

## Abstract

### ELECTROSPINNING TECHNOLOGY

Vera Obradović, Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Karnegijeva 4, 1120 Belgrade, Serbia

Electrospinning represents a technology for producing polymer nanofibers which is becoming popular in 21<sup>st</sup> century. It has not yet been investigated completely and its research is a great challenge for scientists around the world. Electrospinning is a widely used technology for electrostatic formation of fibers with the usage of electrical forces. The produced polymer fibers are in diameter between 2 nm and several micrometers, and they are obtained from polymer solutions or melts of natural and synthetic polymers.

The history of electrospinning and the description of the set-up parts for electrospinning are included in this work. The impact of the process parameters and solution parameters on the fiber morphology and the results of the performed experiments with the PVB-SiO<sub>2</sub> composite fibers are presented here. In the end, the summary of the applications of electrospun fibers is given.

## ЛИТЕРАТУРА

1. N. Bhardwaj, S.C. Kundu, Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique, *Biotechnology Advances* 28 (2010) 325-347.
2. J. J. Stanger, Master Thesis, University of Canterbury, 2008.
3. S. Zhnag, Master Thesis, Graduate Faculty of North Carolina State University, 2009.
4. S. Chakraborty, I. Liao, A. Adler, K. W. Leong, Electrohydrodynamics: A facile technique to fabricate drug delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (2009) 1043-1054.
5. V. Jacobs, R. D. Anandjiwala, M. Maaza, The influence of electrospinning parameters on the structural morphology and diameter of electrospun nanofibers, *Journal of Applied Polymer Science* 115(5) (2010) 3130-3136.
6. A. Baji, Y. Mai, S. Wong, M. Abtahi, P. Chen, Electrospinning of polymer nanofibers: Effects on oriented morphology, structures and tensile properties, *Composites Science and Technology* 70 (2010) 703-718.
7. D. H. Reneker, I. Chun, Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning, *Nanotechnology* 7 (1996) 216-223.
8. W. Teo, S. Ramakrishna, Electrospun nanofibers as a platform for multifunctional, hierarchically organized nanocomposite, *Composites Science and Technology* 69 (2009) 1804-1817.
9. S. Karra, Master Thesis, Texas A&M University, 2007.



Наташа БОЖИЋ, Универзитет у Београду, ИХТМ-Центар за хемију, (е-пошта: nbozic@chem.bg.ac.rs)

## ХИДРОЛИЗА СИРОВОГ СКРОБА - НОВИ ПРАВЦИ

Побољшање процеса деполимеризације зрна скроба до глюкозе кључни је фактор у смањењу енергетске пошрошће у биоконверзији глюкозе у индустријски важна једињења. Код процеса производње диоетанола ови кораци обухватају 10-20% укупне енергетске пошрошће. Потребда за смањењем енергетске пошрошће могла би да се задовољи заменом процеса ензимске хидролизе на високој температури у течной фази, процесом ензимске хидролизе на нижим температурама и на чврстој фази. Овај процес још назван и хладна хидролиза представља корак напред у зеленој технологији за производњу диоетанола, те последњих година у свету расте интерес за развојем оваквој технологија.

### УВОД

Скроб је природни, обновиви и биодеградабилни полимер који се налази у многим биљкама у којима представља резервну енергију. Скроб је други најзаступљенији биоматеријал у природи [1], те је јефтина сировина за производњу глюкозних, фруктозних и малтозних сирупа, као и за добијање различитих производа њиховом ферментацијом, нпр. састојака хране, органских киселина, биогорива, и других индустријски важних производа.

Деполимеризација гранула скроба до глюкозе резултат је хидролизе  $\alpha$ -1,4- и  $\alpha$ -1,6-веза између мономера глу-

козе. Од њеног открића 1813. године, па све до седамдесетих година прошлог века за овај процес коришћена је кисела хидролиза. Међутим, употреба киселине на високим температурама (120-150 °C) што је неопходно за овај процес, поред тога што је скупа, доводи до кородирања процесне опреме и стварања нежељених нус-производа уз ограничени принос жељеног производа [2]. Данас се зато за хидролизу скроба примењује ензимска хидролиза при високој температури. Употреба ензима омогућена је проналаском природно постојећих термостабилних бактеријских и гљивичних ензима. Ензимски процес се састоји из три основна корака, Слика 1. У првом кораку 30%-на (по маси) суспензија скроба се кува у присуству амилазе на 90-165 °C, затим се охлади по потреби и термостатира на 90 °C 1-3 сата, а затим охлади на 60 °C и дода глюкоамилаза.

