



IHTM  
Centar za  
hemiju

Evid. broj: 01/12  
Datum: 08. 10. 2012.

## TEHNIČKO REŠENJE

НАУЧНА УСТАНОВА ИХТМ  
УНИВЕРЗИТЕТУ БЕОГРАДУ  
ЦЕНТАР ЗА ХЕМИЈУ

Бр. 568/12  
08.10. 2012. год.  
БЕОГРАД

# Novi tehnološki postupak za dobijanje mikrobne lipaze pomoću *Pseudomonas aeruginosa NCAIM (P)*

Б 001380



## TEHNIČKO REŠENJE

Vrsta tehničkog rešenja	Novi tehnološki postupak M83
Autori tehničkog rešenja	Lidija Izrael-Živković, Ivanka Karadžić, Gordana Gojgić-Cvijović, Milena Rikalović i Miroslav Vrvić
Naziv tehničkog rešenja	Novi tehnološki postupak za dobijanje mikrobne lipaze pomoću <i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCAIM (P) B 001380
Za koga je tehničko rešenje urađeno	U okviru projekta III 43004 za ponudu slobodnom tržištu u Srbiji i inostranstvu
Korisnik tehničkog rešenja	Centar za hemiju IHTM
Godina izrade tehničkog rešenja	2012.
Verifikacija rezultata	Recenzenti: 1. Prof. dr Milan DABOVIĆ Naučni savetnik u penziji 2. Dr Vladimir BEŠKOSKI, docent Hemijski fakultet, Beograd
Ko je prihvatio/realizuje tehničko rešenje	Naučno veće IHTM
Primena rezultata	Transformacija složenih lipidnih molekula



**SADRŽAJ**

1. Oblast na koju se tehničko rešenje odnosi.....	4
2. Problem koji se tehničkim rešenjem rešava .....	4
3. Stanje tehnike.....	5
4. Suština tehničkog rešenja .....	7
5. Opis tehničkog rešenja .....	7
6. Način industrijske ili druge primene.....	16
7. Literatura.....	16



## **1. Oblast na koju se tehničko rešenje odnosi**

Tehničko rešenje je iz oblasti mikrobiološke proizvodnje enzima. Odnosi se na nov i ekonomičan postupak fermentacije za proizvodnju lipaze. Tehničko rešenje omogućava proizvodnju enzima koji je stabilan i aktivан u organskim rastvaračima. Lipaza se može primeniti u hidrolizi i sintezi (u nevodenoj sredini) složenih lipidnih molekula.

## **2. Problem koji se tehničkim rešenjem rešava**

Interesovanje za mikrobne enzime, posebno za bakterijske lipaze je veliko, jer je prepoznat njihov potencijal za promenu u biotehnologiji i organskoj sintezi, kako u postupcima hidrolize u vodenoj sredini, tako i sinteze različitih lipidnih molekula u nevodenoj sredini. Osim što su reakcije katalizovane lipazama u nevodenoj sredini pomerene u pravcu sinteze, dodatna prednost je to što dodatak organskog rastvarača povećava rastvorljivost hidrofobnog supstrata čime se direktno povećana njegova dostupnost. Takođe, ukoliko je enzim prirodno stabilan u organskom rastvaraču on ima stratešku prednost u odnosu na modifikovane enzime, kod kojih se stabilizacija u nevodenim sredinama postiže hemijskim modifikacijama enzima ili metodama genetskog inženjeringu produktivnog soja. Do danas je izolovano svega nekoliko enzima stabilnih u organskim rastvaračima.

Tehničko rešenje se odnosi na nov i ekonomičan postupak za mikrobiološku proizvodnju lipaze pomoću soja *Pseudomonas aeruginosa* NCAIM (P) B 001380 (ranije označen kao *Pseudomonas aeruginosa san ai*), deponovanom u Budimpešti u kolekciji National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms (NACIM). Karakteristike lipaze ovog soja omogućavaju širok spektar primene enzima. Kako je lipaza stabilna i aktivna u različitim organskim rastvaračima kao i sistemu bez rastvarača, moguća je



## TEHNIČKO REŠENJE

primena za selektivnu transformaciju kompleksnih lipidnih molekula (lipofilizacija lekova, sinteza aromaestara, biodizela...)

### 3. Stanje tehnike

U biotehnologiji je posebna pažnja posvećena mikrobnim lipazama. Ovi enzimi predstavljaju odličnu alternativu klasičnim organskim tehnikama za selektivnu transformaciju kompleksnih lipidnih molekula. Neke od prednosti koje ih čine pogodnim za industrijsku upotrebu su: specifičnost reakcije, netoksičnost, smanjenje neželjenih reakcija, jednostavnija separacija proizvoda i smanjenje troškova proizvodnje.

Lipaze su postale neizostavan deo u procesima moderne prehrambene industrije. Koriste se za modifikaciju ukusa sireva, interesterifikaciju masti i ulja (kada se dobijaju modifikovani acilgliceroli koje je nemoguće proizvesti korišćenjem konvencionalne hemijske interesterifikacije). (**Novo patent 1985, Veloso de Paula et al., 2009**). Lipaze se primenjuju i u procesu proizvodnje fermentisane (**Rombouts i Naut 1995**). Prednost fermentisanog voća i povrća je mogućnost dužeg skladištenja, ali i lakša svarljivost i veća nutritivna vrednost.

Kako lipaze pokazuju specifičnu enantioselektivnost u različitim organskim rastvaračima, one nalaze važnu primenu u farmaceutskoj industriji. Upotreba lipaze u enantioselektivnoj esterifikaciji, inter ili transesterifikaciji u organskom rastvaraču od velikog je značaja za prevazilaženje dobijanja racemske smeše različitih lekova i preparata (npr. dobijanje naproksena - antiinflamatornog leka čiji je S –enantiomer 28 puta aktivniji od R-enantiomera) (**Chang i Tsai 1997, Lafaquière V, 2009.**)

Razvijeni su, pored toga, modeli upotrebe lipaza u dijagnostičke svrhe, kao biosenzora za određivanje triglicerida (**Schoemaker et al., 1991, Kartal F et al., 2007**).



