeni su rezultati ispitivanja zavisnosti parametara raspodele pektinaza od ove veličine, varirane na veznoj liniji dužine 13.98 %.

Tabela 6. Uticaj odnosa zapremina faza, na veznoj liniji dužine 13.98 %, na parametre raspodele endo-p i egzo-p komercijalnog enzimskog preparata u dvofaznom sistemu PEG/sirovi dekstran

PEG (%, w/w)	dekstran (%, w/w)	$V_t/V_b$	endo-p			egzo-p		
			K	Y (%)	st.preč.	K	Y (%)	st.preč.
4.5	8.4	0.1	1.62	11.89	6.70	1.04	7.98	5.58
5.0	7.5	0.6	1.64	49.45	5.97	0.93	35.68	6.43
5.3	6.6	1.0	1.25	56.05	5.27	0.88	46.81	4.60
6.5	5.0	2.3	0.94	68.80	5.49	0.60	58.46	3.30
7.2	4.0	3.0	0.79	70.33	5.40	0.73	68.65	4.97
7.5	3.0	5.6	0.32	64.36	3.90	0.38	68.20	3.12

Sa povećanjem zapremine gornje faze, odnosno odnosa zapremina faza, opadali su koeficijenti raspodele, kako za endo-p, tako i za egzo-p. Najveće vrednosti ovog parametra za oba tipa pektinaza dobijene su u sistemu sastava 4.5 % (w/w) PEG/ 8.4 % (w/w) sirovi dekstran u kome je odnos zapremina faza bio 0.1, i iznosile su 1.62 za endo-p i 1.04 za egzo-p aktivnost. Promena stepena prečišćenosti endo-p sa porastom zapreminskog odnosa imala je isti trend kao i prethodni parametar, te je najveća vrednost, 6.70, dobijena takode pri zapreminskom odnosu 0.1, dok je najveće prečišćavanje egzo-p (6.43 puta) postignuto pri zapreminskom odnosu 0.6. Negativan uticaj je povećanja zapreminskog odnosa imalo i na koeficijente raspodele alkalne proteaze (Hotha and Banik, 1997), kao i penicilin acilaze i ukupnih proteina (Marcos et al., 1998). Vrednosti odnosa zapremina faza, pri kojima su dobijene najbolje vrednosti stepena prečišćenosti pektinaza, bili su u skladu sa rezultatima Marcos-a et al. (1998) o maksimalnoj vrednosti ovog parametra za penicilin acilazu, dobijenoj pri niskim  $V_t/V_b$ .

Kako je pad vrednosti koeficijenata raspodele bio kompenzovan porastom zapreminskog odnosa, prinos u gornjoj fazi je rastao sa povećanjem ove promenljive, sve do dvofaznog sistema, sastava 7.5 % (w/w) PEG/ 3 % (w/w) dekstran, u kom je zapreminski odnos bio 5.6. Tako se pokazalo tačnim da je za

željeni prinos važno odabrati i koeficijent raspodele i odnos zapremina (Andersson and Hahn-Hagerdal, 1990).

Ispitivanja uticaja odnosa zapremina na raspodelu enzima i proteina pokazala su da je on u funkciji dužine veznih linija, kao i da jedno na veznoj liniji, koja se nalazi blizu binodalne krive, koeficijent raspodele proteina ostaje konstantan (Marcos et al., 1998). Tabela 7 sadrži rezultate ispitivanja uticaja zapremina odnosa faza, variranih na najkraćoj veznoj liniji dužine 7.44 %, na parametre raspodele endo-p i egzo-p.

Tabela 7. Uticaj odnosa zapremina faza, na veznoj liniji dužine 7.44 %, na parametre raspodele endo-p i egzo-p komercijalnog enzimskog preparata u dvofaznom sistemu PEG/sirovi dekstran

PEG (%, w/w)	dekstran (%, w/w)	$V_f/V_b$	endo-p		egzo-p	
			K	Y (%)	K	Y (%)
5.0	4.0	1.0	1.66	60.85	0.95	47.07
5.5	3.0	2.0	1.16	69.71	1.03	67.14
6.0	2.0	3.6	1.12	80.06	0.97	77.67

Velike promene u vrednosti zapreminskog odnosa nisu uticale na adekvatno smanjenje koeficijenta raspodele egzo-p, kao što je to bio slučaj na veznoj liniji dužine 13.98 %; naime, povećanje vrednosti ( $V_f/V_b$ ) 3.6 puta promenilo je vrednost koeficijenta raspodele ovog enzima samo za 2 %. Isto je važno i za  $K_{endo}$  u poslednja dva sistema - skok vrednosti odnosa zapremina faza sa 2.0 na 3.6 izazvao je smanjenje koeficijenta raspodele od 4 %. U isto vreme, prinos pektinaza u gornjoj fazi je rastao sa povećanjem vrednosti odnosa  $V_f/V_b$ , te su maksimalne vrednosti ovog parametra dobijene u sistemu sastava 6 % (w/w) PEG/ 2.0 % (w/w) sirovi dekstran, i iznosile su 80.06 %, za endo-p i 77.67 % za egzo-p.

Ovi rezultati ukazuju na mogućnost da proteini, odgovorni za enzimsku aktivnost, pokazuju optimalno ponašanje u onom delu faznog dijagrama u kom su razlike između sastava faza manje, tj. na veznim linijama bliskim binodalnoj krivi,

i u sistemu polietilen glikol/ dekstran, kao što je to slučaj u PEG/ so dvofaznim sistemima (Marcos et al., 1998).

#### **4.1.4. Uticaj neorganskih soli na raspodela pektinaza u model sistemu polietilen glikol 4000/sirovi dekstran**

U teorijskom delu detaljno je obrađen uticaj neorganskih soli na raspodelu supstanci u vodenim dvofaznim sistemima. Kako je zadatak ispitivanja raspodele pektinaza u model sistemima imao za cilj da postavi osnovu za kultivaciju u dvofaznim sistemima, od velikog interesa je bilo ispitati kako soli, konstituenti podloge, utiču na proces raspodele. Stoga je, u okviru ovoga, ispitan efekt amonijum sulfata i fosfata, koji ulaze u sastav medijuma, kao i natrijum sulfata i hlorida, soli, čiji se uticaj na raspodelu proteina u literaturi često ispituje (Hustedt et al., 1978; Kroner and Kula, 1979; Albertsson, 1986; Kuboi et al., 1995; Umakoshi et al., 1996; Gunduz and Korkmaz, 2000).

##### **4.1.4.1. Uticaj amonijum i natrijum sulfata**

Primenjene koncentracije sulfata su u eksperimentima raspodele menjane u rasponu od 5 do 50 mmol/l i bile su ispod onih, za koje je utvrđeno da menjaju nagib veznih linija (Zaslavsky et al., 1988). Rezultati su predstavljeni uporedo sa koeficijentima raspodele pektinaza dobijenim u sistemu istog sastava, 5 % (w/w) PEG/ 4 % (w/w) sirovi dekstran, bez prisustva soli (Tabela 8).

Obe soli su do izvesne koncentracije imale pozitivan efekt na koeficijente raspodele endo- i egzo-pektinaza. Pri koncentracijama od 15 mmol/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   $K_{\text{endo}}$  je bio za 25 % veći, odnosno za 20 % veći, kada je u sistem dodata isto toliko  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  u odnosu na sistem bez soli. U prisustvu ove koncentracije  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  i  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  dobijeni su i najveći prinosi ovog enzima u gornjoj fazi sistema, koji su iznosili 64.25 %, odnosno 66.81 %. Najveći stepen prečišćenosti endo-p u prisustvu amonijum sulfata dobijen je takođe pri koncentraciji od 15 mmol/l i iznosio je 5.65, dok je najbolja prečišćenost egzo-p (7.51) postignuta već pri 5 mmol/l natrijum sulfata

Koeficijenti raspodele su za egzo-p bili 1.6 puta veći od onih u sistemu bez soli u prisustvu 15 mmol/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  i 5 mmol/l  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Isto je važno i za prinose, koji su u prisustvu redom pomenutih koncentracija dve soli povećani za 24 %, odnosno 27 % u odnosu na one, dobijene u sistemu bez soli, kao i za stepen



prečišćenosti, koji je u odnosu na sistem bez soli, povećan 1.43, odnosno 2.09 puta.

Dalje povećavanje količine dodatih soli, smanjivalo je, kako koeficijente raspodele enzima, tako i prinose i stepen prečišćenosti u gornjoj fazi. Ovakvo ponašanje pektinaza može se objasniti delovanjem soli na više nivoa prilikom raspodele proteina (Albertsson, 1986; Abbot et al., 1990).

Treba primetiti da je veći stepen prečišćenosti ostvaren sa  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  u odnosu na  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , ne samo kada se porede rezultati dobijeni dodatkom soli u najpovoljnijim koncentracijama, već i generalno. Tako je npr. najveći postignuti stepen prečišćenosti endo-p, u prisustvu optimalne koncentracije amonijum sulfata, bio 5.65, ali je njegova vrednost u prisustvu najpogodnije koncentracije natrijum sulfata bila 7.51. Isto je važno i za stepen prečišćenosti egzo-p - najveća dobijena vrednost je iznosila 4.52 pri 15 mmol/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , a 6.58 kada je u sistem dodat  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  u koncentraciji od 5 mmol/l. Ovo je verovatno bilo izazvano selektivnijom raspodelom proteina, odgovornih za aktivnost, u gornju fazu sistema, kada su u njemu bili prisutni joni natrijuma i sulfata.

Tabela 9. Uticaj koncentracije  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  i  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  na parametre raspodele pektinaza komercijalnog preparata u model sistemu sastava 5 % (w/w) PEG/ 4 % (w/w) sirovi dekstran

dodata so	$C_{\text{soli}}$ (mmol/l)	endo-p			egzo-p		
		K	Y (%)	st.preč.	K	Y (%)	st.preč.
bez soli	0	1.66	60.85	4.10	0.95	47.07	3.15
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5	1.36	54.51	4.81	1.50	55.93	4.43
	15	2.09	64.25	5.65	1.62	58.21	4.52
	25	1.43	54.52	4.22	1.15	49.09	4.00
	50	1.32	51.98	3.62	1.01	45.30	3.64
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	5	1.44	59.02	7.51	1.50	60.00	6.58
	15	1.97	66.81	6.81	0.98	50.03	5.43
	25	1.54	65.70	6.56	0.94	51.72	5.03

Pozitivan efekt ispitivanih soli na koeficijente raspodele u saglasnosti je sa rezultatima drugih autora (Kroner and Kula, 1978; Albertsson, 1986; Kuboi et al., 1995; Umakoshi et al., 1996), ali teško da bi se mogao nazvati dramatičnim, kako se u često opisuje u literaturi (Kuboi et al., 1995; Pfennig et al., 1998).

#### 4.1.4.2. Uticaj fosfata

Uticaj fosfata na raspodelu proteina podrazumeva zbirni efekt, kako njegove koncentracije, tako i pH vrednosti (Johansson, 1970; Hustedt et al., 1978; Kula, 1979). S obzirom da je većina enzima stabilna u uskom opsegu pH, prvi korak u eksperimentima sa fosfatom je bilo ispitivanje efekta upravo ove promenljive na raspodelu pektinaza (Tabela 10). Eksperimenti su izvedeni u dvofaznom sistemu sastava 7.5 % (w/w) PEG/ 7.5 % (w/w) sirovi dekstran, a komercijalni preparat je bio razblažen u puferu  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ , pH opsega 5.5 - 7.5.

Tabela 10. Uticaj pH fosfatnog pufera\*  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  na parametre raspodele endo-p i egzo-p komercijalnog preparata u model sistemu sastava 7.5 % (w/w) PEG/ 7.5 % (w/w) sirovi dekstran

pH	$V_i/V_b$	endo-p			egzo-p		
		K	Y (%)	st.preč.	K	Y (%)	st.preč.
5.5	1.54	0.33	33.74	5.49	0.24	27.02	3.85
6.0	1.64	0.38	38.49	4.92	0.23	27.47	3.32
6.5	1.73	0.60	50.89	4.80	0.65	52.89	5.31
7.0	1.73	0.73	55.77	5.69	0.76	56.76	6.65
7.5	1.83	0.90	62.26	4.72	0.55	50.21	5.14

\* koncentracija pufera je bila 6.7 mmol/l

Različite vrednosti pH fosfatnog pufera uticale su na ravnotežne zapremine gornjih i donjih faza dvofaznih model sistema, u smislu da se sa povećanjem vrednosti pH povećavala zapremina gornjih, odnosno, smanjivala zapremina gornjih faza. Povećanje vrednosti pH fosfatnog pufera favorizovalo je i

raspodelu endo-p aktivnosti u gornju fazu sistema, što je bilo praćeno i adekvatnim porastom prinosa u ovoj fazi. Tako je maksimalni dobijeni  $K_{\text{endo}}$  iznosio 0.9, a ostvaren je upravo pri najvišoj ispitivanoj vrednosti pH - 7.5, a isto se odnosilo i na vrednost prinosa u gornjoj fazi, koja je na ovoj pH vrednosti iznosila 62.26 %.

Pozitivan trend su sa povećanjem pH imali koeficijent raspodele i prinos egzo-p, ali samo do pH 7.0, a njihov pad pri pH 7.5 verovatno je bio posledica pH nestabilnosti ovog enzima. Na pH 7.0 postignuto je povećanje koeficijenta raspodele ovog enzima oko 3 puta, odnosno povećanje prinosa oko 2 puta, u odnosu na vrednosti dobijene pri pH 5.0.

Najselektivnija raspodela, odnosno najveći stepen prečišćenosti oba tipa pektinaza u gornjoj fazi sistema, ostvareni su na pH 7.0, što je, broćano izraženo, znaćilo stepen prečišćenosti 5.69 za endo-p i 6.65 za egzo-p

Dobijeni rezultati u skladu sa, u literaturi opisanim, uticajem pH u prisustvu fosfata na koeficijente raspodele nekih proteina (Hustedt et al., 1978; Kula, 1979; Shibusawa et al., 1998).