Конвенционална конверзија скроба у глюкозу је ензимски катализован процес хидролизе при високим температурама, а тако висок енергетски утрошак резултује у повећању трошкова добијања производа из скроба. Кључни фактор за развој ефикаснијих процеса са бољим искоришћењем природних ресурса и оптимизованом потрошњом енергије, односно алтернатива ензимском процесу на високој температури, представља могућност употребе ензима који су способни да хидролизују сирови скроб, Слика 1. Штавише, како је енергет-



**Слика 1.** Схематски приказ конвенционалне и алтернативне ензимске хидролизе скроба по фазама. Примененом ензима који хидролизују сирови скроб елиминишу се почетни кораци загревања на високим температурама.

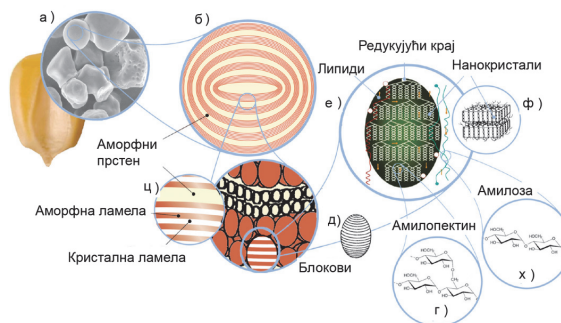
ски ефикаснија алтернатива снижавање температуре процеса конверзије скроба у глукозу то је употреба ових ензима нарочито пожељна на температурама нижим од температуре гелирања скроба, које су нпр. 54 °C за пшеницу, 60 °C за кромпир и 65 °C за кукуруз [3]. Овај алтернативни процес познат је у литератури као хладна хидролиза скроба. Процес је познат још од другог светског рата [4,5] али му се већа пажња придаје од скоро. Неколико фабрика за производњу биоетанола из кукуруза постоје данас у Сједињеним Америчким Државама [6]. Описани процеси одвијају се на температурама од 40 °C - 65 °C [2].

## СТРУКТУРА СКРОБА

Сирови скробови су грануле које могу бити сферне, полиедарске или лентикларне. Скроб из одређене биљке може имати унидуларну или бимодуларну дистрибуцију (јечам, раж, пшеница). Величина гранула скроба варира од < 110 nm код кромпира, < 30 nm код пшенице, < 25 nm код кукуруза итд [2].

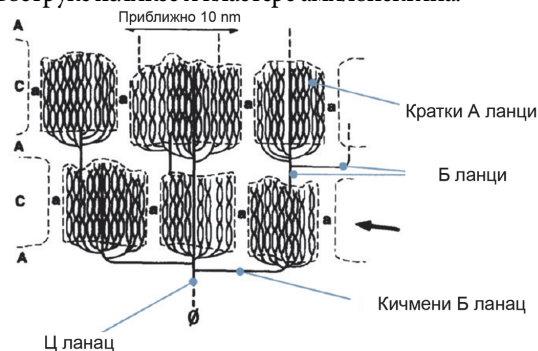
Структура скроба је предмет истраживања дуги низ година и због своје комплексности још увек не постоји опште прихваћен модел. Па ипак, током последње деценије тзв. модел вишескалне структуре почиње да бива доминантан захвањујући истраживањима коришћењем скенирајуће електронске микроскопије [1]. Према овом моделу, Слика 2, гранула скроба (а) се састоји из растућих прстенова (б) који се састоје од блокова (д) изграђених од аморфних и кристалних ламела (ц) које садрже амилопектинске (г) и амилозне (х) ланце.