## TEHNIČKO REŠENJE

Proizvođači pesticida nastoje da smanje troškove, zagađenje životne sredine, sintetišu nove proizvode uz razvoj novih procesa njihovog dobijanja koji uključuju lipaze. Različiti pesticidi (insekticidi, herbicidi i fungicidi) koji se nalaze u upotrebi dobijeni su korišćem lipaza (**Chisso 1991, Mestri i Pai 1995, Aleu et al., 2006, Krumlinde et al., 2009**).

Upotreba lipaza (pored proteaza i celulaza) postala je nezaobilazna u industriji deterdženata za kućnu i industrijsku upotrebu. (**Genex 1986, Misset et al., 1994, Fariha et al., 2010**). Uklanjanje masti u kožarskoj industriji bilo bi nemoguće bez lipaza i drugih hidrolaza (**Haalck et al., 1992**).

Lipaze se primenjuju u tretiraju otpadnih voda (**Dauber i Boehnke 1993, Kurita 1994**).

Biodizel predstavlja značajno alternativno gorivo na čijem dobijanju i upotrebi se sve više radi. Kako su rezerve nafte ograničene, proizvodnja biodizela je od velikog značaja. Nastavak i povećanje upotrebe nafte povećava zagađenje i zagrevanje prouzrokovano emisijom CO<sub>2</sub> (**Shay 1993**). Biodizel ima potencijal da umanji nivo zagađenja i produkciju potencijalnih kancerogenih materija (**Krawczuk 1996**). Biodizel predstavlja monoalkil-estre viših masnih kiselina i kao "zeleno gorivo" može se koristiti sa ili bez dodatka "običnog" dizela, pri čemu nije potrebna modifikacije motora koji ga koristi. Biodizel se proizvodi od biljnih ulja hemijskom ili lipazom katalizovanom transesterifikacijom. Enzimski proces transesterifikacije ima nekoliko prednosti u odnosu na hemijski (**Shah et al., 2003**). Alkoholi koji se mogu koristiti za transesterifikaciju su metanol, etanol, propanol, butanol i amil-alkohol. Metanol i etanol se najčešće upotrebljavaju, posebno metanol zbog niže cene procesa i hemijskih prednosti (polarni najkraći alkil lanac). Stabilnost i aktivnost lipaza u nevodenoj sredini predstavljaju prednosti koje se mogu iskoristiti tokom enzimske transesterifikacije u proizvodnji biodizela (**Shah et al., 2003**).



#### **4. Suština tehničkog rešenja**

Lipaza iz soja *Pseudomonas aeruginosa* NCAIM (P) B 001380 je dobijena pri blagim uslovima, submerznom fermentacijom, u ekonomičnoj podlozi. Temperaturni i pH optimum ove lipaze su 70 °C i 11, redom, a sam enzim je stabilan u širokom opsegu pH vrednosti (pH 4,0–11,5) i stabilan i aktivran u različitim organskim rastvaračima. Osobine izolovane lipaze omogućavaju širok spektar primene.

#### **5. Opis tehničkog rešenja**

Postupak se odnosi na mikrobiološku proizvodnju lipaze. Kao što je naznačeno lipaza je dobijena fermentacijom pomoću soja *Pseudomonas aeruginosa* NCAIM (P) B 001380, koji nikada ranije u te svrhe nije upotrebljavan. Kultura ovog soja je deponovana u National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms u Budimpešti. Ovaj soj je ekstremofilan, izolovan je iz sredine sa redukovanim sadržajem vode čija je pH 10.

Za proizvodnju lipaze soj *Pseudomonas aeruginosa* NCAIM (P) B 001380 se gaji pod aerobnim uslovima u LB (Luria Bertani) podlozi koja sadrži: pepton, ekstrakt kvasca i natrijum-hlorid..

Kultura je aktivirana presejavanjem na cetrimid agar (inkubacija od 48h na 30 °C), ili hranljvi agar (inkubacija od 24h na 30 °C). Inokulum je pripreman tako što se višestruko aktivirana kultura sa kosog agara suspenduje u tečnoj LB podlozi za predfermentaciju.

Predfermentacija i fermentacija pri kojoj se dobija lipaza se izvodi na temperaturi od 30 °C. U erlenmajerima zapremine 0,5 L na rotacionoj mučkalici sa 250 tresaka u minuti. Optimalna produkcija lipaze se postiže u stacionarnoj fazi (3-4 dana). Producija lipaze se prati kao enzimska aktivnost na *p*-nitrofenil-palmitatu (*p*NP-palmitatu).



## TEHNIČKO REŠENJE

Lipaza se dobija iz fermentacione tečnosti soja *Pseudomonas aeruginosa* NCAIM (P) B 001380.

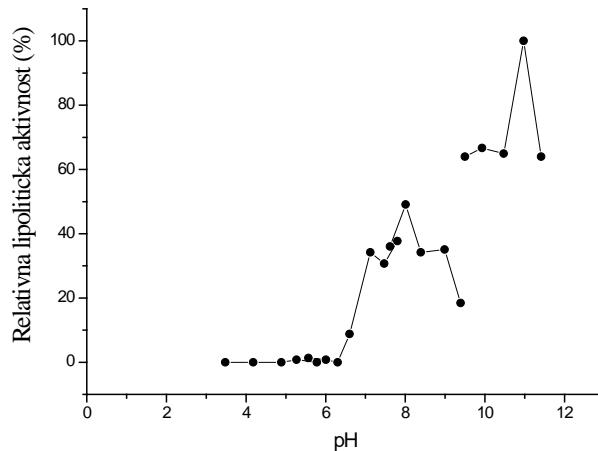
Preparat sirove lipaze se dobija odvajanjem biomase od fermentacione tečnosti i liofilizacijom fermentacione tečnosti.