Na osnovu ovih rezultata, raspodala pektinaza pri različitim koncentracijama fosfatnog pufera je ispitivana pri pH 7.0 (Tabela 11) Sastav sistema je bio identićan onom u prethodnom eksperimentu, 7.5 % (w/w) PEG/ 7.5 % (w/w) sirovi dekstran, a koncentracija fosfatnog pufera je varirala od 0.1 do 0.4 mol/l.

Povećanje koncentracije fosfatnog pufera izazvalo je veliki porast vrednosti koeficijenta raspodele endo-p. Najveći  $K_{\text{endo}}$  dobijen je upravo pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji fosfata od 0.4 mol/l i iznosio je 4.21. U isto vreme, povećanje koncentracije fosfata smanjilo je vrednost odnosa zapremine faza. Promene ovog odnosa uslovljene promenom koncentracije fosfata su već primećene u nekim dvofaznim sistemima (Kwon et al., 1996). Međutim, pozitivan efekat, koji je povećanje koncentracije fosfata imalo na koeficijent raspodele ovog enzima, bio je više nego dovoljan za preovladavanje istovremenog negativnog uticaja na odnos zapremine, te je i prinos u gornjoj fazi sistema pratio trend koeficijenta raspodele, a najveća vrednost, 85.78 %, ostvarena je takođe pri 0.4 mol/l fosfata.

Tabela 11. Uticaj koncentracije fosfatnog pufera  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  na parametre raspodele endo-p i egzo-p komercijalnog preparata u model sistemu sastava 7.5 % (w/w) PEG/ 7.5 % (w/w) sirovi dekstran na pH 7.0

$C_{\text{fosf. pufera}}$ (mol/l)	$V_t/V_b$	endo-p			egzo-p		
		K	Y (%)	st.preč.	K	Y (%)	st.preč.
0.1	1.61	0.99	62.40	7.70	1.03	63.33	11.41
0.2	1.51	2.12	76.25	8.27	0.99	60.00	9.02
0.3	1.47	3.46	83.59	8.93	1.03	60.25	9.38
0.4	1.43	4.21	85.78	10.00	1.12	61.60	10.31

Ovakav uticaj koncentracije fosfata je zabeležen kod nekih enzima (Hustedt et al., 1978; Kroner and Kula, 1978; Andersson et al., 1985) i proteina (Umakoshi et al., 1996) i objašnjava se stvaranjem kompleksa (gela) između fosfatnih anjona i dekstrana pri višim pH, koji istiskuje enzim, odnosno favorizuje njegovu raspodelu u gornju fazu sistema (Andersson, 1986).

Za razliku od efekta koji je imala na raspodelu endo-p, promena koncentracije fosfatnog pufera gotovo da nije izazvala nikakve promene u  $K_{\text{egzo}}$  - četverostruko povećanje koncentracije dovelo je do porasta koeficijenta raspodele za oko 9 %, pa se može pretpostaviti da je koncentracija od 0.1 mol/l fosfata bila dovoljna za funkcionisanje sugerisanog mehanizma istiskivanja gelom ovog enzima.

Kako je utvrđeno da fosfat ima velikog uticaja na parametre raspodele pektinaza, bilo je značajno proveriti da li se u njegovom prisustvu menjaju udeli polimera dvofaznog sistema, koji daje optimalne rezultate raspodele. Uzimajući u obzir prethodne podatke (Tabele 10 i 11), eksperimenti raspodele su praćeni u fosfatnom puferu koncentracije 0.4 mol/l i pH 7.0 (Tabela 12).

Tabela 12. Uticaj sastava dvofaznog sistema na parametre raspodele endo-p i egzo-p komercijalnog preparata u model sistemu PEG/ sirovi dekstran u 0.4 mol/l fosfatnom puferu  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.0

PEG (%, w/w)	dekstran (%, w/w)	$V_t/V_b$	endo-p			egzo-p		
			K	Y (%)	st.preč.	K	Y (%)	st.preč.
5.0	7.5	0.54	2.47	57.26	8.10	0.69	27.23	4.27
7.5	7.5	1.49	4.14	86.02	9.19	1.02	60.26	10.31
10.0	7.5	2.18	1.26	73.36	6.37	0.52	53.19	5.36

Prisustvo fosfata pomerilo je udeo polietilen glikola pri kom se dobijaju najbolji rezultati raspodele oba tipa pektinaza, u odnosu na sistem bez fosfata (Tabela 2), ka višim vrednostima. Naime, najveće vrednosti koeficijena raspodele, prinosa i stepena prečišćenosti u gornjoj fazi su dobijene u sistemu sastava 7.5 % PEG/ 7.5 % sirovi dekstran, te se naknadno pokazalo opravdanim ispitivanje uticaja koncentracije fosfata i pH pri ovom odnosu polimera. Prisustvo fosfata je uticalo na raspodelu endo-p i egzo-p tako, da je gornju fazu sistema sa jednakim udelima oba polimera činilo najmanje hidrofobnom, bez obzira na povećan sadržaj polietilen glikola u odnosu na sistem sastava 5 % (w/w) PEG/ 7.5% (w/w) sirovi dekstran. U isto vreme, fosfat nije uticao na trend povećanja zapreminskog odnosa sa povećanjem udela polietilen glikola.

#### 4.1.4.3. Uticaj natrijum hlorida

U okviru ispitivanja delovanja soli na raspodelu pektinaza komercijalnog preparata u model sistemima, određen je i uticaj natrijum hlorida, kao jedinjenja često obrađivanog u istraživanjima ove vrste (Hustedt et al., 1978; Albertsson, 1986; Andreasen, 1994; Kuboi et al., 1995; Gunduz and Korkmaz, 2000), a interesantnog sa aspekta obezbeđenja asepticnosti tokom kultivacija mikroorganizama. Dvofazni sistem je za potrebe ovog eksperimenta sadržao 5 % (w/w) polietilen glikola i 7.5 % (w/w) sirovog dekstrana (na osnovu rezultata iz Tabele 2), a koncentracija NaCl je varirala u rasponu 5 - 37.5 mmol/l (Tabela 13).

Tabela 13. Uticaj koncentracije NaCl na parametre raspodele endo-p i egzo-p komercijalnog preparata u model sistemu sastava 5 % (w/w) PEG/ 7.5 % (w/w) sirovi dekstran

$C_{\text{NaCl}}$ (mmol/l)	endo-p			egzo-p		
	K	Y (%)	st.preč.	K	Y (%)	st.preč.
0	1.76	51.22	6.66	1.22	42.12	7.30
5.0	1.07	40.75	5.41	0.65	29.47	6.45
17.5	0.74	30.00	4.53	0.25	12.64	1.76
37.5	1.13	38.73	6.90	0.64	26.36	4.32

Dodatak soli u dvofazni sistem smanjio je koeficijente raspodele endo-p i egzo-p i njihove prinose u gornjoj fazi u manjem ili većem iznosu, u zavisnosti od primenjene koncentracije. Tako je najveći pad koeficijenata raspodele obe pektinaze bio u prisustvu 17.5 mmol/l NaCl - za oko 60 % u slučaju endo-p, odnosno za čak 80 % što se egzo-p tiče, u odnosu na sistem bez soli. Sledstveno ovome, dodatkom soli u pomenutoj koncentraciji, prinos endo-p je opao 1.7, a egzo-p 3.3 puta. Ovakav efekat NaCl na raspodele u utvrđen je kod nekoliko enzima (Hustedt et al., 1978; Kuboi et al., 1995), a karakterističan je za proteine, koji su negativno naelektrisani (Albertsson, 1986).

Uočljiv je i veliki pad stepena prečišćenosti pektinaza u gornjoj fazi pri koncentraciji NaCl od 17.5 mmol/l, koji može biti posledica smanjenog afiniteta enzima prema toj fazi, već izraženog kroz koeficijente raspodele, ali i poboljšane raspodele ostalih proteina (Kuboi et al., 1995).

#### 4.2. Kultivacija *Polyporus squamosus* u vodenim dvofaznim sistemima polietilen glikol 4000/sirovi dekstran

Uzimajući u obzir rezultate ispitivanja uticaja dužine veznih linija na raspodelu komercijalnih pektinaza, potrebu za smanjenjem masenih udela polimera u podlozi za kultivaciju motivisanu ekonomskim razlozima i visokim viskozitetom, kao i podatak, da je rast ćelija mikroorganizama optimalan u blizini binodalne krive (Kuboi et al., 1995), kultivacija *Polyporus squamosus* na pektinu u vodenom dvofaznom sistemu izvedena je pri 5 % (w/w) polietilen glikola i 4 % (w/w) sirovog dekstrana pri pH<sub>i</sub> 5.0. Koncentracija (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> u medijumu je, na osnovu rezultata uticaja ove soli na raspodelu pektinaza, bila povećana za 15 mmol/l u odnosu na onu u originalnoj podlozi (Aguilar and Huitron, 1990). Uperedo sa kultivacijom u dvofaznom sistemu, praćeni su i rast i proizvodnja pektinaza *P. squamosus*, kao i promena parametara kultivacije u kontrolnom homogenom medijumu (Slike 6 i 7).

Važno je napomenuti da je koeficijent raspodele pektinaza bio 0.25, odnosno da se većina pektina nalazila u donjoj fazi sistema.

Rast gljive tokom kultivacije u heterogenom sistemu odvijao se isključivo u donjoj, dekstranom bogatoj, fazi, a maksimalna produkcija biomase je postignuta drugog dana i bila je 4.5 puta veća od maksimalne vrednosti, postignute u kontrolnom medijumu (Slika 6a). Dan kašnjenja u dostizanju najveće vrednosti ove veličine može se objasniti adaptacijom gljive na prisustvo polimera u medijumu, mada je teško predvideti kakav će biti njihov konačni uticaj na ćelije pojedinih mikroorganizama (Andersson and Hahn-Hagerdal, 1990).

Vremenski tok promene pH u homogenom i fazama heterogenog medijuma imao je gotovo identičan trend, ali je pad pH vrednosti u dvofaznom sistemu bio nešto veći (Slika 6b). Što se tiče razlika u pH vrednostima između faza, pH gornje faze je npr. prvog dana kultivacije bio 3.77, što je bilo neznatno niže u odnosu na pH od donje faze, 4.0, a fenomen različitih pH u fazama je primećen i u dvofaznim sistemima polimer-so (Eiteman and Geiner, 1991; Sebastiao et al., 1997).

Koncentracije redukujućih šećera su prva dva dana u pojedinačnim fazama sistema bile više od one u kontrolnom medijumu (Slika 6c), ali ipak manje od vrednosti koju je sa sobom uneo sirovi dekstran (5 mg/ml). S obzirom na gotovo jednaku promenu koncentracije šećera u gornjoj i donjoj fazi, očigledno je da se, mehanizmom raspodele, uspostavljao ravnotežni odnos ovih jedinjenja tokom kultivacije, što je predstavljalo povoljniju okolnost u prvim danima, s obzirom na eventualnu kataboličku represiju, a u isto vreme je bila dobra osnova za rast gljive. Ovo poslednje je možda i bio razlog povećane produkcije biomase u dvofaznom medijumu.

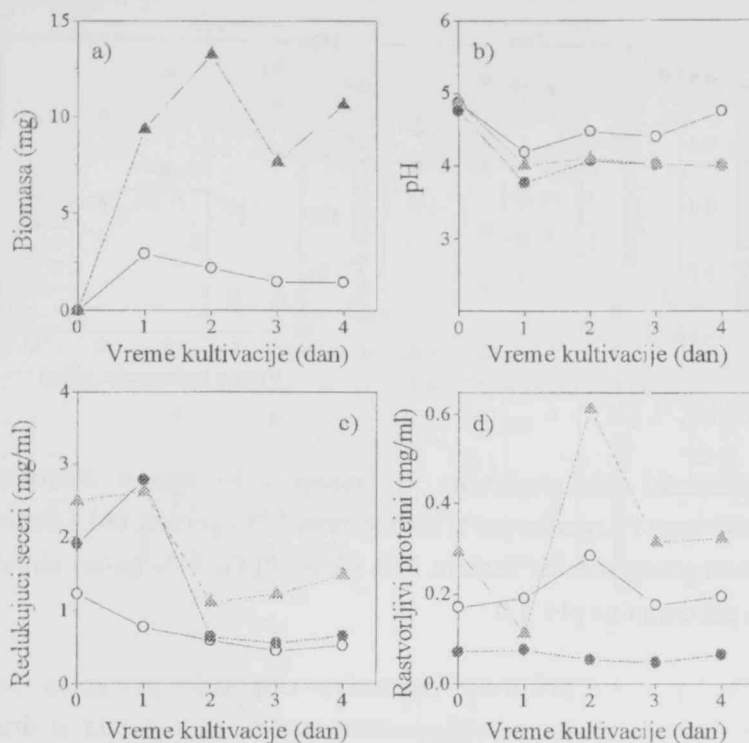
Promena koncentracija rastvorljivih proteina sa vremenom kultivacije pokazala je njihovu favorizovanu raspodelu u donju fazu sistema (Slika 6d), što je, teoretski, pružilo osnovu za postizanje većih vrednosti specifičnih aktivnosti enzima u gornjoj fazi, u odnosu na onu u homogenom medijumu.

Produkcija enzima u dvofaznom sistemu je takode kasnila u poređenju sa homogenim sistemom, ali je u vreme postizanja maksimalne vrednosti endo-p, ova aktivnost u gornjoj fazi bila 1.4 puta veća od iste u kontrolnom medijumu (Slika 7a). U isto vreme koeficijent raspodele ovog enzima je bio 1.52, a prinos u gornjoj fazi 70.86 % (Slika 8a).

Maksimalne egzo-p aktivnosti su produkovane drugog dana kultivacije, kako u kontrolnom, tako i u obe faze heterogenog medijuma (Slika 7b). Tada su vrednosti ove aktivnosti u gornjoj fazi i homogenom medijumu bile jednake, ali se većina enzima raspodelila u donju fazu - koeficijent raspodele je bio 0.6, a prinos u gornjoj fazi 48.56 % (Slika 8b).