Већина скробних гранула се састоје из наизменичних ламела аморфних и семикристалних региона [7], као и комплекса липид-амилоза [8]. Структура нелипидне фазе је последица организације амилопектина чији ланци и гране пролазе кроз ламеле. Молекулска структура расте од једне кичме односно Ц ланца који садржи једну редукујућу групу у близини центра грануле до радијалног кластера паралелних ланаца (А и Б) који су повезани α-1,6 гранама [9,10], Слика 3. А ланци су по-



**Слика 2.** Структура скроба: (а) грануле кукурузног скроба (30 μm), (б) аморфни и семикристални региони тј. прстенови (120-500 nm), (ц) аморфне и кристалне ламеле (9 nm), увеличани детаљи семикристалних региона, (д) блокови (20-50 nm) конститутивна јединица прстена, (е) двоструки хеликси амилопектина који формирају кристалне ламеле блокова, (ф) нанокристали: други облик кристалне ламеле назван нанокристал када се изолује киселом хидролизом, (г) молекулска структура амилопектина, и (х) молекулска структура амилозе (0.1-1 nm) [1].

везани једном, а Б ланци са два или више других ланаца, Слика 3. Ово нам омогућава идеализовани модел структуре скроба који илуструје једноструке хеликсе амилозе и двоструке хеликсе и кластере амилопектина.



**Слика 3.** Амилопектински кластер модел [1].

Скробови житарица садрже и лизофосфолипиде и слободне масне киселине од 0,5-1% суве масе [11]. Липиди се налазе као слободни или у виду инклузионих комплекса са амилозом. На површини дехидратисаних или влажних гранула скроба посматраних скенирајућом електронском микроскопијом уочавају се депресије које су код скроба из кукуруза насумично дистрибуиране, док су код скробова пшенице и јечма дистрибуиране у виду екваторијалних кластера. Могуће је да су то места архитектонски подложна дејству ензима.

Хидролиза сировог скроба може да прати неколико могућих рута: 1) локална дигестија на површини гранула, 2) центрипетална дигестија дуж ланаца полимера скроба, 3) дигестија по вештачки створеним пукотинама и 4) дифузија кроз структуру скроба до места подложних хидролизи. Дифузија ензима кроз ултраструктуру грануле без дигестије, услед разлике у величини ензима и пора на скробу није могућа, те произилази да ензим мора иницијално да креира пукотине.

## ЕНЗИМСКИ СИНЕРГИЗАМ

До сада је познато неколико ензимских синергија за ефикасну дигестију сировог скроба, и то је најчешће комбинација ендо- и екзо-амилаза [2]. Ефикасност у хидролизи се објашњава чињеницом да када амилазе дејствују у смеси, сваки пут када ендо-амилаза хидролизује скроб, ослобађа већи број супстратних места за екзо-делујуће амилазе, чиме се убрзава конверзија скроба [12]. Ово је показано на растворном скробу, а важи и за сирови скроб, нарочито у каснијим фазама дигестије - када је већина скроба постала растворна. Ипак, и у почетним фазама хидролизе сировог скроба, каталитичким дејством оба ензима у смеси, долази до физичке дезинтеграције структуре скроба и тиме излагања нових супстратних места подложних хидролитичком дејству оба ензима.

## ПРЕДНОСТИ И НЕДОСТАЦИ ПРОЦЕСА ХЛАДНЕ ХИДРОЛИЗЕ СКОРОБА

Од бројних предности процеса хладне хидролизе скроба могу се издвојити следеће [13]:

1. Уштеда енергије, воде и хемикалија.
2. Мања почетна инвестиција у фабричко постројење услед интегрисања више подпроцеса у производњи.
3. Већи укупан принос биоетанола, јер на нижим температурама не долази до Maillard-ових реакција, чији производи инхибирају квасац који ферментира глукосу у етанол.
4. Мање нежељених продуката као што су глицерол и виши алкохоли, јер се шећери постепено ослобађају, а тиме се смањује и осмотски шок.
5. Повећање квалитета сувог остатка које се користи као сточна храна због нижих температура процесавања.

Наравно, и овај процес као и сви други има и неке недостатке као што су:

1. Већа потрошња ензима услед отежане хидролизе сировог скроба на хладно.
2. Већа подложност микробиолошким контаминацијама које се у конвенционалним поступцима добијања биоетанола елиминишу грејањем.