Precišćena lipaza se dobija iz fermentacione tečnosti taloženjem amonijum-sulfatom i kombinacijom hidrofobne hromatografije i gel filtracije: Nakon taloženja amonijum-sulfatom (80% zasićenja) sirovi enzimski preparat je nanet na Butyl Toyopearl kolonu. Rehromatografijom na istoj koloni, a zatim gel filtracijom na koloni Toyopearl HW-55.

Masa lipaze iz *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380 određena SDS PAG elektroforezom iznosi 54 kDa.

Uticaj pH na aktivnost i stabilnost lipaze

Uticaj pH na aktivnost lipaze prikazan je na slici 1. Maksimum aktivnosti lipaze na pH 11 predstavlja najviše alkaljan pH optimum za lipaze roda *Pseudomonas*, koji je do sada publikovan u literaturi.

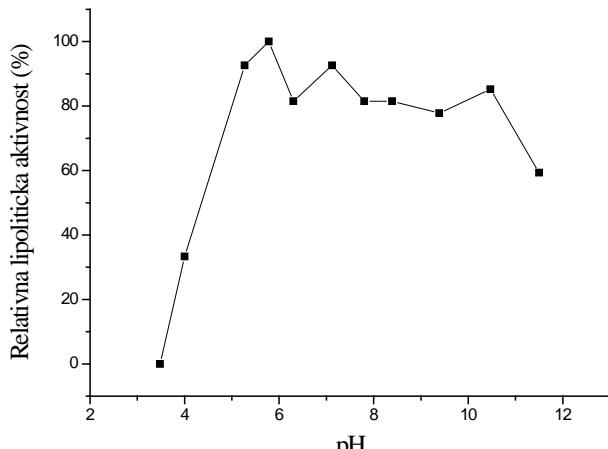


Slika 1. Uticaj pH na aktivnost lipaze.

Alkalna lipaza pokazala se kao stabilna posle 3 sata inkubacije u izuzetno širokom opsegu pH vrednosti od 4,5 do 11,5 (slika 2). Jasno je da je lipaza stabilnija u ekstremno alkalnoj sredini. Osim toga lipaza ima visoku stabilnost na pH 5, što je neuobičajena osobina za lipaze iz *P. aeruginosa*.



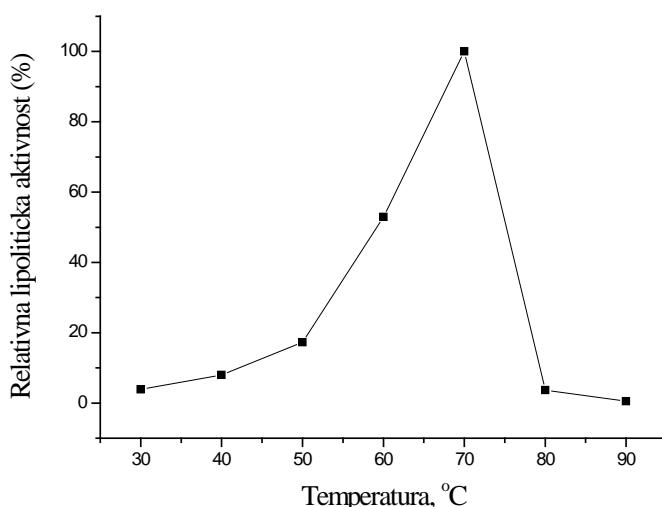
## TEHNIČKO REŠENJE



Slika 2. pH stabilnost lipaze

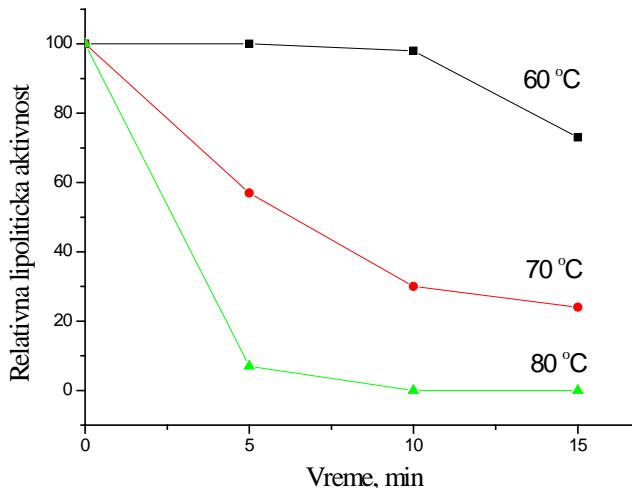
### Uticaj temperature na aktivnost i stabilnost lipaze

Kao što se vidi na slici 3. temperaturni optimum lipaze je na  $70^{\circ}\text{C}$ . Dakle, lipaza je enzim sa neočekivano visokim temperaturnim optimumom za lipaze roda *Pseudomonas*, što je još jedna od prednosti ove lipaze dobijene pomoću ekstremofilnog soja.



Slika 3. Uticaj temperature na aktivnost lipaze

Ispitana je termostabilnost lipaze na temperaturama u intervalu od 60 do  $80^{\circ}\text{C}$ . Kao što slika 4. pokazuje, preostala aktivnost lipaze na  $70^{\circ}\text{C}$  i  $60^{\circ}\text{C}$  posle 15 minuta inkubacije bila je 30 % i 75 %, redom.



Slika 4. Temperaturna stabilnost lipaze

#### Uticaj različitih reagenasa na aktivnost lipaze

Uticaj različitih reagenasa na aktivnost lipaze prikazan je u tabeli 1. Inhibitori metalo enzima EDTA i *o*-fenatrolin, kao i S-S redukujući agens DTT i SH- redukujući IAA nisu inhibirali lipazu. PMSF i DFP u koncentraciji od 5 mM nisu inhibirali lipazu, dok je DFP u koncentraciji od 25 mM inhibirao lipazu (preostala aktivnost je 40 %). Joni teških metala  $Zn^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , snažno su inhibirali lipazu. Anjonski surfaktanti pokazali su veoma različit uticaj na aktivnost lipaze. SDS je snažno inhibirao, a natrijum-deoksiholat je aktivirao lipazu za 200 %. Nejonski detergenti su snažno aktivirali lipazu.