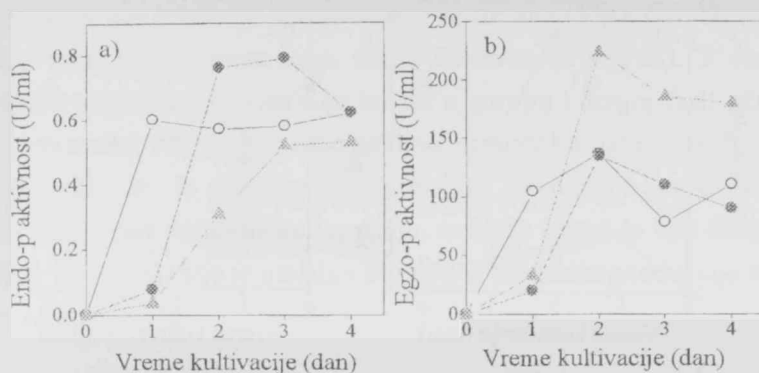
Ukupne vrednosti produkovanih endo-p aktivnosti u dvofaznom i u homogenom sistemu su, računate po danima, imale gotovo identične vrednosti (ne uzimajući u obzir prvi dan kultivacije). Tako je ukupna produkovana endo-p u homogenom sistemu drugog dana kultivacije iznosila 21.66 (U), a u obe faze heterogenog sistema 22.74 (U). Međutim, na isti način računata, proizvedena egzo-p aktivnost bila je veća u heterogenom nego u homogenom sistemu. Npr. trećeg dana kultivacije su vrednosti ukupne produkovane egzo-p aktivnosti u dvofaznom i kontrolnom medijumu bile 5400 (U), odnosno 2961 (U).





Slika 6. Vremenski tok promena a) produkovane biomase, b) pH, c) redukujućih šećera i d) rastvorljivih proteina tokom kultivacije *Polyporus squamosus* u homogenom (○) i gornjoj (●) i donjoj (▲) fazi dvofaznog medijuma sastava 5 % (w/w) PEG/ 4 % (w/w) sirovi dekstran sa pektinom na pH 5.0.

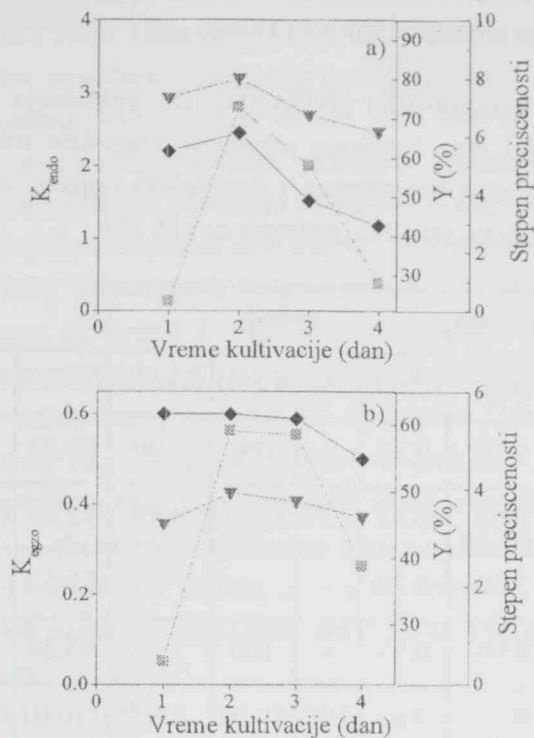
Povećana proizvodnja ovog enzima teško da se može opisati povećanoj biomasi u dvofaznom sistemu, čime se spekulisalo u nekim istraživanjima (Persson et al., 1991), s obzirom na nepromenjenu vrednost ukupne endo-p, već je verovatno posledica prisustva polietilen glikola. Naime, poznato je da ovaj polimer stupa u interakciju ćelijskom površinom i menja njenu permeabilnost (Andersson and Hahn-Hagerdal, 1990), te bi pretpostavka, da je egzo-p vezan za ćeliju, kao što je to slučaj kod *Aspergillus niger* (Aguilar et al., 1991), mogla objasniti ovu pojavu. Povećanje produkcije enzima je, kao posledica prisustva polietilen glikola, utvrđeno i za  $\alpha$ -amilazu iz *Bacillus subtilis* (Andersson et al., 1985),  $\beta$ -glukozidazu iz *Aspergillus phoenicis* (Persson et al., 1989) i hitinazu iz *Serratia marcescens* (Chen and Lee, 1995).



Slika 7. Vremenski tok produkcije a) endo-p i b) egzo-p aktivnosti tokom kultivacije *P. squamosus* u homogenom (○) i gornjoj (●) i donjoj fazi (▲) heterogenog sistema sastava 5 % (w/w) PEG/ 4 % (w/w) sirovi dekstran sa pektinom na pH, 5.0.

Slike 8a i 8b pokazuju parametre raspodele pektinaza po danima kultivacije. Najveća vrednost koeficijenta raspodele endo-p bila je drugog dana kultivacije, 2.45, dok je  $K_{\text{egzo}}$  prva tri dana bio oko 0.6. Najviše pektinaza oba tipa se ekstrahovalo u gornju fazu sistema u drugom danu kultivacije - 80.22 % endo-p, odnosno 49.83 % egzo-p, u kojoj su, u isto vreme su postignuti i najveći stepeni prečišćenosti enzima - 7.0 za endo-p i 5.19 za egzo-p. Promene parametara raspodele tokom kultivacije mogu se objasniti uticajem biomase i medijuma, kako u smislu potrošnje njegovih konstituenata, tako i proizvodnje metabolita, koji mogu uticati na fenomen raspodele direktno, ali i kroz promene ravnotežnih koncentracija polimera u fazama (Kwon et al., 1996; Planas et al., 1997).

Može se zaključiti da je kultivacija *P. squamosus* bila moguća i u vodenom dvofaznom sistemu sastavljenom od polietilen glikola 4000 i sirovog dekstrana. Rast gljive se odvijao isključivo u donjoj fazi sistema, a biomasa i produkovane endo-p i egzo-p aktivnosti su bile veće, ili jednake onima u homogenom medijumu. Sastav dvofaznog medijuma je bio takav, da je favorizovao raspodelu endo-p u gornju fazu sistema. Iako je koeficijent raspodele egzo-p aktivnosti bio manji od 1, njena vrednost u gornjoj fazi je bila jednaka onoj u kontrolnoj homogenoj kultivaciji.



Slika 8. Koeficijent raspodele (◆), prinos (▼) i stepen prečišćenosti (■) u gornjoj fazi a) endo-p i b) egzo-p tokom kultivacije *P. squamosus* u dvofaznom sistemu sastava 5 % (w/w) PEG/ 4 % (w/w) sirovi dekstran sa pektinom na pH<sub>i</sub> 5.0.

#### 4.2.1. Uticaj amonijum sulfata na raspodelu pektinaza tokom kultivacije *Polyporus squamosus*

Tokom ispitivanja uticaja amonijum sulfata, kao soli koja ulazi u sastav podloge za kultivaciju *P. squamosus*, na raspodelu pektinaza u model sistemu, utvrđen je njegov pozitivan uticaj, pri 15 mmol/l (Tabela 9). To je i bio razlog povećanja koncentracije u podlozi upravo za ovu vrednost, ili, iskazano u procentima, sa 0.2 na 0.4 %. Ipak, bilo je interesantno ispitati da li ova promena deluje na produkciju enzima, ili utiče na njihove koeficijente raspodele. Sa tim ciljem izvedene su uporedne kultivacije *P. squamosus* u homogenom i heterogenim sistemima, koji su sadržali osnovnu, originalnu, i povećanu koncentraciju (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Kultivacije su zaustavljene nakon tri dana i na osnovu analiziranih

aktivnosti izražena je njihova promena, kao i promena koeficijenata raspodele, sa povećanjem sadržaja amonijum sulfata (Tabela 14).

Tabela 14. Uticaj koncentracije  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  na produkciju endo-p i egzo-p aktivnosti, kao i njihove parametre raspodele tokom kultivacije *P. squamosus* u homogenom i dvofaznom sistemu sastava 5 % (w/w) PEG/ 4 % (w/w) sirovi dekstran na pH<sub>i</sub> 5.0

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (mmol/l)	faza*	biomasa (mg)	endo-p				egzo-p			
			(U/ml)	K	Y (%)	st preč.	(U/ml)	K	Y (%)	st. preč.
15	H	1.16	0.34	-	100	1.00	28.94	-	100	1.00
	T	0.00	0.43	2.15	81.70	3.99	72.60	0.88	64.63	11.88
	B	3.10	0.20				82.52			
30	H	0.99	0.53	-	100	1.00	45.26	-	100	1.00
	T	0.00	0.63	3.90	89.00	3.89	130.01	0.95	66.36	14.36
	B	3.52	0.16				136.29			

\*H - homogen sistem

T - gornja faza

B - donja faza

Prisustvo različitih koncentracija amonijum sulfata u dvofaznim sistemima za kultivaciju nije uticalo na raspodelu biomase, te se rast gljive odvijao isključivo u donjim fazama. Poredeći vrednosti produkovane biomase u homogenim i u heterogenim sistemima pri različitim koncentracijama amonijum sulfata, može se zaključiti da dvostruko povećanje koncentracije ove soli nije stimulisalo produkciju biomase, već da je veća vrednost bila posledica rasta gljive u dvofaznom medijumu. Naime, produkovana biomasa u homogenim sistemima pri obe koncentracije soli, izražena kao RNA, je bila oko 1 mg, a u dvofaznim sistemima sa 15 i 30 mmol/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3.1 mg, odnosno 3.52 mg, što nije predstavljalo značajniju razliku.

Međutim, dvostruko povećanje koncentracije soli je uticalo, kako na produkciju enzima, tako i na njihovu raspodelu između faza. Naime, s obzirom na činjenicu o jednakoj produkciji biomase u heterogenim sistemima sa različitim

koncentracijama ove soli, uticaj biomase na raspodelu, o kome postoje literaturni podaci (Hustedt et al., 1988; Gonzalez et al., 1990; Planas et al., 1997), je mogao biti isključen. Faktor povećanja produkcije endo-p i egzo-p, računat kao odnos aktivnosti u homogenim kultivacijama sa 0.2 % i 0.4 % amonijum sulfata, pokazao je stimulativan efekt, izražen jednakom vrednošću od 56 %, na proizvodnju oba enzima. Faktor povećanja koeficijenata raspodele izračunat je kao odnos između koeficijenata raspodele istih enzima u heterogenim sistemima sa 15 i 30 mmol/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Povećanje koncentracije soli u dvofaznom sistemu nije imalo bitnijeg uticaja na prinos i prečišćavanje endo-p u gornjoj fazi, ali je poboljšalo koeficijent raspodele 1.81 puta, kao i aktivnost u gornjoj fazi za 37 %, te se, i sa ovog stanovišta, pokazalo kao opravdano. Isto, pak, nije imalo značajnijeg uticaja na  $K_{\text{egzo}}$ , njegova vrednost se povećala za 8 %, ali se, u krajnjem ishodu, pokazalo kao pozitivno, zbog uticaja na povećanu produkciju ovog enzima. Tako je aktivnost ovog enzima u gornjoj fazi bila za 80 % veća u prisustvu 30 mmol/l amonijum sulfata, a ova koncentracija soli je doprinela i selektivnijoj raspodeli enzima u gornju fazu, što je rezultovalo povećanjem stepena prečišćenosti 1.2 puta.

#### **4.2.2. Uticaj fosfata na raspodelu pektinaza tokom kultivacije *Polyporus squamosus***

Eksperimenti raspodele u dvofaznim model sistemima pokazali su da fosfat ima velikog uticaja na parametre koji karakterišu ovaj fenomen. Srećnom okolnošću se može smatrati i činjenica da fosfati pojačavaju sekreciju fungalnih pektinaza (Peričin et al., 1992d; Antov, 1996). Imajući ovo u vidu, u sledećim kultivacijama u dvofaznim sistemima, sastava 5 % (w/w) polietilen glikol/ 4 % (w/w) sirovi dekstran, na pH<sub>i</sub> 5.0, ispitan je uticaj  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  na raspodelu pektinaza gljive *P. squamosus*.

Ukoliko bi se poštovala analogija sa rezultatom najvećeg uticaja fosfata na raspodelu endo-p u model sistemu (Tabela 11), njegova koncentracija i u dvofaznom kultivacionom medijumu bi trebala da bude 0.4 mol/l. Preliminarna istraživanja su, međutim, pokazala da prisustvo fosfata pri koncentracijama većim od 0.2 mol/l čini sistem veoma viskoznim i, stoga, nepodesnim za rast ćelija, koje proizvode enzime, kao što je to već pokazano na primeru bakterijskih ćelija

(Andersson, 1986). Ispitivanja su zato bila svedena na tri koncentracije fosfata i njihovi rezultati, posle tri dana kultivacije, su prikazani u Tabeli 15.

Tabela 15. Uticaj koncentracije fosfata na produkovanu biomasu i endo-p i egzo-p aktivnosti, kao i njihove parametre raspodele u dvofaznim sistemima sastava 5 % (w/w) PEG/ 4 % (w/w) sirovi dekstran na pH<sub>i</sub> 5.0

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (mol/l)	faza	biomasa (mg)	endo-p				egzo-p			
			(U/ml)	K	Y (%)	st.preč.	(U/ml)	K	Y (%)	st.preč.
0.1	T	0.00	0.62	3.90	89.00	5.89	130.01	0.95	66.36	14.36
	B	3.52	0.16				136.29			
0.15	T	0.00	0.34	2.12	81.49	3.02	77.85	1.04	68.35	8.89
	B	3.43	0.16				74.44			
0.20	T	0.00	0.48	∞	100	3.81	103.60	1.12	69.94	11.56
	B	4.27	nd**				92.74			

\* T - gornja faza

B - donja faza

\*\* aktivnost nije detektovana

Prisustvo fosfata nije menjalo raspodelu biomase, te se rast gljive odvijao isključivo u donjim fazama sistema. Povećanje koncentracije fosfata sa 0.1 na 0.2 mol/l je povećalo vrednost produkovane biomase za 20 %, ali je ono bilo relativno malo da bi moglo imati većeg uticaja na raspodelu pektinaza. Poznato je, naime, da povećano prisustvo biomase pogoršava koeficijent raspodele enzima (Hustedt et al., 1988; Gonzalez et al., 1990; Plasas et al., 1997).