Бројни су начини побољшавања технологије производње биоетанола, односно бројне су области чијим развојем се може утицати на виши крајњи квалитет производа, од којих су неке и овде наведене [13]:

1. Биљна биотехнологија: развој житарица које имају ген за експресију амилазе.
2. Молекуларна биологија: генетске манипулације микроба у циљу добијања сојева који експримују ензиме за хидролизу скроба.
3. Микробиологија: разумевање метаболичких механизма и адаптације ћелија квасца толерантних на високе концентрације етанола.
4. Ензимска технологија: протеински инжињеринг за развој ензима са побољшаним деловањем на сирови скроб.
5. Процесни инжињеринг: интегрисање процесних корака нпр. симултана сахарификација и ферментација.

## ЕНЗИМИ КОЈИ ХИДРОЛИЗУЈУ СИРОВИ СКОРОБ

Ензими који хидролизују сирови скроб укључују  $\alpha$ -амилазе, глукоамилазе, глукозидазе, изоамилазе,  $\beta$ -амилазе, циклодекстрин-гликозилтрансферазе итд. Постоје две фамилије ендо-амилаза: (1)  $\alpha$ -амилазе које насумично хидролизују  $\alpha$ -1,4-везе између суседних глукоза у полимерима амилозе и амилопектина тако да настају декстрини и (2) изоамилазе које хидролизују  $\alpha$ -1,6-везе на местима гранања у амилопектину [14]. Екзо-ензими хидролизују терминалне везе, почевши од нередукујућег краја полимера глукозе. Глукоамилазе на овај начин продукују  $\beta$ -глукозу хидролизујући и  $\alpha$ -1,4- и нешто спорије  $\alpha$ -1,6-везе. Глукозидазе ослобађају  $\alpha$ -глукозу хидролизом  $\alpha$ -1,4-веза, док  $\beta$ -амилазе продукују  $\beta$ -малтозу, а малтогене  $\alpha$ -амилазе  $\alpha$ -амилозу.

До сада је познато више примера  $\alpha$ -амилаза које могу директно да хидролизују сирови скроб на температурама нижим од температуре гелирања, али малом броју ових природно идентификованих ензима су идентификовани и контролни гени који су затим и пребачени у неки погоднији хетерологни систем за експресију [2]. Идентификација оптималних амилаза зависи од супериорних кинетичких могућности ензима као што су активност, стабилност, инхибиција и сл. и није једноставан процес, јер многе врсте продукује мултипле форме  $\alpha$ -амилаза од којих немају све исту ефикасност за хидролизу сировог скроба, а и скробови, у зависности од тога из које биљке потичу, различито су подложни хидролизи.

Примера ради, сирови скробови из житарица се комплетније и брже хидролизују него скробови из кртола и корења када је реч о дигестији једним, пречишћеним ензимом. Даље, већина до данас описаних  $\alpha$ -амилаза које су способне да хидролизују сирови скроб, своју ефикасност тешко испољавају на кромпировом скробу, а како су кукуруз, пшеница и кромпир најважнији извори скроба у Европи, ензими који су способни за ефикасну хидролизу ових типова скроба су економски атрактивнији, нарочито у погледу развоја такозваних зелених процеса производње коришћењем обновљивих ресурса. На ефикасност хидролизе утиче и тип ензима, концентрација ензима, реакционо време, температура, присуство инхибитора и сл [15].

Један такав ензим способан за директну хидролизу различитих сирових скробних гранула са високом ефикасношћу је  $\alpha$ -амилаза детектована у соју *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a. Овај ензим је прво продукован, а затим пречишћен и окарактерисан [16]. Показано је да се ген састоји из 1452 базна пара, односно да кодира протеин од 483 аминокиселине. Поређењем аминокиселинских секвенција овог соја са другим  $\alpha$ -амилазама *Bacillus* sp. из доступних база података утврђен је висок степен идентичности.