## TEHNIČKO REŠENJE

Tabela 1. Uticaj reagenasa na aktivnost lipaze

Inhibitor/aktivator	Preostala aktivnost (%)
Kontrola*	100
EDTA	130
<i>o</i> -fenantrolin	105
DTT	120
IAA	110
PMSF	81
DFP	70
DFP**	40
Zn <sup>2+</sup>	15
Hg <sup>2+</sup>	6
Cu <sup>2+</sup>	8
Mn <sup>2+</sup>	53
Ca <sup>2+</sup>	50
Mg <sup>2+</sup>	68
SDS	7
Na-deoksiholat	300
Tween 80	200
Triton X-100	300

\* Kontrola – enzimska aktivnost bez dodatka reagenasa navedenih u tabeli

\*\* Koncentracija inhibitora 25 mM

### Stabilnost u organskim rastvaračima

Ispitan je uticaj različitih organskih rastvarača u koncentraciji od 25 % na lipazu. Stabilost enzima prikazana je u tabeli 2. Jasno je pokazano da je lipaza stabilna u izabranim organskim rastvaračima sa izuzetkom *n*-butanola i izopropanola. Organski rastvarači koji se ne mešaju, (sa većim log P), kao što su hloroform (log P 2,0) i *n*-heksan (log P 3,5), u poređenju sa alkoholima butanolom (log P 0,8) i izopropanolom (log P 0,28) imali su stabilizujući efekat



## TEHNIČKO REŠENJE

na enzimsku aktivnost. Lipaza je bila potpuno aktivna posle dva dana inkubacije u hloroformu i *n*-heksanu.

Tabela 2. Stabilnost lipaze u organskim rastvaračima

Organski rastvarač	Preostala aktivnost (%)	
	24 h	48 h
Metanol	80	42
Etanol	90	17
Aceton	95	33
Butanol	6	10
Izopropanol	65	16
Hloroform	130	140
<i>n</i> -Hexan	120	110
DMFA	100	64

### Temperaturna stabilnost u organskim rastvaračima

Termostabilnost lipaze je određena kao preostala aktivnost u 30 % *n*-heksanu, DMFA, etil-metil-ketonu, etanolu i metanolu na temperaturama 50 °C i 60 °C (Tabela 3.). Pokazano je da je lipaza zadržala 100 % aktivnosti nakon 15 minuta inkubacije u *n*-heksanu na 60 °C, i 50 % aktivnosti nakon 30 minuta inkubacije u *n*-heksanu na istoj temperaturi. Enzim je zadržao 100 % aktivnosti nakon 30 minuta inkubacije u metanolu na 50 °C, i 75 % aktivnosti nakon 10 minuta inkubacije u etil-metil ketonu na 50 °C. Lipaza nije bila stabilna na 60 °C u prisustvu DMFA, etil-metil ketona, metanola i etanola. Može se zaključiti da je lipaza pokazala stabilnost u organskim rastvaračima na 50 °C, i da je termostabilnost ovog enzima u maloj meri povećana u rastvoru *n*-heksana u odnosu na vodenim rastvorom.



## **TEHNIČKO REŠENJE**

Tabela 3. Temperaturna stabilnost lipaze u organskim rastvaračima

Organski rastvarač	Preostala aktivnost (%)	
	50 °C	60 °C
Metanol	100 (10 min)	-
Etanol	55 (10 min)	-
Etil-metil keton	75 (10 min)	-
DMFA	100 (30 min)	-
<i>n</i> -Hexan	85 (30 min)	100 (15 min) 50 (30 min)

### Aktivnost u organskim rastvaračima

Enzimska reakcija u 95 % organskom rastvaraču

Ispitana je aktivnost lipaze u organskim rastvaračima sa 5 % vode. Rezultati prikazani u tabeli 4. pokazali su da je lipaza aktivna u etanolu, metanolu, etil-metil ketonu, acetonu i *n*-heksanu. Aktivnost u etanolu i metanolu je značajno veća u odnosu na druge ispitane organske rastvarače.

Tabela 4. Aktivnost lipaze u 95 % organskom rastvaraču

Organski rastvarač	Aktivnost U/mg proteina
Etanol	5,22
Metanol	231,02
Etil-metil keton	0,12
Aceton	0,06
<i>n</i> -Heksan	0,13

### Enzimska aktivnost u sistemu bez rastvarača

Enzimska reakcija je izvedena u metanolu na *p*NP-palmitatu i *p*NP-lauratu. Gasnom hromatografijom je potvrđena sinteza metil-estara.



## TEHNIČKO REŠENJE

Na osnovu dobijene potvrde o sintezi metil-estara, jasno je da lipaza predstavlja novu mogućnost na polju primenjene enzimske katalize, posebno metanolize ulja za proizvodnju biodizela.

Tehnološki postupak je ilustrovan, ali ne i ograničen sledećim primerima:

Primer 1.

### Predfermentacija i fermentacija

Predfermentacija i fermentacija su rađene u Erlenmajerovim bocama sa širokim grлом zapremine 500 mL, na transferzalnoj tresilici (Kuhner, Švajcarska) uz 250 tresaka u minuti na 30 °C.

Inokulum je pripreman na LB-tečnoj podlozi sledećeg sastava: pepton I (10 g/L), ekstrakt kvasca (5 g/L) i NaCl (5 g/L). Kultura je prethodno aktivirana presejavanjem na cetrimid agar (24 h , 35 °C), a zatim na LB-čvrstu podlogu (24 h, 35 °C). Jedna eza (1-2 % posev) u pripremljenom LB-tečnom medijumu zapremine 50 mL. Predfermentacija je trajala 24h.