Povećanje koncentracije fosfata u podlozi delovalo je, mada u malom stepenu, stimulatивно na koeficijent raspodele egzo-p i prinose ovog enzima u gornjoj fazi. Tako se vrednost koeficijenta raspodele povećala sa 0.95 na 1.12, a prinosa u gornjoj fazi sa 66.36 % na 69.94 %, kada je koncentracije fosfata promenjena sa 0.1 na 0.2 mol/l.

Tzv. jednostrana raspodela endo-p aktivnosti je postignuta takođe pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji fosfata od 0.2 mol/l; ti uslovi u dvofaznom

sistemu su, naime, pogodovali raspodeli celokupne produkovane aktivnosti u gornju fazu, te je u jednom ekstrakcionom koraku postignut 100 % prinos. Nedostatak doslednog trenda u ponašanju parametara raspodele endo-p može se protumačiti prisustvom još jedne neorganske soli u sistemu, a nonijum sulfata, a poznato je da pored koncentracije različitih jona, veliki uticaj na raspodelu u dvofaznim sistemima ima i njihov odnos (Albertsson, 1986).

Bez obzira što su pri 0.2 mol/l fosfata postignuti idealna raspodela endo-p i najveće vrednosti parametara, koji je karakterišu, u slučaju egzo-p, čini se da je optimalan izbor koncentracija fosfata od 0.1 mol/l. Koeficijenti raspodele oba enzima imali su dovoljno visoke vrednosti, 3.9 za endo-p, odnosno 0.95 za egzo-p, a stepeni njihovog prečišćavanja, računati kao odnos specifičnih aktivnosti u gornjoj fazi i u, uporedno vođenim kultivacijama u homogenim sistemima odgovarajuće jednakog sastava osnovne podloge, su iznosili 5.89 za endo-p i 14.36 za egzo-p, što je predstavljalo i najveće dobijene vrednosti ovog parametra. Najveća prečišćenost endo-p i egzo-p pri najmanjoj ispitivanoj koncentraciji fosfata može se objasniti, već spomenutim, odnosom soli u sistemu, koji je najviše odgovarao selektivnoj raspodeli proteina, odgovornih za ove aktivnosti, u gornju fazu.

Tabela 16. Ukupne produkovane aktivnosti endo-p i egzo-p nakon trećeg dana kultivacije *P. squamosus* u dvofaznim sistemima, sastava 5 % (w/w) PEG/ 4 % (w/w) sirovi dekstran, na pH<sub>i</sub> 5.0, pri različitim koncentracijama fosfata

koncentracija fosfata (mol/l)	ukupna produkovana aktivnost u dvofaznom sistemu	
	endo-p (U)	egzo-p (U)
0.10	21.04	5282.04
0.15	11.26	3069.67
0.20	12.96	4002.82

Pored toga, činjenica je i da je ova koncentracija fosfata u dvofaznom sistemu odgovarala produkciji najvećih vrednosti ukupnih aktivnosti oba enzima (Tabela 16). Ukupna produkovana aktivnost endo-p tipa je u sistemu sa 0.1 mol/l

fosfata bila za 87 % veća od one sa 0.15 mol/l ove soli, a 1.75 puta veća u slučaju egzo-p.

#### 4.2.3. Uticaj pH<sub>i</sub> na kultivaciju *Polyporus squamosus* u dvofaznom sistemu

Rezultati ispitivanja raspodele pektinaza u model sistemima pokazali su značajan efekt, koji je na nju imao pH. Kako su najbolji parametri raspodele komercijanih enzima, u prisustvu fosfata, dobijeni na pH 7.0 (Tabela 10), kao sledeći zadatak nametnula se potreba ispitivanja mogućnosti kultivacije *P. squamosus* u vodenom dvofaznom sistemu pri ovoj početnoj pH vrednosti. Pri tome je koncentracija fosfata, 0.1 mol/l, odgovarala vrednosti optimalne, određene u eksperimentu o uticaju fosfata na produkciju i raspodelu pektinaza (Tabele 15 i 16).

U sistemu već ustaljenog sastava, 5 % (w/w) PEG/ 4 % (w/w) sirovi dekstran, praćena je kultivacija gljive, upoređo sa kultivacijom u homogenom medijumu. I pri pH<sub>i</sub> 7.0 *P. squamosus* je rastao u donjoj, dekstranom bogatoj, fazi, a količina biomase, odnosu na kultivaciju pri pH<sub>i</sub> 5.0 (Slika 6a), je bila manja; npr. trećeg dana kultivacije vrednost produkovane biomase u kultivaciji pri pH<sub>i</sub> 7.0 je iznosila 4.32 mg, što je predstavljalo smanjenje za 77 % u odnosu na kultivaciju pri pH<sub>i</sub> 5.0. Interesantno je da je početni pH imao veći uticaj na produkciju biomase u prisustvu polimera, u odnosu na homogeni medijum; tako su vrednosti produkovane biomase u kontrolnom homogenom sistemu pri pH<sub>i</sub> 7.0 bile manje za 10 do 28 % nego pri pH<sub>i</sub> 5.0.

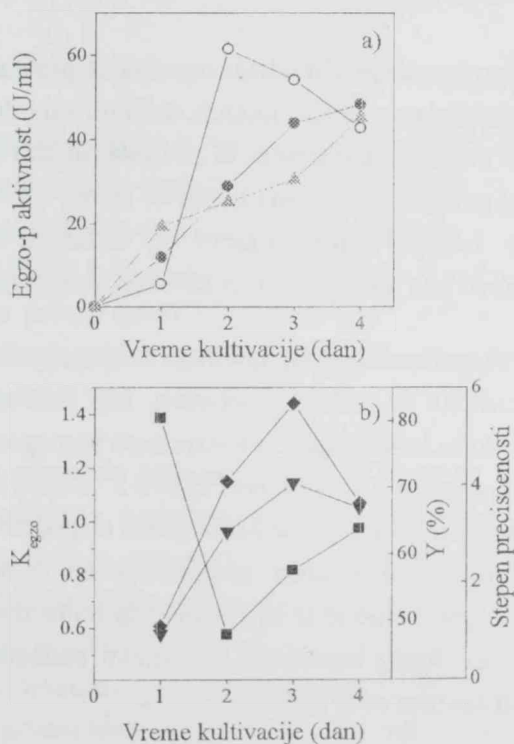
Trend promena biomase i ostalih praćenih promenljivih (pH, redukujući šećeri, proteini) nije se značajnije razlikovao od onog pri pH<sub>i</sub> 5.0 (Slika 6b,c,d), te ovi podaci neće biti prikazani. Ono što je interesantno je da endo-p aktivnost nije detektovana ni u jednoj fazi heterogenog sistema, iako se nalazila u homogenom medijumu. Produkovane egzo-p aktivnosti i promene parametara raspodele ovog enzima po danima kultivacije predstavljeni je na Slici 9.

Maksimalna izmerena vrednost egzo-p aktivnosti je u homogenom medijumu dostignuta drugog dana kultivacije, a u dvofaznom sistemu dva dana kasnije (Slika 9a). Vrednosti parametara raspodele su se, kao što je to već bio slučaj pri pH<sub>i</sub> 5.0 (Slika 8), menjale u zavisnosti od dana kultivacije (Slika 9b), a ove promene se na isti način mogu i objasniti delovanjem biomase i medijuma na



raspodelu (Kwon et al., 1996; Planas et al., 1997). Najbolji  $K_{egzo}$  (1.44) i prinos u gornjoj fazi (70.59 %) zabeleni su trećeg dana kultivacije, dok je najbolje prečišćavanje, 3.11 puta u odnosu na specifičnu aktivnost u homogenom medijumu, bilo poslednjeg praćenog dana kultivacije (ne uzimajući u obzir prvi dan zbog niskih vrednosti produkovane aktivnosti).

Veći početni pH dvofaznog medijuma poboljšao je ekstrakciju egzo-p u gornjoj fazi, u odnosu na kultivaciju pri pH<sub>i</sub> 5.0 (Slika 8b), pa je koeficijent raspodele ove aktivnosti gotovo sve vreme bio veći od 1, što nije bio slučaj sa kultivacijom pri pH<sub>i</sub> 5.0. Tako je trećeg dana kultivacije  $K$  ovog enzima iznosio 1.44, što je predstavljalo poboljšanje od 2.44 puta u odnosu na vrednost dobijenu u kultivaciji pri nižem pH<sub>i</sub>. Pri istim uslovima poboljšana je i prinos u gornjoj fazi za 45 %.



Slika 9. Vremenski tok a) produkovane egzo-p aktivnosti u homogenom (○) i gornjoj (●) i donjoj (▲) fazi heterogenog medijuna i b) koeficijent raspodele (◆), prinos (▼) i stepen prečišćenosti (■) u gornjoj fazi tokom kultivacije *P. squamosus* pri pH<sub>i</sub> 7.0

Sudeći po stepenu prečišćenosti, veći početni pH heterogenog medijuma je odgovarao i raspodeli ostalih proteina u istu fazu, te je postignuta vrednost ovog parametra, npr. drugog dana, u vreme produkcije najveće aktivnosti (Slika 9a), bila oko 2.3 puta manja pri pH<sub>i</sub> 7.0 (Slika 9b), nego pri pH<sub>i</sub> 5.0 (Slika 8b).

Povećanje K i prinosa nije bilo toliko da, u dovoljnoj meri, kompenzuje male vrednosti produkovane egzo-p aktivnosti; maksimalna vrednost je u gornjoj fazi iznosila 48.44 U/ml (Slika 9a), a pri pH 5.0 134.33 U/ml (Slika 7b), te povećanje pH<sub>i</sub> nije bilo od većeg značaja. Smanjena produkcija enzima na pri ovim pH jasna je, ako se ima u vidu da su niske vrednosti medijuma u korelaciji sa maksimalnom proizvodnjom pektinaza kod fungi (Sakai et al., 1993).

#### 4.2.4. Kultivacija *Polyporus squamosus* u dvofaznom sistemu sa izluženim repinim rezancima

Izluženi repini rezanci predstavljaju otpadak iz prehrambene industrije, a problem njihovog uklanjanja se rešava upotrebom ili u formi dodatka obrocima za ishranu krava, nakon mešanja sa melasom ili silranja, ili kao zemljišnog đubriva. S obzirom na sadržaj pektina, koji prema literaturi iznosi 1.4 - 2.0 % (Grohmann and Bothast, 1994), izluženi repini rezanci bi, dodati u dovoljnoj količini u medijum, mogli poslužiti kao jeftiniji izvor pektina od komercijalnog.

U sledećim eksperimentima su izvedene kultivacije *P. squamosus* u dva dvofazna sistema, različita po sadržaju polimera, koji su sadržali suve izlužene repine rezance, uporedo sa kultivacijom u kontrolnom homogenom medijumu. Prvi dvofazni sistem bio je sastava 7.5 % (w/w) PEG/ 7.5 % (w/w) sirovi dekstran, jer je ta kombinacija polimera dala najbolje koeficijente raspodele u prisustvu fosfata (Tabela 12). Sastav drugog dvofaznog medijuma je bio 5 % (w/w) PEG/ 4 % (w/w) sirovi dekstran i proizašao je iz eksperimenata kultivacije sa komercijalnim pektinom. Rezultati uporednog ispitivanja na osnovu podataka, dobijenih trećeg dana kultivacije, predstavljeni su u Tabeli 17.

Sastav dvofaznog sistema nije uticao na raspodelu biomase - rast gljive se odvijao isključivo u donjoj fazi sistema, ali je po morfološkim karakteristikama bio različit. U medijumu sa većim sadržajem polimera *P. suamosus* je rastao u formi peleta, dok je u drugom ispitivanom sistemu rast imao karakteristike micelnog.

Tabela 17. Uticaj udela polimera na proizvodnju i raspodelu biomase i parametre raspodele pektinaza trećeg dana kultivacije *P. squamosus* u dvofaznim sistemima sa repinim rezancima na pH<sub>i</sub> 5.0

dvofazni sistem	V <sub>i</sub> /V <sub>b</sub>	faza*	biomasa (mg)	endo-p			egzo-p		
				(U/ml)	K	Y (%)	(U/ml)	K	Y (%)
7.5% (w/w) PEG	1.35	T	0.00	0.12	∞	100	43.54	2.30	75.68
7.5% (w/w) dekstran		B	9.70	nd**			18.94		
5% (w/w) PEG	2.08	T	0.00	0.47	4.70	90.71	91.56	2.78	85.24
4% (w/w) dekstran		B	3.63	0.10			32.98		

\*T - gornja faza

B - donja faza

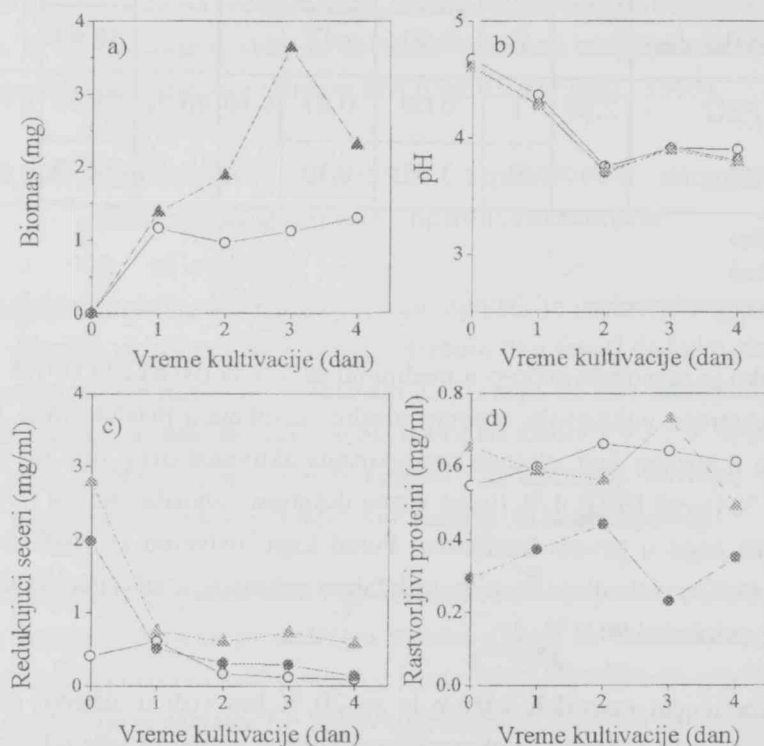
\*\* aktivnost nije detektovana

Iako je raspodela endo-p u medijumu sa 7.5 % (w/w) PEG i 7.5 % (w/w) sirovog dekstrana pokazivala osobinu idealne, celokupna produkovana aktivnost se nalazila u gornjoj fazi, ukupna produkovana aktivnost ovog tipa je, u sistemu sastava 5 % (w/w) PEG/ 4 % (w/w) sirovi dekstran, iznosila oko 14 (U) i bila je 5 puta veća nego u prvom medijumu. Pored toga, ostvaren je visok koeficijent raspodele (4.7) u sistemu sa manjim sadržajem polimera, i, iako manji od idealnog od 100 %, prinos od 90.7 %.