## ЕКСТРАЦЕЛУЛАРНА ПРОДУКЦИЈА РЕКОМБИНАНТНЕ $\alpha$ -АМИЛАЗЕ

У циљу добијања амилаза из *Bacillus* sp. у великим количинама оверекспресија у неком добро познатом ре-

комбинантном домаћину је предност. *Escherichia coli* је до данас најједноставнији и један од најкоришћенијих експресионих система и домаћин је избора за синтезу рекомбинантних протеина на великој скали [17]. С напредком генетских стратегија превазиђени су и специфични изазови везани за одређене протеине, чиме је проширен спектар употребе *E. coli* експресионих система. Ови системи се одавно примењују за продукцију потпуно активних протеина унутарћелијски, и много ређе, ванћелијски [18,19]. Најважније предности секреције рекомбинантних протеина у ферментациони медијум или периплазму су:

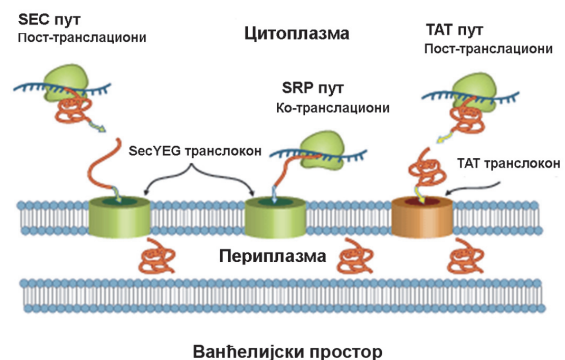
- бржи тзв. „downstream processing“, односно пречишћавање производа,
- већа стабилност и растворљивост производа,
- већа биолошка активност и квантитативније увијање и процесовање добијеног протеина.

Секреција протеина код *E. coli* је комплексан процес јер протеини морају да прођу кроз две мембране посредством једног од могућих најмање пет механизма транслокације од којих у сваком учествује неколико протеина. За продукцију рекомбинантних протеина најчешће се користе експортни системи тип I и II. Тип II, Слика 4, је двостепени процес који може да се одвија преко три могућа пута, од којих је SRP (скраћеница од назива на енглеском: signal recognition particle) зависан пут релативно скоро описан, а показано је да сигналне секвенције (као што је секвенција за протеин DsbA) које потпомажу ко-транслациону транслокацију побољшавају и транслокацију хетерологних протеина [20]. Стога циљање рекомбинантних прекурсора у ко-транслациони (SRP) зависан пут, Слика 5, за последицу има значајно веће нивое периплазматичних протеина, него када се они диригују пост-транслационо преко SecYEG транслоказе [21]. SRP је рибонуклеопротеин који препознаје N-терминалну сигналну секвенцију протеина док се он синтезује на рибозому и води га до плазма мембране прокариотске ћелије. Због свега наведеног, а и како је то релативно нов и не толико експлоатисан, овај систем је погодан за тестирање екстрацелуларне рекомбинантне продукције α-амилазе из *B. licheniformis*.

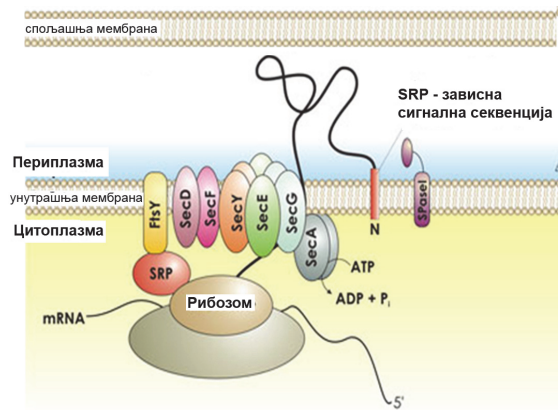
Ген за α-амилазу (amy) из *B. licheniformis* може да се клонира и експримује у *E. coli* унутарћелијски и ванћелијски коришћењем различитих плазмидних конструкта, нпр. pET21a(+) експресионог вектора који је под контролом T7 промотера (унутарћелијски) и pDA експресионог вектора под контролом trc промотера (ванћелијски), Слика 6. Овај други представља нови приступ за развој система за екстрацелуларну продукцију рекомбинантних протеина, а секреција генског производа тригерована је фузијом за сигнални пептид DsbA протеина.

Пречишћени ензим има рН оптимум (6,5), температурни оптимум (90°C) и високу ефикасност за хидролизу раличитих сирових скрובה испод температуре гелирања скрובה упоредиву са нативним ензимом.