Fermentacija je urađena u Erlenmajerovim bocama sa širokim grлом zapremine 500 mL, koje su zasejane 1%-nim posevom pri zapremini medijuma od 50 mL. Fermentacija je trajala 144 h.

Primer 2.

### Praćenje dinamike fermentacije

Dinamika fermentacije *Pseudomonas aeruginosa* je praćena određivanjem sledećih parametara: pH, koncentracija proteina i lipolitička aktivnost.

Primer 3.

### Dobijanje sirove lipaze

Nakon 96h fermentacije *P. aeruginosa* na LB tečnoj podlozi fermentaciona tečnost odvojena je od biomase centrifugiranjem na 10000 obrtaja /min u toku 20 minuta, nakon čega je supernatant liofilizovan. Dobijeni liofilizovani sirovi enzimski kompleks korišćen je za reakcije u 95 % organskim rastvaračima kao i u sistemima bez rastvarača.



## TEHNIČKO REŠENJE

Primer 4.

### Izolovanje i prečišćavanje lipaze

Fermentaciona tečnost je odvojena centrifugiranjem 10 minuta na 5000 obrtaja/min. Biomasa je odbačena a u supernatant je dodat amonijum-sulfat do 80 % zasićenja. Taloženo je na 4 °C u toku noći. Dobijena suspenzija je rastvorena u 50 mM Tris-HCl puferu (pH 7,6) i dijalizovana naspram 20 % amonijum sulfata u 50 mM Tris-HCl puferu (pH 7,6). Dobijeni preparat je dalje prečišćavan hidrofobnom hromatografijom i gel filtracijom.

Hidrofobna hromatografija na Butyl Toyopearl koloni.

Hidrofobna hromatografija je rađena na koloni Butyl Toyopearl (Tosohas, Tokyo, Japan). Kolona dimenzije 1,6 x 35 cm (LKB, Wiena, Austia) je napakovana sa 20 mL Butyl Toyopearl i ekvilibrisana sa 40 mL rastvora 20 % amonijum-sulfata u 50 mM Tris-HCl puferu (pH 7,6). Adsorbovani materijal nanetog proteinskog rastvora je eluiran linearnim gradijentom (20-0 %) amonijum-sulfata u istom puferu, pri protoku od 20 mL/h, a sakupljene su frakcije zapremine 3 mL. Aktivne frakcije su skupljene i odsoljene dijalizom naspram 50 mM Tris-HCl pufera (pH 7,6). Rehromatografija je rađena na istoj koloni.

Gel eksluziona hromatografija na koloni Toyopearl HW-55

Aktivne frakcije su nanete su na kolonu Toyopearl HW-55 (Tosohas, Tokyo, Japan), koja je pethodno ekvilibrisana sa 400 ml 50 mM Tris-HCl pufera (pH 7,6) sa 0,5 M NaCl. Sakupljane su frakcije od 3 mL pri protoku od 12 mL/h. Aktivne frakcije su pulovane i nakon dijalize naspram vode liofilizovane.



## TEHNIČKO REŠENJE

Tabela. Prečišćavanje lipaze iz *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380

Korak u prečišćavanju *	Ukupni proteini (mg)	Ukupna aktivnost (U)	Specifična aktivnost (U/mg)	Prinos (%)	Prečišćenost
Fermentaciona tečnost	63	2394	38	100	1
Taloženje amonijum-sulfatom	13	1680	128	71	3,4
Butyl-Toyopearl	3	1170	390	48	10,3
Toyopearl HW-55	0,8	378	473	16	12,5

## 6. Način industrijske ili druge primene

Primena okarakterisane lipaze je u industriji detergenata, jer je enzim termostabilan i aktivan u alkalnim uslovima uz prisustvo površinski aktivnih supstanci (Grbavčić *et al.*, 2010).

Kako je lipaza stabilna i aktivna u različitim organskim rastvaračima kao i sistemu bez rastvarača, moguća je primena za selektivnu transformaciju kompleksnih lipidnih molekula (lipofilizacija lekova, sinteza aromaestara, biodizela...)

Takođe, moguća primene lipaze je u okviru konstruisanja inteligentnog sistema za distribuiranje (doziranje, isporuku) lekova (intelligent drug delivery system - DDS). (Karadžić *et al.*, 2006)

## 7. Literatura

- Aleu J, Bustillo AJ, Hernandez GR, Collado IG, Biocatalysis Applied to the synthesis of agrochemicals. *Cur Org Chem* **10** (2006) 2037-2054.  
 Chang CS, Tsai SW, A facile enzymatic process for the preparation of (s)-Naproxen ester prodrug in organic solvents. *Enz Micro Technol* **20** (1997) 635-639.



## TEHNIČKO REŠENJE

Chisso (1991) Jpn. Pat. JP-J03098597, 1991.

Dauber SR, Boehnke B, Ger. Pat. DE-4141832, 1993.

Fariha H, Aamer AS, Sundus J, Abdul H, Enzymes used in detergents : Lipase, *Afr. J. Biotech*, 9 (2010) 4836-4844Genex (1986) Eur. Pat. EP-178931, 1986.

Grbavčić S, Avramović N, Bezbradica D, Milosavić N, Mijin D, Karadžić I, Knežević-Jugović Z., Prijavljen patent, Reg. broj: 2010/0149

Haalck L, Hedrich, HC, Hassink J, Spener F, Studies on lipase enzyme from *Pseudomonas fluorescens* NS2W. *Prog Biotechnol* **8** (1992) 505-572.

Karadžić I., Masui A., Izrael Živković L., Fujiwara N., Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from putrid mineral cutting oil as component of metalworking fluid, *J. Biosci. Bioeng.* **102**, (2006) 82-89

Kartal F, Kilin A, Timur S, Lipase biosensor for tributyrin and pesticide detection, *Int J Environ Anal Chem* **87** (2007) 715 – 722.

Krawczyk T, Biodiesel – Alternative fuel makes inroads but hurdles remain. *INFORM* **7** (1996) 801–829.