Koeficijent raspodele egzo-p je za 20 % bio veći u sistemu sa manjim vrednostima udela polimera, a ukupna produkovana aktivnost više od 2 puta veća nego kada je gljiva rasla u prisustvu većih vrednosti udela polietilen glikola i dekstrana. Naime, ukupna egzo-p aktivnost u sistemu 7.5 % (w/w) PEG/ 7.5 % (w/w) sirovi dekstran je iznosila 1323.4 U, dok je u medijumu sa 5 % (w/w) PEG i 4 % (w/w) sirovog dekstrana njena vrednost bila 2900 U. Iako veća 2.67 puta, količina biomase u prvom ispitivanom sistemu nije uticala na ukupne produkovane enzimске aktivnosti.

Očigledno je da visoka vrednost udela polimera nije predstavljala adekvatno okruženje za produkciju enzima od strane mikroorganizma. Njen negativan uticaj je bio iskazan kroz promenjene morfološke karakteristike rasta, koje su zapravo uticale na razlike u aktivnostima oba tipa pektinaza.

Još je jedan moment išao u prilog dvofaznog sistema sastava 5 % (w/w) PEG/ 4 % (w/w) sirovi dakstran, a to je bio odnos zapremina faza (Tabela 17), koji u ovom sistemu bio veći 1.54 puta u odnosu na onaj u prvom sistemu, a što je bilo od značaja za postizanje većeg prinosa  $\epsilon$ izo-p u gornjoj fazi (85.24 % u odnosu na 75.68 %), u jednom ekstrakcionom koraku. Jasno, je, dakle, da je za praćenje kultivacije i raspodele pektinaza odabrana heterogeni medijum upravo ovog sastava, a rezultati ovog eksperimenta su prikazani na Slikama 10 i 11.



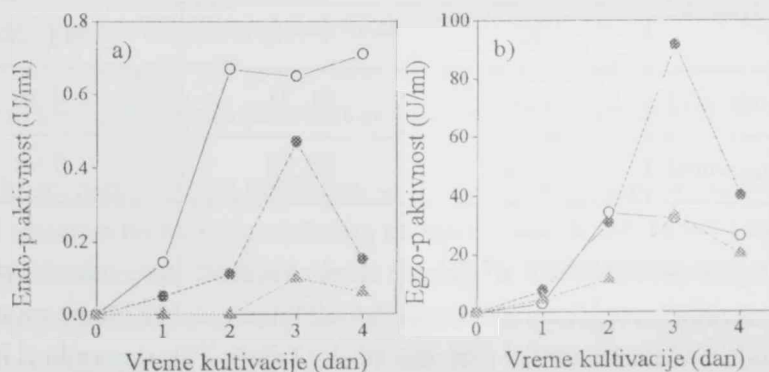
Slika 10. Vremenski tok promena a) produkovane biomase, b) pH, c) redukujućih šećera i d) rastvorljivih proteina tokom kultivacije *Polyporus squamosus* u homogenom (○) i gornjoj (●) i donjoj (▲) fazi dvofaznog medijuma sastava 5 % (w/w) PEG/ 4 % (w/w) sirovi dekstran sa repinim rezancima na pH 5.0.

Kao što je već rečeno za treći dan, rast gljive je bio ograničen u donjoj fazi sistema, a takva raspodela biomase se zadržala tokom celog praćenog toka kultivacije (Slika 10a). Maksimalna količina biomase, 3.6 mg, nalazila se u dvofaznom medijumu nakon tri dana i bila je više od tri puta veća od najveće

vrednosti dostignute u kontrolnoj homogenoj kultivaciji (1.12 mg). Posmatrano sa stanovišta vremena potrebnog za produkciju maksimalne vrednosti biomase, kultivacija u heterogenom sistemu je kasnila dva dana, što je verovatno bila posledica adaptacije gljive na prisustvo polimera.

Vremenski tok promena pH u heterogenom sistemu pokazao je pad vrednosti drugog dana kultivacije sa početnih 4.61 u gornjoj, odnosno 4.60 u donjoj fazi na 3.70 (Slika 10b), što je u odnosu na kultivaciju u medijumu sa pektinom (Slika 6b) predstavljalo jedan dan zakašnjenja. Razlike u vrednostima pH između faza i homogenog medijuma bile manje nego prilikom kultivacije sa pektinom.

Koncentracije redukujućih šećera u dvofaznom sistemu su bile veće od one u kontrolnoj podlozi (Slika 10c), što je bilo posledica činjenice da je rastvor dekstrana sadržao ova jedinjenja, pri čemu je došlo do njihove raspodele između faza, na isti način i sa istim posledicama kao i u kultivaciji sa pektinom (Slika 6c). Raspodela proteina se tokom vremena odvijala u korist donje faze (Slika 10d), a vrednost koeficijenta, koji je karakteriše, je varirala u rasponu od 0.31 do 0.78, što je predstavljalo dobar preduslov prečišćavanja pektinaza u gornjoj fazi. Međutim, prisustvo repinih rezanaca u podlozi uticalo da vrednosti koncentracije proteina u gornjoj fazi, računane po danima, budu od 4 do 9 puta veće od onih, dobijenih u kultivaciji sa pektinom (Slike 6d i 10d).



Slika 11. Vremenski tok produkcije a) endo-p i b) egzo-p aktivnosti tokom kultivacije *P. squamosus* u homogenom (○) i gornjoj (●) i donjoj (▲) fazi heterogenog sistema sastava 5 % (w/w) PEG/ 4 % (w/w) sirovi dekstran sa repinim rezancima na pH<sub>i</sub> 5.0.

Maksimalne vrednosti oba tipa pektinaza su u heterogenom medijumu produkovane nakon tri dana kultivacije - jedan dan kasnije u odnosu na homogenu kultivaciju (Slike 11a,b). Aktivnost endo-p u gornjoj fazi je u to vreme bila 1.4 manja od one u kontrolnom medijumu, ali je zato koeficijent raspodele iznosio 4.7, a prinos u gornjoj fazi 90.71 % (Tabela 18). Aktivnost egzo-p, koja se trećeg dana nalazila u gornjoj fazi sistema, bila je 3 puta veća od one u homogenom medijumu, a vrednosti koeficijenta raspodele i prinosa u ovoj fazi su bile 2.78, odnosno 85.24 %, redom (Tabela 18).

Kao i kod kultivacije u dvofaznom sistemu istog sastava, ali sa pektinom, ukupna produkovana aktivnost egzo tipa je bila veća od one u kontrolnoj kultivaciji. Npr. trećeg dana kultivacije produkovana egzo-p u heterogenom medijumu je iznosila 2900 U, a u kontrolnom, homogenom 1278 U, što je predstavljalo više nego dvostruko povećanje. Isto nije važno i za endo-p, te se može pripisati prisustvu polietilen glikola, odnosno njegovoj interakciji sa površinom ćelije, kao u slučaju dobijanja nekih enzima kultivacijom u dvofaznim sistemima (Andersso et al., 1985; Persson et al., 1989; Chen and Lee, 1995), a ne povećanoj produkciji biomase.

Tabela 18. Parametri raspodele endo-p i egzo-p trećeg dana kultivacije *P. squamosus* u dvofaznom sistemu sastava 5 % (w/w) PEG/ 4 % (w/w) sirovi destran sa repinim rezancima na pH<sub>i</sub> 5.0

	K	Y (%)	st.preč.
endo-p aktivnost	4.70	90.71	4.26
egzo-p aktivnost	2.78	85.24	7.98

Stepen prečišćenosti u gornjoj fazi, računat kao odnos specifičnih aktivnosti enzima u ovoj fazi i u homogenom medijumu je, bez obzira na povećanu koncentraciju proteina u gornjoj fazi, bio visok (Tabela 18), i za endo-p je iznosio 4.26, što je bilo nešto manje u odnosu na stepen prečišćenosti istog dana (5.0) u kultivaciji sa pektinom (Slika 8a). Što se egzo-p tiče, dobijeno prečišćavanje je u dvofaznom medijumu sa repinim rezancima bilo bolje, što je bilo izraženo kroz povećanje stepena prečišćenosti za 56% u odnosu u kultivaciji sa pektinom (Slika 8b i Tabela 18).

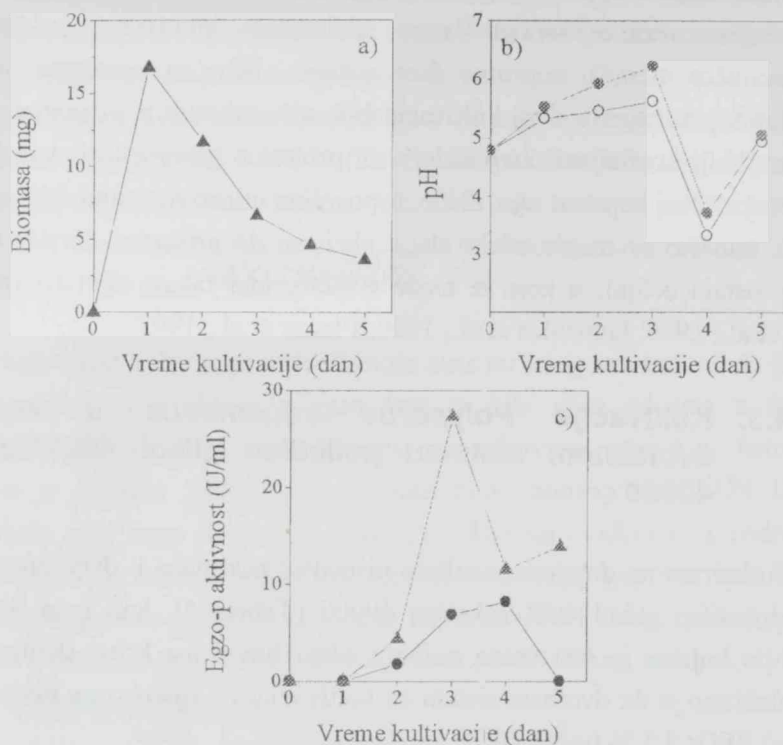
Kultivacija *Polyporus squamosus* u dvofaznom sistemu koji je sadržao izlužene repine rezance omogućila je razdvajanje biomase i pektinaza, u zadovoljavajućoj meri, u suprotne faze sistema. Iako su apsolutne vrednosti produkovanih pektinaza u ovoj kultivaciji bile niže od onih u prisustvu pektina, dobijeni su bolji koeficijenti raspodele, veći prinosi u gornjoj fazi, kao i stepen prečišćavanja. Ovaj supstrat nije, dakle, nepovoljno uticao na parametre raspodele pektinaza, kao što se moglo očekivati, s obzirom da prisustvo čvrstih materija (biomasa, ostaci ćelija), u koje se može svrstati, ima takav efekt na raspodelu (Hustedt et al., 1988; Gonzalez et al., 1990; Planas et al., 1997).

#### **4.3. Kultivacija *Polyporus squamosus* u vodenom dvofaznom sistemu polietilen glikol 4000/dekstran 40000**

S obzirom na dobijene rezultate raspodele pektinaza u dvofaznom model sistemu polietilen glikol 4000/dekstran 40000 (Tabela 4), kao i na literaturne podatke, po kojima je rast ćelija najbolji blizu binodalne krive (Kuboi et al., 1995), odabrano je da dvofazni sistem za kultivaciju *P. squamosus* bude sastava 7 % (w/w) PEG/ 7.5 % (w/w) DEX.

Rast *P. squamosus* se odvijao isključivo u donjoj fazi sistema (Slika 12a), a najveća vrednost biomase, izražene kao RNA, produkovana je već prvog dana kultivacije i iznosila je 16.88 (mg). Promene pH vrednosti tokom kultivacije su u dvofaznom sistemu i u gornjoj fazi imale gotovo identičan trend (Slika 12b), uz neznatno više vrednosti pH gornje faze. Ova razlika u pH već je registrovana u nekim dvofaznim sistemima (Eiteman and Geiner, 1991; Sebastiao et al., 1997).

Raspodela oba tipa pektinaza se menjala tokom kultivacije, što se može objasniti uticajem biomase i metabolita na sastav faza, a samim tim i na rezultate raspodele (Kwon et al., 1996; Planas et al., 1997). Produkovana egzo-p aktivnost je uglavnom nalazila u donjoj fazi (Slika 12c), a najpovoljnija raspodela je dobijena četvrtog dana kultivacije (Tabela 19) i iznosila je 0.71. Promene u raspodeli endo-p aktivnosti su bile drastičnije, tako da je se ona tokom kultivacije nalazila isključivo u jednoj od faza. Npr. trećeg dana celokupna produkovana endo-p se nalazila u gornjoj fazi sistema (Tabela 19).