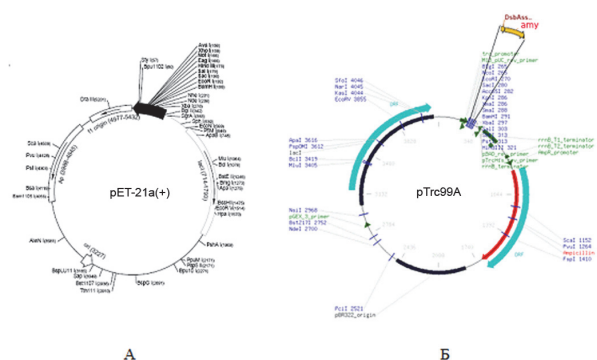
Потенцијал способности рекомбинантне амилазе за хидролизу сирових скрובה испитан је праћењем пораста хидролизе сирових кукурузних, кромпирових, ренових и пшеничних скробних гранула у кратком временском року. Ефикасност је потврђена и посматрањем скробних гранула пре и после хидролизе под светлосним микроскопом, где је јасно уочено смањење броја гранула, а видљива су и оштећења на постојећим зрнима, Слика 7.



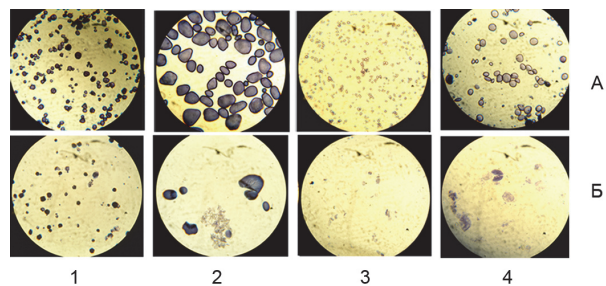
Слика 4. Пuteви секреције протеина код *E. coli* експортног система типа II



Слика 5. SRP-посредован ко-транслациони експорт протеина код *E. coli*



Слика 6. Плазмидни конструкти за експресију α-амилазе. А) pET21a(+) експресиони вектор, Б) pDA-amy експресиони вектор.



Слика 7. Скробне грануле А) пре и Б) после хидролизе посматране под светлосним микроскопом. 1) кукурузни, 2) кромпиров, 3) ренов и 4) пшенични скроб

## ЗАКЉУЧАК

Кључни фактор за развој ефикаснијих процеса са бољим искоришћењем природних ресурса и оптимизованом потрошњом енергије, односно алтернатива ензимском процесу хидролизе скроба на високој температури, представља могућност употребе ензима који су способни да хидролизују сирови скроб на температурама испод температура гелирања скроба.

Један такав ензим способан за директну хидролизу различитих сирових скробних гранула са високом ефикасношћу је  $\alpha$ -амилаза детектована у соју *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a.

Ген за овај ензим је клониран у *E. coli*, а коришћењем DsbA сигналне секвенције постигнута је ефикасна секреција рекомбинантне  $\alpha$ -амилазе. Особине рекомбинантног ензима који поседује особине нативног ензима укузују на добар потенцијал употребе приступа базираног на сигналној секвенцији за DsbA протеин у екскреторној продукцији потпуно активних рекомбинантних ензима.

Рекомбинантна  $\alpha$ -амилаза високо је ефикасна у хидролизи сировог скроба чиме потврђује висок потенцијал за зелени процес производње биоетанола.

**Abstract**

### COLD HYDROLYSIS OF STARCH – NEW TRENDS

**Nataša BOŽIĆ**, University of Belgrade, ICTM-Center of Chemistry, (e-mail: nbozic@chem.bg.ac.rs)

Improved depolymerization of grain starch to glucose is crucial for reduction of energy use in the bioconversion of glucose to industrially important compounds. In fuel ethanol production, these steps use 10-20% of the energy content of the fuel ethanol. The need to minimize energy use can be met by replacing high-temperature, liquid-phase, enzymatic digestion with low temperature, solid-phase, enzymatic digestion. Also called cold hydrolysis, the approach is a step

toward a “green” method for the production of fuel ethanol, and because of this there has been increased recent world interest in this approach.