Krumlinde P, Bogár K, Bäckvall JE, Synthesis of a neonicotinoide pesticide derivative via chemoenzymatic dynamic kinetic resolution, *J Org Chem.* **74** (2009) 7407-7410

Kurita, Water Jpn. Pat. JP-06246295, 1994.

Lafaquièvre V, Barbe S, Puech-Guenot S, Guieysse D, Cortés J, Monsan P, Siméon T, André I, Remaud-Siméon M, Control of lipase enantioselectivity by engineering the substrate binding site and access channel, *Chembiochem.* **10** (2009) 2760-2771

Mestri S, Pai JS, Effect of moisture on lipase catalysed esterification of geraniol of palmarosa oil in non-aqueous system. *Biotechnol Lett* **17** (1995) 459-462.

Misset O, Gerritse G, Jaeger KE, Winkler U, Colson C, Schanchk K, Lesuisse E, Dartios Y, Blaawoo M, Ransac S, Dijkstra BW, The structure function relationship of the lipases from *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*. *Protein Eng* **7** (1994) 523-529.



## TEHNIČKO REŠENJE

Novo Pat. AU-8432681, (1985).

Rombouts FM, Naut M, J. Appl. Bact. Symp. Suppl. **79** (1995) 1085-1175.

Schoemaker M, Feldbruge R, Gruendig B, Spencer F, The lipoxygenase sensor, a new approach in essential fatty acid determination in foods. *Biosens Bioelect* **12** (1997) 1089-1099.

Shah S, Sharma S, Gupta MN, Enzymatic transesterification for biodiesel production. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* **40** (2003) 392-399.

Shay EG, Diesel fuel from vegetable oils: status and opportunities. *Biomass and Bioenergy* **4** (1993) 227–242

Veloso de Paula A, Morais Nunes G F, de Lourdes Silva J, de Castro and Júlio César dos Santos H F , Screening of Food Grade Lipases to be Used in Esterification and Interesterification Reactions of Industrial Interest, *Appl Biochem Biotech* **160**, (2009) 1146-1156



Naučna ustanova  
**Institut za hemiju tehnologiju i metalurgiju**  
**UNIVERZITET U BEOGRADU**

Njegoševa 12, 11001 Beograd, P.fah 473  
Telefoni: centrala 3640-232; generalni direktor 3640-227; faks 3640-234  
E-mail: ihtm@ihtm.bg.ac.rs ; <http://www.ihtm.bg.ac.rs>

1431/13. 11. 2012

Naučno veće Naučne ustanove Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju na svojoj IX sednici održanoj dana 30. 10. 2012. godine donelo je sledeću

**O D L U K U**

ODREDJUJE SE DVA RECENZENTA:

1. PROF. DR MILANA DABOVIĆA, NAUČNOG SAVETNIKA, U PENZIJI
2. DOC. DR VLADIMIRA BEŠKOSKOG

ZA TEHNIČKO REŠENJE KOJE JE PROIZAŠLO IZ EKSPERIMENTALNOG RADA U OKVIRU PROJEKTA III 43004.

NAZIV TEHNIČKOG REŠENJA JE: NOVI TEHNOLOŠKI POSTUPAK ZA DOBIJANJE MIKROBNE LIPAZE POMOĆU *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* NCAIM(P)B 001380 AUTORI SU: LIDIJA IZRAEL-ŽIVKOVIĆ, IVANKA KARADŽIĆ, GORDANA GOJGIĆ-CVIJOVIĆ, MILENA RIKALOVIĆ I MIROSLAV VRVIĆ.

**PREDSEDNIK NAUČNOG VEĆA IHTM**

Dr Vlatka Vajs, naučni savetnik

**Naučnom veću Naučne ustanove  
Institut za hemiju tehnologiju i metalurgiju, Univerzitet u Beogradu**

Naučno veće Instituta za hemiju tehnologiju i metalurgiju na sednici održanoj 13. 11. 2012. godine svojom odlukom br. 1431 imenovalo me je za recenzenta Tehničkog rešenja pod nazivom:

**„Novi tehnološki postupak za dobijanje mikrobne lipaze pomoću *Pseudomonas aeruginosa*  
NCAIM(P)B 001380”**

Tehničko rešenje je urađeno u okviru projekta III 43004 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Autori ovog rešenja su: Lidija IZRAEL-ŽIVKOVIĆ, Ivanka KARADŽIĆ, Gordana GOJGIĆ-CVIJOVIĆ, Milena RIKALOVIĆ i Miroslav VRVIĆ.

Nakon uvida u priloženu dokumentaciju ovog tehničkog rešenja podnosim sledeći

**I Z V E Š T A J**

Predloženo tehničko rešenje pod naslovom: „Novi tehnološki postupak za dobijanje mikrobne lipaze pomoću *Pseudomonas aeruginosa* NCAIM(P)B 001380” napisano je na ukupno 19 strana A4 formata (naslovna strana, strana sa administrativnim podacima, strana sa sadržajem i 16 strana opisa tehničkog rešenja).

Naslovi poglavlja ovog tehničkog rešenja su:

1. Oblast na koju se tehničko rešenje odnosi
2. Problem koji se tehničkim rešenjem rešava
3. Stanje tehnike
4. Suština tehničkog rešenja
5. Opis tehničkog rešenja
6. Način industrijske ili druge primene
7. Literatura

Poglavlje 1. Predmetno tehničko rešenje je iz oblasti mikrobiološke proizvodnje enzima. Tehničko rešenje omogućava proizvodnju enzima koji je stabilan i aktivran u organskim rastvaračima i može se primeniti u hidrolizi i sintezi složenih lipidnih molekula.