Slika 12. Vremenski tok promene a) biomase, b) pH i c) egzo-p aktivnosti tokom kultivacije *P. squamosus* u gornjoj (●) i donjoj (▲) fazi i dvofaznom sistemu (○) sastava 7 % PEG (w/w)/ 7.5 % (w/w) DEX na pH<sub>i</sub> 5.0

Tabela 19. Raspodela endo-p i egzo-p aktivnosti produkovanih od strane *P. squamosus* u dvofaznom sistemu sastava 7 % PEG (w/w)/ 7.5 % (w/w) DEX na pH<sub>i</sub> 5.0

	vreme kultivacije (dan)	gornja faza	donja faza
endo-p (U/ml)	3	0.016	nd*
egzo-p (U/ml)	4	8.19	11.58

\* aktivnost nije detektovana



#### 4.3.1. Uticaj polimera na produkciju biomase i pektinaza gljive *Polyporus squamosus*

Literaturni navodi ukazuju na mogućnost uticaja polimera na rast ćelija i na proizvodnju enzima, kao što je već rečeno u teorijskom delu. Sledeći rezultati predstavljaju uticaj pojedinačnih polimera, konstituenata dvofaznog sistema, na produkciju biomase i pektinaza, a dati su uporedo sa rezultatima dobijenim u medijumu bez njih, četiri dana nakon inokulacije (Tabela 20).

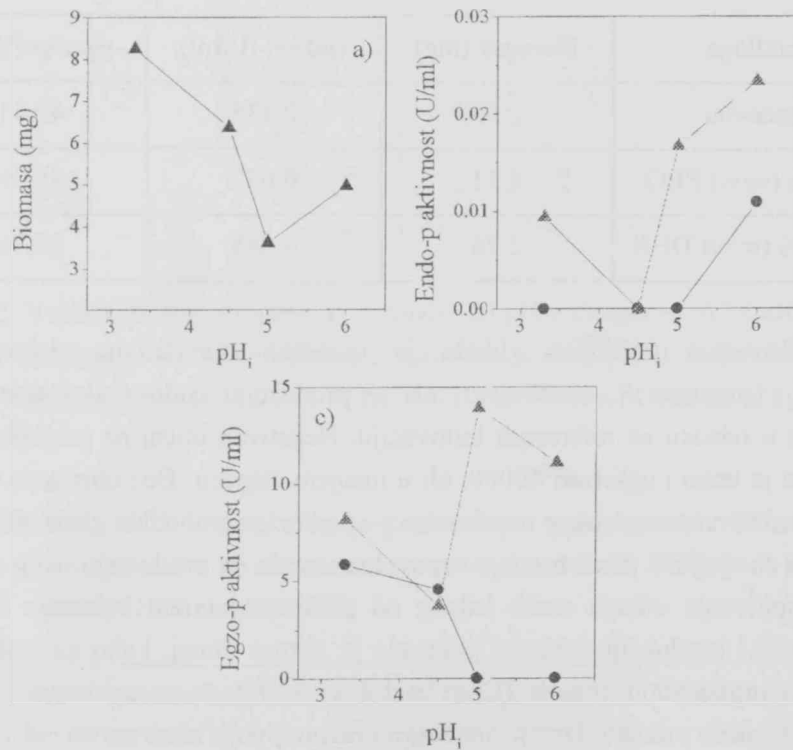
Tabela 20. Produkovane biomase i aktivnosti pektinaza nakon 4 dana kultivacije *P. squamosus* u podlozi bez PEG i DEX i podlogama sa jednim od ovih polimera na pH<sub>i</sub> 5.0

podloga	biomasa (mg)	endo-p (U/ml)	egzo-p (U/ml)
osnovna	2.55	0.135	49.11
+ 7 % (w/w) PEG	8.31	0.032	36.36
+ 7.5 % (w/w) DEX	2.76	0.085	29.76

Prisustvo polietilen glikola je izuzetno stimulatивно delovalo na produkciju biomase *P. squamosus*, ali je produkcija endo-p aktivnosti bila smanjena u odnosu na referentnu kultivaciju. Negativan uticaj na produkciju ove aktivnosti je imao i dekstran 40000, ali u manjem stepenu. Bez obzira na izvesne razlike u aktivnostima egzo-p u referentnoj i podlozi sa polietilen glikolom, moglo bi se reći da njegovo prisustvo nije nepovoljno uticalo na produkciju ovog enzima. Slično ispitivanje uticaja samo jednog od polimera na rast bakterije *Serratia marcescens* i produkciju hitinaze pokazalo je obrnut uticaj, kako na rast ćelija, tako i na proizvodnju enzima (Chen and Lee, 1995), te se analogija, u ovom slučaju, ne može pronaći. Ovo je, međutim i razumljivo, s obzirom na individualnu reakciju svakog mikroorganizma na prisustvo polimera, kao i široku paletu uticaja koje oni mogu imati (Andersson and Hahn-Hagerdal, 1990).

### 4.3.2 Uticaj inicijalnih pH vrednosti dvofaznog sistema na produkciju biomase i pektinaza *Polyporus squamosus*

Utvrđeno je da se koeficijenti raspodele nekih enzima (Hustedt et al., 1978; Kula, 1979), i, po prethodnim rezultatima, iz sistema polietilen glikol/sirovi dekstran, pektinaza (Tabela 10), u prisustvu fosfata, mogu povećati manipulacijom pH vrednostima. S obzirom da je fosfat jedan od sastojaka podloge za kultivaciju, a da su dobijene vrednosti koeficijenata raspodele pektinaza u dvofaznom sistemu PEG/DEX bile nezadovoljavajuće (Slika 12c, Tabela 19), u sledećem eksperimentu ispitan je uticaj različitih početnih vrednosti pH heterogenog medijuma na raspodelu ovih enzima i biomase (Slika 13).



Slika 13. Uticaj inicijalnog pH dvofaznog medijuma, sastava 7 % (w/w) PEG/ 7.5% (w/w) DEX, na proizvodnju i raspodelu a) biomase, b) endo-p i c) egzo-p aktivnosti u gornjoj (●) i donjoj (▲) fazi nakon pet dana kultivacije

Različite inicijalne vrednosti pH dvofaznih sistema izazvale su razlike u količini proizvedene biomase, pri čemu je najveća vrednost dobijena pri najnižem  $pH_i$  (Slika 13a). One, međutim, nisu uticale na njenu raspodelu - u svim medijumima fungalni rast je bio ograničen u donjoj fazi (Slika 13a). Povećanje početnog pH dvofaznog medijuma imalo je različit uticaj na enzimske aktivnosti - stimulatивно je delovalo na produkciju i koeficijent raspodele endo-p (Slika 13b), te je koeficijent njegove raspodele na  $pH_i$  6 iznosio 0.46, dok se negativno odrazilo na proizvedenu egzo-p aktivnost, uz favorizovanje njene raspodele u donju fazu (Slika 13c). Tako je najbolji  $K_{egzo}$  postignut pri  $pH_i$  3.3 i iznosio je 0.72.

Povećanje produkovane aktivnosti endo-p sa povećanjem  $pH_i$  ne može se u ovom slučaju objasniti niti porastom u proizvodnji biomase, jer je uticaj pH na nju bio negativan, niti eventualnom lizom ćelija, jer se u isto vreme smanjila količina proizvedene egzo-p aktivnosti. Očigledno je da je povećanje  $pH_i$  to, što je uticalo na povećanje proizvedene endo-p aktivnosti i njenog koeficijenta raspodele, a ovo poslednje je i u skladu sa podacima iz literature (Hustedt et al., 1978; Kula, 1979; Albertsson, 1986).

## 5. ZAKLJUČAK

Na osnovu izloženih rezultata i diskusije može se zaključiti sledeće:

- Ispitivanje uticaja udela polietilen glikola 4000 na raspodelu pektinaza u model sistemu pri udelu sirovog dekstrana od 7.5 % (w/w), pokazalo je negativan uticaj na parametre raspodele, pri čemu su maksimalne vrednosti  $K_{\text{endo}}$  i  $K_{\text{egzo}}$ , 1.76 i 1.22, dobijene pri 5 % (w/w) polietilen glikola. Isto je pokazalo i ispitivanje u sistemu sa dekstranom 40000 - najbolji parametri raspodele postignuti su pri najnižim ispitivanim vrednostima udela polimera, 7.5 % (w/w) PEG i 7.5 % (w/w) dekstran 40000, ali je vrednost  $K_{\text{endo}}$ , 0.22, bila niža od one u sistemu sa sirovim dekstranom, dok je  $K_{\text{egzo}}$  iznosio 2.04.
- Povećanje udela sirovog dekstrana pri konstantnoj vrednosti udela polietilen glikola od 5 % (w/w) u model dvofaznom sistemu smanjilo je parametre raspodele egzo-p, a najveća vrednost koeficijenta raspodele, 0.79, dobijena je pri 3 % (w/w) dekstrana, pri čemu je 62.04 % ove aktivnosti bilo raspodeljeno u gornju fazu sistema, uz stepen prečišćenosti 5.50. Najbolji koeficijent raspodele endo-p je postignut u sistemu sastava 5 % (w/w) PEG/5 % (w/w) sirovi dekstran i iznosio je 2.43.
- Sa povećanjem dužine veznih linija u model dvofaznom sistemu polietilen glikol 4000/sirovi dekstran opadali su, kako koeficijenti raspodele pektinaza, tako i njihovi prinosi u gornjoj fazi. Najbolji koeficijenti raspodele i prinosi u gornjoj fazi za oba enzima dobijeni su na najkraćoj ispitivanoj veznoj liniji dužine 7.44 % i iznosili su 1.66 i 60.85 % za endo-p, odnosno 0.95 i 47.07 % za egzo-p.
- Povećanje odnosa zapremina faza na istoj veznoj liniji smanjilo je koeficijente raspodele endo-p i egzo-p aktivnosti, kao i njihove stepene prečišćenosti, a u isto vreme povećalo prinose u gornjoj fazi model sistema, sastavljenog od polietilen glikola 4000 i sirovog dekstrana. Tako su na veznoj liniji, dužine 13.98 %, pri  $(V_t/V_b)=0.1$  dobijeni  $K_{\text{endo}}$  1.62 i

$K_{\text{egzo}}$  1.04, a pri  $(V_i/V_b)=3$  najveći prinosi oba enzima u gornjoj fazi sistema, 70.33 % i 68.65 %.

- Na veznoj liniji, dužine 7.44 %, koja je bila najbliža binodalnoj krivi, u model sistemu polietilen glikol 4000/sirovi dekstran, oba tipa pektinaza su pokazala optimalno ponašanje - povećanje odnosa zapremina faza povećalo je prinose u gornjoj fazi, ali nije, u istoj meri, i smanjilo njihove koeficijente raspodele.
- Dodatak amonijum sulfata i natrijum sulfata u model sistem polietilen glikol 4000/sirovi dekstran, u koncentracijama od 15 mmol/l povećao je koeficijent raspodele endo-pektinaze 1.25, odnosno 1.2 puta, a koeficijent raspodele egzo-p je u prisustvu 15 mmol/l amonijum sulfata i 5 mmol/l natrijum sulfata bio za 60% veći.
- Najveće vrednosti koeficijenata raspodele pektinaza u model sistemu polietilen glikol 4000/sirovi dekstran, u prisustvu fosfatnog pufera  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ , dobijene su na pH 7.5 za endo-p (0.90), a na pH 7.0 za egzo-p (0.76). Najbolja raspodela endo-p ostvarena je na pH 7.0 pri koncentraciji fosfata od 0.4 mol/l - koeficijent raspodele je iznosio 4.21, uz prinos 85.78 % i stepen prečišćenosti 10 u gornjoj fazi sistema. Vrednosti koncentracije fosfata iznad 0.1 mol/l nisu imale značajnijeg uticaja na raspodelu egzo-p. Prisustvo fosfata povećalo je vrednost udela polietilen glikola, pri kojoj se dobijaju najbolji rezultati raspodele pektinaza, na 7.5 % (w/w).
- Kultivacija *Polyporus squamosus*, sa pektinom kao inducerom, je bila moguća u vodenom dvofaznom sistemu sastavljenom od polietilen glikola 4000 i sirovog dekstrana, pri čemu je ostvareno odvajanje biomase od pektinaza njihovom raspodelom u suprotne faze. U sistemu sastava 5 % (w/w) polietilen glikol/4% (w/w) sirovi dekstran količina produkovane biomase je bila 4.5 puta veća od one u homogenom medijumu, ukupne egzo-p aktivnosti 1.82 puta veća, a endo-p aktivnosti jednaka onoj u homogenom medijumu. Koeficijent raspodele endo-p je drugog dana kultivacije iznosio 2.45, a prinos u gornjoj fazi 80.22 %, uz stepen prečišćenosti 7. U isto vreme, ostvaren je  $K_{\text{egzo}}$  od 0.6, prinos u gornjoj fazi oko 50 % i stepen prečišćenosti egzo-p 5.19. Kultivacija gljive *P. squamosus* je bila moguća i u dvofaznom sistemu polietilen glikol

4000/dekstran 40000, uz raspodelu biomase u donju fazu sistema, ali se sistem sa sirovim dekstranom po količini produkovane aktivnosti i parametrima raspodele pokazao kao bolji izbor.