## ЛИТЕРАТУРА

1. D. Le Corre, J. Bras, A. Dufresne, *Biomacromolecules* 11 (2010) 1139.
2. G. H. Robertson, D. W. S. Wong, C. C. Lee, K. Wagschal, M. R. Smith, W. J. Orts, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 353.
3. S. Rahman, *Food Properties Handbook*, CRC Press: Boca Raton 1995.
4. A. K. Balls, S. Schwimmer, *J. Biol. Chem.* 156 (1944) 203.
5. S. Schwimmer, *J. Biol. Chem.* 161 (1945) 219.
6. D. Berven, *Ethanol Producer* 11 (2005) 67.
7. G. T. Oostergetel, E. F. J. van Bruggen, *Carbohydr. Polym.* 21 (1993) 7.
8. K. R. Morgan, R. H. Fumeaux, N. G. Larsen, *Carbohydr. Res.* 276 (1995) 387.
9. R. F. Tester, J. Karkalas, X. Qi, *J. Cereal Sci.* 39 (2004) 151.
10. R. F. Tester, J. Karkalas, X. Qi, *World's Poult. Sci. J.* 60 (2004) 186.
11. W. R. Morrison, D. L. Mann, W. Soon, A. M. Coventry, *J. Sci. Food Agric.* 26 (1975) 507.
12. W. J. Wang, A. D. Powell, C. G. Oates, *Bioresour. Technol.* 55 (1996) 55.
13. A. M. Castro, L. R. Castilho, D. M. G. Freire, *Biomass Conv. Bioref.* 1 (2011) 245.
14. D. W. S. Wong, G. H. Robertson,  $\alpha$ -Amylases. In *Handbook of Food Enzymology*, Chapter 56, Eds. J. R. Whitaker, A. G. J. Voragen, D. W. S. Wong, Marcel Dekker: New York, 2002.
15. A. Kimura, J. F. Robyt, *Carbohydr. Res.* 277 (1995) 87.
16. N. Božić, J. Ruiz, J. López-Santín, Z. Vujčić, *Biochem. Eng. J.* 53 (2011) 203.
17. J.-M. Puertas, B.L. Nannenga, K.T. Dornfeld, J.-M. Betton, F. Baneyx, *Prot. Exp. Purif.* 74 (2010) 122.
18. F. Baneyx, *Curr. Opin. Biotechnol.* 10 (1999) 411.
19. F. J. Mergulhao, D. K. Summers, G. A. Monteiro, *Biotechnol. Adv.* 23 (2005) 177.
20. D. Steiner, P. Forrer, M. T. Stumpp, A. Pluckthun, *Nat. Biotechnol.* 4(7) (2006) 823.
21. C. F. Schierle, M. Berkmen, D. Huber, C. Kumamoto, D. Boyd, J. Beckwith, *J. Bacteriol.* 185(19) (2003) 5706.



**ВЕСТИ из ШКОЛЕ**  
**ВЕСТИ за ШКОЛЕ**



**Милан СТОЈКОВИЋ**, наставник хемије у ОШ „Ђура Јакшић“, Јелашница и ОШ „Лела Поповић“, Миљковац, Ниш. Универзитет Фридрих Шилер, Јена, Хемијско-геолошки факултет, Институт за Дидактику хемије (e-mail: milan.stojkovic@uni-jena.de)

## ПРИМЕНА САВРЕМЕНИХ НАСТАВНИХ СРЕДСТАВА У ОБЛАСТИ ХЕМИЈЕ - РАЧУНАРИ, РАЧУНАРСКИ ПРОГРАМИ И ИНТЕРНЕТ

### УВОД

Творац дидактике и модерне школе Јан Амос Коменски<sup>а)</sup> (Jan Amos Komenský) је још у XVII веку исти-

цао да се упознавање спољног света остварује посредством чула. Из тог разлога настава у школама мора бити заснована на принципу очигледности [1].

<sup>а)</sup> Јан Амос Коменски (1592–1670) је био чешки учитељ, научник, теолог, педагог, хуманиста, филозоф и политичар. Сматра се оцем модерне наставе и реформатором образовног система. Творац је тзв. предметно-часовно-разредног система рада и писац књиге „Велика Дидактика“ (Didactica Magna).