Poglavlje 2. Problem koji se tehničkim rešenjem rešava sastoji se iz opisa razloga koji su doveli do razvoja tehničkog rešenja a to su potreba za mikrobnim enzimima i njihov potencijal za primenu u biotehnologiji i organskoj sintezi. Karakteristike lipaze soja *Pseudomonas aeruginosa* NCAIM (P) B 001380 omogućavaju širok spektar primene enzima. Kako je lipaza stabilna i aktivna u različitim organskim rastvaračima kao i sistemu bez rastvarača, moguća je primena za selektivnu transformaciju kompleksnih lipidnih molekula (lipofilizacija lekova, sinteza aroma-estara, dobijanje biodizela...).

Poglavlje 3. Stanje tehnike predstavlja opis rešenja iz oblasti prehrambene industrije, farmaceutske industrije, industije deterdženata, proizvodnje biodizela, pesticida, biosenzora u kojima autori nastoje

da smanje troškove, zagađenje životne sredine, razvoj novih procesa za sintezu proizvoda koji uključuju lipaze. Ovi enzimi predstavljaju odličnu alternativu klasičnim organskim tehnikama za selektivnu transformaciju kompleksnih lipidnih molekula. Ukazano je na prednosti koje lipaze čine pogodnim za industrijsku upotrebu, kai što su: specifičnost reakcije, netoksičnost, smanjenje neželjenih reakcija, jednostavnija separacija proizvoda i smanjenje troškova proizvodnje.

Poglavlje 4. Suština predloženog rešenja ukratko opisuje dobijanje lipaze pri blagim uslovima. Prikazane su i osnovne karakteristike ovog enzima koje omogućavaju širok spektar primene.

Poglavlje 5. Opis tehničkog rešenja detaljno opisuje uslove predfermentacije i fermentacije za dobijanje lipaze pomoću soja *Pseudomonas aeruginosa* NCAIM (P) B 001380, koji nikada ranije u te svrhe nije upotrebljavao. Opisano je dobijanje sirovog preparata lipaze kao i postupak prečišćavanja ovog enzima. Određena je molekulska masa lipaze, pH stabilnost i pH optimum, temperaturna stabilnost i temperaturni optimum. Određen je uticaj različitih reagenasa na aktivnost lipaze. Ispitana je stabilnost u organskim rastvaračima, temperaturna stabilnost u organskim rastvaračima. Određena je aktivnost u različitim organskim rastvaračima, kao i u sistemu bez rastvarača (pri čemu je supstrat istovremeno rastvarač).

Poglavlje 6. Način industrijske ili druge primene Primena okarakterisane lipaze je u industriji deterdženata, jer je enzim termostabilan i aktivan u alkalnim uslovima uz prisustvo površinski aktivnih supstanci. Kako je lipaza stabilna i aktivna u različitim organskim rastvaračima kao i sistemu bez rastvarača, moguća je primena za selektivnu transformaciju kompleksnih lipidnih molekula, kako je već navedeno. Takođe, moguća primena lipaze je u okviru konstruisanja inteligenntnog sistema za distribuiranje (doziranje, isporuku) lekova (intelligent drug delivery system - DDS).

Poglavlje 7. Literatura-Dat je prikaz literarnih izvora koji su relevantni za predloženo rešenje.

## M I Š L J E N J E

Predloženim tehničkim rešenjem autori **Lidija Izrael-Živković, Ivanka Karadžić, Gordana Gojgić-Cvijović, Milena Rikalović i Miroslav Vrvić** su jasno i detaljno opisali novi tehnološki postupak za dobijanje mikrobne lipaze pomoću *Pseudomonas aeruginosa* NCAIM(P)B 001380 i ukazali na efekte njegove primene u industriji deterdženata kao i primene za selektivnu transformaciju kompleksnih lipidnih molekula.

Na osnovu svega navedenog predlažem Naučnom veću Instituta za hemiju tehnologiju i metalurgiju da tehničko rešenje pod nazivom „**Novi tehnološki postupak za dobijanje mikrobne lipaze pomoću *Pseudomonas aeruginosa* NCAIM(P)B 001380**“ prihvati kao Tehničko rešenje – Novi tehnološki postupak (kategorija M<sub>83</sub>).

Beograd, 21. Decembar 2012.

Recenzent  
  
Prof. dr Milan DABOVIĆ  
Naučni savetnik u penziji

**Naučnom veću Naučne ustanove**

**Institut za hemiju tehnologiju i metalurgiju**

Odlukom Naučnog veća Instituta za hemiju tehnologiju i metalurgiju u Beogradu br. 1431 od 13.11.2012. godine imenovan sam za recenzenta Tehničkog rešenja:

**„Novi tehnološki postupak za dobijanje mikrobne lipaze pomoću  
*Pseudomonas aeruginosa* NCAIM(P)B 001380“**

Autori tehničkog rešenja su: Lidija IZRAEL-ŽIVKOVIĆ, Ivanka KARADŽIĆ, Gordana GOJGIĆ-CVIJOVIĆ, Milena RIKALOVIĆ i Miroslav VRVIĆ.

Tehničko rešenje je urađeno u okviru projekta III 43004 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Na osnovu predloga ovog tehničkog rešenja podnosim sledeći

## **IZVEŠTAJ**

Tehničko rešenje: „Novi tehnološki postupak za dobijanje mikrobne lipaze pomoću *Pseudomonas aeruginosa* NCAIM(P)B 001380“, autora Lidije Izrael-Živković, Ivanke Karadžić, Gordane Gojgić-Cvijović, Milene Rikalović i Miroslava Vrvića napisano je na 19 strana A4 formata koje čine naslovna strana, strana sa administrativnim podacima, strana sa sadržajem i 16 strana sa 7 poglavlja tehničkog rešenja.

Naslovi poglavlja ovog tehničkog rešenja su:

1. Oblast na koju se tehničko rešenje odnosi
2. Problem koji se tehničkim rešenjem rešava
3. Stanje tehnike
4. Suština tehničkog rešenja
5. Opis tehničkog rešenja
6. Način industrijske ili druge primene
7. Literatura

Predmetno tehničko rešenje „Novi tehnološki postupak za dobijanje mikrobne lipaze pomoću *Pseudomonas aeruginosa* NCAIM(P)B 001380“ je iz oblasti mikrobiološke proizvodnje enzima.