- <sup>25</sup> Ispitivanje uticaja amonijum sulfata tokom kultivacije *Polyporus squamosus* u dvofaznom sistemu, sastava 5% (w/w) polietilen glikol 4000/ 4% (w/w) sirovi dekstran, na raspodelu pektinaza, pokazalo je da je povećanje koncentracije ove soli u medijumu za 15 mmol/l trećeg dana kultivacije povećalo koeficijent raspodele endo-p za 81 %, vrednost aktivnosti u gornjoj fazi za 37 %, a da nije uticalo na raspodelu biomase *P. squamosus*. Pod istim uslovima aktivnost egzo-p u gornjoj fazi je bila 1.8 puta veća, dok je stepen prečišćenosti u gornjoj fazi bio bolji za 20 %.
- <sup>26</sup> Pri ispitivanim koncentracijama fosfata od 0.1 do 0.2 mol/l rast *P. squamosus* se odvijao u donjoj fazi sistema 5 % (w/w) polietilen glikol/ 4 % (w/w) sirovi dekstran, a pri 0.2 mol/l postignuta je njeno idealno razdvajanje od endo-pektinaze, pri čemu je koeficijent raspodele egzo-p iznosio 1.12. Najveća količina produkovanih aktivnosti endo i egzo tipa je ostvarena pri 0.1 mol/l fosfata, 21.04 U i 5282.04 U, dok su koeficijenti raspodele endo-p i egzo-p u ovim uslovima bili 3.9 i 0.95, uz najveće ostvarene stepene njihove prečišćenosti u gornjoj fazi- 5.89 i 14.36, redom.
- <sup>27</sup> Kultivacija *P. squamosus* je ostvarena i u dvofaznom sistemu koji je sadržao suve izlužene repine rezance. U sistemu sastava 5 % (w/w) polietilen glikol/ 4 % (w/w) sirovi dekstran, rast gljive je bio ograničen u donjoj fazi sistema, a koeficijenti raspodele su iznosili 4.70, odnosno 2.78, za endo-p, odnosno egzo-p. Prinosi oba enzima u gornjoj fazi su u jednom ekstraktivnom koraku iznosili 90.71 % za endo-p i 85.24 % za egzo-p, uz stepene prečišćenosti 4.26 i 7.98, redom.

## 6. LITERATURA

1. Abbot, N.L., Blankschtein, D. and Hatton, T.A. (1990). *Bioseparation*, 1: 191-225.
2. Acuna-Arguelles, M.E., Gutierrez-Rojas, M., Viniestra-Gonzalez, G. and Favela-Torres, E. (1995). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43: 808-814.
3. Aguilar, G. and Huitron, C. (1986). *Enzyme Microb. Technol.*, 9: 541-545.
4. Aguilar, G. and Huitron, C. (1987). *Enzyme Microb. Technol.*, 9: 690-696.
5. Aguilar, G. and Huitron, C. (1990). *Biotechnol. Lett.*, 12: 655-660.
6. Aguilar, G., Trejo, B.A., Garcia, J. M. and Huitron, C. (1991). *Can. J. Microbiol.* 37: 912-917.
7. Albertsson, P.-A. (1970). *Adv. Protein Chem.*, 24: 309-341.
8. Albertsson, P.-A. (1986). *Partition of Cell Particles and Macromolecules* (1986). 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.
9. Albertsson, P.-A., Cajarville, A., Brooks, D.E. and Tjerneld, F. (1987). *Biochim. Biophys. Acta*, 926: 87-93.
10. Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M.J. and Serra, J.L. (1998). *Process Biochem.*, 33: 21-28.
11. Andersson, E., Mattiasson, B. and Hahn-Hagerdal, B. (1984). *Enzyme Microb. Technol.*, 6:301-306.
12. Andersson, E., Johansson, A-C. and Hahn-Hagerdal, B. (1985). *Enzyme Microb. Technol.*, 7: 333-338.

13. Andersson, E. (1986). Bioconversions in aqueous two-phase systems, Ph. Thesis, Lund University, Lund.
14. Andersson, E. and Hahn-Hagerdal, B. (1990). *Enzyme Microb. Technol.*, 12: 242-254.
15. Angelova, M.B., Bukarov, I.V. and Gligorov, N.S. (1986). *C. Rendus Acad. Bulg. Sci. Biol. Microbiol.*, 40: 93-95.
16. Antov, M. (1996). Magistrarski rad, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
17. Andreasen, P.A. (1994). *J. Chromatogr. A*, 664: 99-103.
18. Annis, S.L. and Goodwin, P.H. (1997). *Europ. J. Plant Pathol.*, 103: 1-14.
19. Bailey, M.J. and Pessa, E. (1990). *Enzyme Microb. Technol.*, 12: 266-271.
20. Baracat-Pereira, M.C., Coelho, J.L.C., Minussi, R.C., Chaves-Alves, V.M., Brandao, R.L. and Silva, D.O. (1999). *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 76: 129-141.
21. Barbier, M. and Thibault, J.-F. (1982). *Phytochemistry*, 21: 111-115.
22. Bateman, D.F. (1972). *Physiol. Plant Pathol.*, 2: 175-184.
23. Behere, A., Satyanarayan, V. and Padwaldesai, S.R. (1993). *Enzyme Microb. Technol.*, 15: 158-161.
24. Beveridge, T. (1997). *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 37: 449-469.
25. Bhide, A.A., Patel, R.M., Joshi, J.B. and Pangarkar, V.G. (1995). *Sep. Sci. Technol.*, 30: 2989-3000.
26. Birkenmeier, G., Vijayalakshmi, M.A., Stigbrand, T., Kopperschlager, G. (1991). *J. Chromatogr.*, 539: 267-277.
27. Blazquez, G., Camacho, F., Gonzalez-Tello, P. and Alarcon, F.J. (1998). *Biochim. Biophys. Acta*, 1379: 191-197.
28. Burczyk, J. and Hyrc, K. (1992). *J. Plant Physiol.*, 140: 66-69.



29. Cabezas, Jr., H. (1996). *J. Chromatogr. B*, 680: 3-30.
30. Cary, J.W., Brown, R., Cleveland, T.E., Whitehead, M. and Dean, R.A. (1995). *Gene*, 153: 129-133.
31. Carlsson, M., Berggren, K., Linse, P., Veide, A. and Tjerneld, F. (1996). *J. Chromatogr. A*, 756: 107-117.
32. Cervone, F., de Lorenzo, G., Degra, L., Salvi, G. and Bergami, M. (1987). *Plant Physiol.*, 85: 631-637.
33. Chen, J.-P. and Lee, M.-S. (1995). *Enzyme Microb. Technol.*, 17: 1021-1027.
34. Cole, K.D. (1993). *J. Agric. Food Chem.*, 41: 334-340.
35. Cooke, R.D., Ferber, C.E.M. and Kanagasabapathy, L. (1976). *Biochim. Biophys. Acta*, 452: 440-451.
36. Edmond, E. and Ogston, A.G. (1968). *Biochem. J.*, 109: 569.
37. Edmond, E. and Ogston, A.G. (1970). *Biochem. J.*, 117: 85.
38. Eiteman, M.A. and Gainer, J.L. (1991). *Chem. Eng. Commun.*, 105: 171-183.
39. Eiteman, M.A. (1995a). Hydrophobic and Charge effects in the partitioning of solutes in aqueous two-phase systems, in: *Aqueous Biphasic Separations: Biomolecules to Metal Ions*, (eds) Rogers, R.D. and Eiteman, M.A., Plenum Press, New York, 31-48.
40. Eiteman, M.A. (1995b). *Sep. Sci. Technol.*, 30: 2509-2518.
41. Ekblad, L., Jergil, B. and Gierow, J.P. (2000). *J. Chromatogr. B*, 743: 397-401.
42. Estela da Silva, M. and Teixeira Franco, T. (2000). *J. Chromatogr. B*, 743: 287-294.

43. Fan, W., Bakir, U. and Glatz, C.E. (1998). *Biotechnol. Bioeng.*, 59: 461-470.
44. Flory, P.J. (1941). *J. Chem. Phys.*, 9: 660.
45. Flory, P.J. (1942). *J. Chem. Phys.*, 10: 51.
46. Fogarty, W.M. and Kelly, C.T. (1983). Pectic Enzymes, in: *Microbial Enzymes and Biotechnology*, (ed) Fogarty, W., Applied Science Publishers, London, 131-182.
47. Fonseca, M.J.V. and Said, S. (1994). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42: 32-35.
48. Fonseca, M.J.V. and Said, S. (1995). *World J. Microb. Biotechnol.*, 11: 174-177.
49. Fraissinet-Tachet, L., Reymond-Cotton, P. and Fevre, M. (1995). *Curr. Genet.*, 29: 96-99.
50. Fraissinet-Tachet, L. and Fevre, M. (1996). *Curr. Microbiol.*, 33: 49-53.
51. Furuya, T., Iwai, Y., Tanaka, Y., Uchida, H., Yamada, S. and Arai, Y. (1995). *Fluid Phase Equil.*, 110: 115-128.
52. Furuya, T., Yamada, S., Zhu, J., Yamaguchi, Y., Iwai, Y. and Arai, Y. (1996). *Fluid Phase Equil.*, 125: 89-102.
53. Garg, N., Galaev, I.Y. and Mattiasson, B. (1996). *J. Mol. Recognit.*, 9: 259-274.
54. Gaube, J., Pfennig, A. and Stumpf, M. (1993). *Fluid Phase Equil.*, 83: 365-373.
55. Giorno, L., Donato, L., Todisco, S. and Drioli, E. (1998). *Sep. Sci. Technol.*, 33: 739-756.
56. Gonzalez, M., Pena, C. and Casas, L.T. (1990). *Process Biochem.*, 25: 157-161.

57. Grohmann, K. and Bothast, R.J. (1994). Pectin-Rich Residues Generated by Processing of Citrus Fruits, Apples, and Sugar Beets, in: *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Productions*, (eds) Himmel, M.E., Baker, J.O. and Overend, R.P., ACS Symposium Series # 566, American Chemical Society, Washington, D.C., 372-390.
58. Grossmann, C., Tintinger, R. and Maurer, G. (1993). 8th International Conference on Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems, Leipzig, August 22-27.
59. Grossmann, C. and Maurer, G. (1995). *Fluid Phase Equil.*, 106: 17-25.
60. Grossmann, C., Tintinger, R., Zhu, J. and Maurer, G. (1995a). *Fluid Phase Equil.*, 106: 111-138.
61. Grossmann, C., Tintinger, R., Zhu, J. and Maurer, G. (1995b). *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, 99: 700-712.
62. Guan, Y., Lilley, T.H. and Trefry, T.E. (1993). *Macromolecules*, 26: 3971.
63. Guevara, M.A., Gonzalez-Jaen, M.T. and Estevez, P. (1997). *Can. J. Microbiol.*, 43: 245-253.
64. Gunduz, U. and Korkmaz, K. (2000). *J. Chromatogr. B*, 743: 255-258.
65. Hagarova, D. and Brier, A. (1995). *Gen. Physiol. Biophys.*, 14: 277-291.
66. Hassinen, C., Kohler, K. and Veide, A. (1994). *J. Chromagr. A.*, 668: 121-128.
67. Hartounian, H., Sandler, S.I. and Kaler, E.W. (1994a). *Ind. Eng. Chem. Res.*, 33: 2288-2293.
68. Hartounian, H., Kaler, E.W. and Sandler, S.I. (1994b). *Ind. Eng. Chem. Res.*, 33: 2294-2300.
69. Hayashida, K., Kunimoto, K., Shiraishi, F., Kawakami, K. and Arai, Y. (1990). *J. Ferment. Bioeng.*, 69: 240-243.

70. Haynes, C.A., Benitez, F.J., Blanch, H.W. and Prausnitz, J.M. (1993). *AIChE J.*, 39: 1539-1557.
71. Hernandez, T., Ausin, N., Bartolome, B., Bengoechea, L., Estrella, I. and Gomez-Cordoves, C. (1997). *Z. Lebensm. Unters Forsch. A*, 204: 151-155.
72. Hill, T.L. (1957). *J. Am. Chem. Soc.*, 79: 4885.
73. Hill, T.L. (1959). *J. Chem. Phys.*, 30: 93.
74. Hernandez-Justiz, O., Fernandez-Lafuente, R., Terreni, M. and Guisan, J.M. (1998). *Biotechnol. Bioeng.*, 59:73-79.
75. Honig, W. and Kula, M.-R. (1976). *Anal. Chem.*, 72: 502-512.
76. Hotha, S. and Banik, R.M. (1997). *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 69: 5-19.
77. Howe, A.F., Groom, T. and Carter, R.G. (1964). *Anal. Biochem.*, 9: 443-453.
78. Huggins, M.L. (1942). *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 43: 1.
79. Hustedt, H., Kroner, K.H., Stach, W. and Kula, M.-R. (1978). *Biotechnol. Bioeng.*, 20: 1989-2005.
80. Hustedt, H., Kroner, K.-H., Papamichael, N. (1988). *Process Biochem.*, 23: 129-137.
81. Ilieva, M., Kojuharova, A., Pavlov, A., Mihneva, M. and Shterev, I. (1995). *Biotechnol. and Biotechnol. Eq.*, 9: 71-76.
82. Ilieva, M.P., Bakalova, A., Mihneva, M., Pavlov, A. and Dolapchiev, L. (1996). *Biotechnol. Bioeng.*, 51: 488-493.
83. Isgrove, F.H., Williams, R.J.H., Niven, G.W. and Andrews, A.T. (1998). *J. Chromatogr. A*, 711: 91-96.
84. Iwasaki, K.J., Inoue, M. and Matsubara, Y. (1998). *Biosci. Biotech. Biochem.*, 62: 262-267.

85. Jain, S., Durand, H. and Tiraby, G. (1990). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34: 308-312.
86. Johansson, G. (1970). *Biochim. Biophys. Acta*, 221: 387-390.
87. Johansson, H.-O., Karlstrom, G. and Tjerneld, F. (1997). *Colloid Polym. Sci.*, 275: 458-466.
88. Johnston, D.J. and Williamson, B. (1992a). *Mycol. Res.*, 96: 343-349.
89. Johnston, D.J. and Williamson, B. (1992b). *FEMS Microb. Lett.*, 97: 19-24.
90. Johnston, D.J., Williamson, B. and McMillan, G.P. (1994). *J. Exp. Bot.*, 45: 1837-1843.
91. Kang, C.H. and Sandler, S.I. (1987). *Fluid Phase Equil.*, 38: 245-272.
92. Kapat, A., Zimand, G. and Elad, Y. (1998). *Mycol. Res.*, 102: 1017-1024.
93. Kasche, V. and Galunsky, B. (1995). *Biotechnol. Bioeng.*, 45: 261-267.
94. Karakatsanis, A., Liakopoulou-Kyriakides, M. and Stamatoudis, M. (1997). *Starch*, 49: 194-199.
95. Kaul, R. and Mattiasson, B. (1986). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24: 259-265.
96. Keen, N.T. and Horton, J.C. (1966). *Can. J. Microb.*, 12:443-453.
97. Kempken, F. (1999). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52: 756-760.
98. Kester, H.C.M. and Visser, J. (1990). *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 12: 150-160.
99. Kim, C.W. (1986). PhD Thesis, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge.
100. Kim, Y.-J. and Weigand, W.A. (1992). *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 34/35: 419-430.