Problem koji se tehničkim rešenjem rešava opisuje razloge koji su doveli do razvoja tehničkog rešenja kao što su potreba za mikrobnim enzimima i njihov potencijal za primenu u biotehnologiji i organskim sintezama. Karakteristike lipaze soja *Pseudomonas aeruginosa* NCAIM (P) B 001380, pre svega stabilnost i aktivnost u različitim uslovima (pH, organski rastvarači), omogućavaju široku primenu enzima koji su odlična alternativa klasičnim tehnikama za selektivnu transformaciju kompleksnih lipidnih molekula.

Stanje tehnike predstavlja opis različitih rešenja u kojima autori nastoje da smanje troškove i zagađenje životne sredine, sintetišu nove proizvode uz razvoj novih procesa njihovog dobijanja koji uključuju lipaze. To su različita rešenja i patenti iz oblasti: prehrambene industrije, farmaceutske industrije, industrie deterdženata, proizvodnje biodizela, pesticide i biosenzora. Neke od prednosti koje enzime čine pogodnim za industrijsku upotrebu su: specifičnost reakcije, netoksičnost, smanjenje neželjenih reakcija, jednostavnija separacija proizvoda i smanjenje troškova proizvodnje.

Suština predloženog rešenja opisuje blage uslove dobijanja lipaze. Prikazane su i osnovne karakteristike ovog enzima koje omogućavaju širok spektar primene.

Opis tehničkog rešenja prikazuje detaljne uslove predfermentacije i fermentacije za dobijanje lipaze pomoću soja *Pseudomonas aeruginosa* NCAIM (P) B 001380. Opisano je dobijanje sirovog preparata lipaze kao i procedura prečišćavanja ovog enzima. Određene su osnovne karakteristike ovog enzima (molekulska masa, pH stabilnost i pH optimum, temperaturna stabilnost i temperaturni optimum). Određen je uticaj različitih reagenasa na aktivnost lipaze. Ispitana je stabilnost i termostabilnost lipaze u organskim rastvaračima kao i enzimska aktivnost u različitim organskim rastvaračima i u sistemu bez rastvarača.

Način industrijske ili druge primene podrazumeva primenu okarakterisane lipaze u industriji deterdženata, jer je enzim termostabilan i aktivan u alkalnim uslovima uz prisustvo površinski aktivnih supstanci. Moguća je primena za selektivnu transformaciju kompleksnih lipidnih molekula, jer je lipaza stabilna i aktivna u različitim organskim rastvaračima kao i sistemu bez rastvarača. Takođe, moguća je primena lipaze u okviru inteligentnog sistema za doziranje i isporuku lekova.

U poslednjem poglavlju „Literatura“ dat je prikaz literaturnih izvora koji su relevantni za predloženo rešenje.

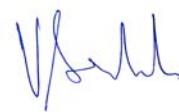
## MIŠLJENJE

Predloženim tehničkim rešenjem autori Lidija IZRAEL-ŽIVKOVIĆ, Ivanka KARADŽIĆ, Gordana GOJGIĆ-CVIJOVIĆ, Milena RIKALOVIĆ i Miroslav VRVIĆ su jasno i koncizno opisali novi tehnološki postupak za dobijanje mikrobne lipaze pomoću *Pseudomonas aeruginosa* NCAIM(P)B 001380 i ukazali na efekte njegove primene.

Sa zadovoljstvom predlažem da se tehničko rešenje „Novi tehnološki postupak za dobijanje mikrobne lipaze pomoću *Pseudomonas aeruginosa* NCAIM(P)B 001380“ autora Lidije Izrael-Živković, Ivanke Karadžić, Gordane Gojgić-Cvijović, Milene Rikalović i Miroslava Vrvića, prihvati kao Tehničko rešenje – Novi tehnološki postupak (kategorija M83).

Beograd, 20. decembar 2012. godine

Recenzent



Doc. dr Vladimir P. BEŠKOSKI, dipl. biohem.



Naučna ustanova  
**Institut za hemiju tehnologiju i metalurgiju**  
**UNIVERZITET U BEOGRADU**  
Njegoševa 12, 11001 Beograd, P.fah 473  
Telefoni: centrala 3640-232; generalni direktor 3640-227; faks 3640-234  
E-mail: ihtm@ihtm.bg.ac.rs ; http://www.ihtm.bg.ac.rs

148/30.01.3013

**NAUČNO VEĆE IHTM NA XI SEDNICI ODRZANOJ 29.1.2013.  
PRIHVATILO JE RECENZIJE:**

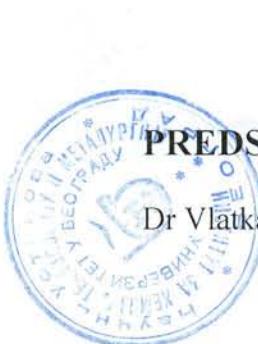
1. PROF. DR MILANA DABOVIĆA, NAUČNOG SAVETNIKA, U PENZIJI
2. DOC. DR VLADIMIRA BEŠKOSKOG

**ZA TEHNIČKO REŠENJE KOJE JE PROIZAŠLO IZ EKSPERIMENTALNOG  
RADA U OKVIRU PROJEKTA III 43004.**

**NAZIV TEHNIČKOG REŠENJA JE:**

NOVI TEHNOLOŠKI POSTUPAK ZA DOBIJANJE MIKROBNE LIPAZE POMOĆU  
PSEUDOMONAS AERUGINOSA NCAIM(P)B 001380.

AUTORI SU: LIDIJA IZRAEL-ŽIVKOVIĆ, IVANKA KARADŽIĆ, GORDANA GOJGIĆ-  
CVIJOVIĆ, MILENA RIKALOVIĆ I MIROSLAV VRVIĆ.



**PREDSEDNIK NAUČNOG VEĆA IHTM**

Dr Vlatka Vajs, naučni savetnik