101. Kitano, H., Maeda, Y., Yamamoto, M. and Izumida, R. (1996). *Macromol. Chem. Phys.*, 197: 4173-4181.
102. Kollar, A. (1998). *Mycol. Res.*, 102: 313-319.
103. Kopperschlager, G and Birkenmeier, G. (1990). *Bioseparations*, 1: 235-254.
104. Kopperschlager, G. and Kirchberger, J. (1996). *J. Chromatogr. B*, 684: 25-49.
105. Kroner, K.H., Hustedt, H., Granda, S. and Kula, M.-R. (1978). *Biotechnol. Bioeng.*, 20: 1967-1988.
106. Kroner, K.H. and Kula, M.-R. (1978). *Process Biochem.*, 13: 7-9.
107. Kuboi, R., Umakoshi, H. and Komazawa, I. (1995). *Biotechnol. Prog.*, 11: 202-207.
108. Kula, M.-R. (1979). *Appl. Biochem. Bioeng.*, 2: 71-95.
109. Kwon, Y.J., Kaul, R. and Mattiasson, B. (1996). *Biotechnol. Bioeng.*, 50: 28-290.
110. Lantz, P.-G., Matsson, M., Wadstrom, T. and Radstrom, P. (1997). *J. Microbiol. Methods*, 28: 159-167.
111. Lang, C. and Dornenburg, H. (2000). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53: 366-375.
112. Larsson, M. and Mattiasson, B. (1988). *Biotechnol. Bioeng.*, 31: 979-983.
113. Leone, G. and van den Heuvel, J. (1987). *Can. J. Bot.*, 65: 2133-2144.
114. Levin, L. and Forchiassin, F. (1998). *Acta Biotechnol.*, 18: 157-166.
115. Liakopoulou-Kyriakides, M., Karakatsanis, A. and Stamatoudis, M. (1996). *Starch*, 48: 291-294.
116. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.

117. Macašek, F., Bartoš, P. and Gerhart, P. (1998). *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 229: 87-89.
118. Maldonado, M., Stresser, A. and Callieri, D. (1989). *Curr. Microbiol.*, 18: 303-306.
119. Maldonado, M., Stresser, A. and Callieri, D. (1994). *Curr. Microbiol.*, 128: 193-196.
120. Marcos, J.C., Fonseca, L.P., Ramalho, M.T. and Cabral, J.M.S. (1998). *J. Chromatogr. B*, 711: 295-299.
121. Mattiason, B. and Ling, T.G.I. (1980). *J. Immunol. Methods*, 41: 217-223.
122. McMillam, Jr., W.G. and Mayer, J.E. (1945). *J. Chem. Phys.*, 13: 276.
123. Medin, A.S. and Janson, J.-C. (1993). *Carbohydr. Polymers*, 22: 127.
124. Miller, G.L. (1959). *Anal. Chem.*, 31: 426-428.
125. Min, R.W., Rajendran, V., Larsson, N., Gorton, L., Planas, J. and Hahn-Hagerdal, B. (1998). *Anal. Chem. Acta*, 366: 127-135.
126. Moldavski, N. and Cohen, S. (1996). *Biotechnol. Bioeng.*, 52: 529-537.
127. Moresi, M., Petruccioli, M. and Federici, F. (1991). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34: 742-748.
128. Morre, D.M. and Morre, D.J. (2000). *J. Chromatogr. B*, 743: 377-387.
129. Mukataka, S., Haynes, C.A., Prausnitz, J.M. and Blanch, H.W. (1992). *Biotechnol. Bioeng.*, 40: 195-206.
130. Munro, H.N. and Fleck, A. (1966). *Analyst*, 91: 78-88.
131. Nguyen, A.-L., Grothe, S. and Luong, J.H. (1988). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27: 341-346.
132. Norling, B., Zarka, A. and Boussiba, S. (1997). *Physiol. Plant.*, 99: 495-504.

133. Otto, A. and Birkenmeier, G. (1993). *J. Chromatogr.*, 644: 25-33.
134. Pacek, A.V., Ding, P., Nienow, A.W. and Wedd, M. (2000). *Carbohydr. Polymers*, 42: 401-409.
135. Pardo, C., Lapena, M.A. and Gacto, M. (1991). *Can. J. Microbiol.*, 37: 974-977.
136. Pedersen, L.H., Skouboe, P., Rossen, L. and Rasmussen, O.F. (1998). *Lett. Appl. Microbiol.*, 26: 47-50.
137. Peričin, D., Jarak, M., Petrović, D., Vujičić, B., Antov, M. and Đ. Karlović (1990). The European Federation of Biotechnology-Symposium on Physiological Aspects of Product Formation by Filamentous Fungi, Gozd Martuljek, Abstracts, P-29 (70).
138. Peričin, D., Karlović, Đ. and Jarak, M. (1992a). *Mikrobiologija*, 29: 57-63.
139. Peričin, D., Škrinjar, M., Filip, S., Karlović, Đ. and Keveršan, S. (1992b). *Mikrobiologija*, 29: 87-95.
140. Peričin, D., Keveršan, S., Banka, L., Antov, M. and Škrinjar, M (1992c). *Biotechnol. Lett.*, 14: 127-130.
141. Peričin, D., Jarak, M., Antov, M., Vujičić, B. and Keveršan, S. (1992d). *Lett. Appl. Microbiol.*, 14: 275-278.
142. Peričin, D., Jarak, M., Antov, M. and Dozet, B. (1994). *Helvia*, 17: 21-30.
143. Peričin, D., Ružić, N., Antov, M., Dimić, N. and Markov, S. (1996). Dobijanje i primena mikrobioloških pektinaza u fermentacionim tehnologijama, u: *Savremeni trendovi u proizvodnji alkoholnih i bezalkoholnih pića*, (urednici) Jović, S. i Bukvić, B., Poslovna zajednica "Vrenje", Beograd, 105-128.
144. Peričin, D., Antov, M., Dimić, N. and Vujičić, B. (1997). *Biotechnol. Techniques*, 11: 833-836.
145. Peričin, D., Antov, M. and Popov, S. (1998-1999). *APTEFF*, 29-30: 183-189.



146. Persson, I., Tjerneld, F. and Hahn-Hagerdal, B. (1989). *Biotechnol. Techniques*, 3: 265-270.
147. Persson, I., Tjerneld, F. and Hahn-Hagerdal, B. (1991). *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 27: 9-25.
148. Pfennig, A., Schwerin, A. and Gaube, J. (1998). *J. Chromatogr. B*, 711: 45-52.
149. Pimenta-Braz, P.N., Ricardo-da-Silva, J.M. and Laureano, O. (1998). *Z. Lebensm. Unters Forsch. A*, 206: 14-20.
150. Planas, J., Radstrom, P., Tjerneld, F. and Hahn-Hagerdal, B. (1996). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45: 737-743.
151. Planas, J., Lefebvre, D., Tjerneld, F. and Hahn-Hagerdal, B. (1997). *Biotechnol. Bioeng.*, 54: 303-311.
152. Priest, F.G. (1983). Enzyme Synthesis: Regulation and Process of Secretion by Microorganisms, in: *Microbial Enzymes and Biotechnology*, (ed) Fogarty, W.M., Applied Science Publishers Ltd, London, 319-366.
153. Polizeli, M.L.T.M., Jorge, J.A. and Terenzi, H.F. (1991). *J. Gener. Microbiol.*, 137: 1815-1823.
154. Pulliam, T.R., Winston, S. and Bentley, W.E. (1997). *Enzyme Microb. Technol.*, 20, 46-51.
155. Reignault, P., Mercier, M., Bompeix, G. and Boccara, M. (1994). *Microbiology*, 140: 3249-3255.
156. Revilla, I. and Gonzalez-SanJose, M.L. (1998). *Food Chem.*, 63: 307-312.
157. Riou, C., Freyssinet, G. and Fevre, M. (1991). *Appl. Environ. Microb.*, 57: 1478-1484.
158. Rito-Palomares, M. and Lyddiatt, A. (1996). *J. Chromatogr. B*, 680: 81-89.
159. Rito-Palomares i Cueto, L. (2000). *J. Chromatogr. B*, 743: 5-12.

160. Rogalski, J., Szczodrak, J., Glowiak, G., Pleszczinska, M., Szczodrak, Z. and Wiater, A. (1998). *Acta Biotechnol.*, 18: 63-75.
161. Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J. and Vandamme, E. (1993). *Adv. Appl. Microbiol.*, 39: 213-294.
162. Sargantanis, I.G. and Karim, M.N. (1997). *Ind. Eng. Chem. Res.*, 36: 204-211.
163. Sarubbo, L.A., Oliveira, L.A., Porto, A.L.F., Duarte, H.S., Carneiro-Leao, A.M.A., Lima-Filho, J.L., Campos-Takaki, G.M. and Tambourgi, E.B. (2000). *J. Chromatogr. B*. 743: 79-84.
164. Sebastiao, M.J., Martel, P., Baptista, A., Petersen, S.B., Cabral, J.M.S. and Aires-Barros, M.R. (1997). *Biotechnol. Bioeng.*, 56: 248-257.
165. Shibusawa, Y., Kihira, S. and Ito, Y. (1998). *J. Chromatogr. B*, 709: 301-305.
166. Shinmyo, A., Davis, J.K., Nomoto, F., Tahara, T. and Enatsu, T. (1978). *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 5: 59-68.
167. Solano-Castillo, C. and Rito-Palomares, M. (2000). *J. Chromatogr. B*, 743: 195-201.
168. Solis, S., Flores, M.E. and Huitron, C. (1990). *Biotechnol Lett.*, 12: 751-756.
169. Solis, S., Flores, M.E. and Huitron, C. (1996). *Lett. Appl. Microbiol.*, 23: 36-42.
170. Solis-Periyra, S., Favela-Torres, E., Viniestra-Gonzalez, G. and Gutierrez-Rojas, M. (1993). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 39: 36-41.
171. Solis-Peryira, S., Favela-Torres, E., Gutierrez-Rojas, M., Roussos, S., Sacedo-Castaneda, G., Gunasekaran, P. and Viniestra-Gonzalez, G. (1996). *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 12: 1-8.
172. Stratilova, E., Markovič, O., Škrovinova, D., Rexova-Benkova, L. and Jorvall, H. (1993). *J. Prot. Chem.*, 12: 15-22.

173. Szlag, D.C. and Giuliano, K.A. (1988). *Biotechnol. Techniques*, 2: 277.
174. Taguchi, F., Yamada, K., Hagesawa, K., Taki-Saito, T. and Hara, K. (1996). *J. Ferment. Bioeng.*, 82: 80-83.
175. Taragano, V., Sanchez, V.E. and Piloso, A.M.R. (1997). *Biotechnol. Lett.*, 19: 233-236.
176. Tintinger, R., Zhu, J., Grossmann, C. and Maurer, G. (1997a). *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, 101: 687-697.
177. Tintinger, R., Zhu, J., Grossmann, C. and Maurer, G. (1997b). *J. Chem. Eng. Data*, 42: 975-984.
178. Tjerneld, F., Persson, I., Albertsson, P.-A., Hahn-Hagerdal, B. (1985). *Biotechnol. Bioeng.*, 27: 1036-1043.
179. Tong, A., Wu, Y., Li, L., Akama, Y. and Tanaka, S. (1997). *Anal. Sci.*, 13: 111-114.
180. Tuttobello, R. and Mill, P.J. (1961). *Biochem. J.*, 79: 51-57.
181. Umakoshi, H., Yano, K., Kuboi, R. and Komazawa, I. (1996). *Biotechnol. Prog.*, 12: 51-56.
182. Venancio, A., Almeida, C. and Teixeira, J.A. (1996). *J. Chromatogr. B*, 680: 131-136.
183. Vladitiu, A.O. and Vladitiu, G.D. (1995). Isoenzymes, in: *Molecular Biology nad Biotechnology*, (ed) Meyers, F.A., VCH Publishers, 479-482.
184. Whitehead, M.P., Shieh, M.T., Cleveland, T.E., Cary, J.W. and Dean, R.A. (1995). *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 3316-3322.
185. Wu, Y.-T., Lin, D.-Q. and Zhu, Z.-Q. (1998), *Fluid Phase Equil.*, 147: 25-43.
186. Yakoby, N., Kobilier, I., Dinoor, A. and Prusky, D. (2000). *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 1026-1030.

187. Zaslavsky, B. Yu., Miheeva, L.M., Aleschko-Ozhevski, P., Mahmudov, A.U., Bagirov, T.O. and Garaev, E.S. (1988). *J. Chromatogr.*, 439: 267-281.

188. Zijlstra, G.M., de Gooijer, C.D. and Tramper, J. (1998). *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9: 171-176.

## 7. SKRAĆENICE I OZNAKE

B	donja faza vodenog dvofaznog sistema
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	ciklo adenzin monofosfat
DEX	dekstran 40000
egzo-p	egzo-pektinaza
endo-p	endo-pektinaza
H	homogen sistem
K	koeficijent raspodele
PEG	polietilen glikol 4000
pH <sub>i</sub>	početni pH
RNA	ribonukleinska kiselina
st.preč.	stepen prečišćenosti u gornjoj fazi sistema
T	gornja faza vodenog dvofaznog sistema
w <sup>t</sup>	maseni udeo dekstrana u ili polietilen glikola u gornjoj fazi
w <sup>b</sup>	maseni udeo dekstrana u ili polietilen glikola u gornjoj fazi
Y	prinos enzima u gornjoj fazi sistema

