

SADRŽAJ

1. UVOD U ENZIMSKU TEHNOLOGIJU.....	1
1.1. UVOD.....	1
1.2. ISTORIJAT RAZVOJA ENZIMSKIH TEHNOLOGIJA	2
1.3. STANJE I PERSPEKTIVA ENZIMSKIH TEHNOLOGIJA.....	7
1.4. PREDNOSTI I NEDOSTACI ENZIMSKIH PROCESA.....	9
1.4.1. Enzimski procesi nasuprot mikrobioloških.....	9
1.4.2. Enzimski procesi nasuprot hemijskih	12
1.4.3. Nedostaci enzimskih procesa.....	16
1.5. IZVOD	17
1.6. LITERATURA	18
2. OSNOVNA SVOJSTVA ENZIMA KAO KATALIZATORA.....	19
2.1 UVOD	19
2.2. OSNOVNI POJMOVI	19
2.3. KLASIFIKACIJA ENZIMA.....	21
2.4. ENZIMSKA SINTEZA I STRUKTURA	24
2.5. MEHANIZAM DEJSTVA ENZIMA	29
2.6. PRIRODA ENZIMSKE KATALIZE	33
2.7. OSNOVNE VELIČINE KOJE KARAKTERIŠU ENZIME	36
2.7.1. Aktivnost enzima	36
2.7.1.1. Opšti principi i metode za određivanje aktivnosti enzima	36
2.7.1.2. Enzimske jedinice.....	39
2.7.1.3. Enzimske jedinice u industrijskim uslovima	40
2.7.2. Specifičnost enzima	42
2.7.3. Stabilnost enzima.....	44
2.8. IZVOD	47
2.9. LITERATURA	49
3. KINETIKA ENZIMSKIH REAKCIJA.....	51
3.1 UVOD.....	51
3.2. PROGRESNE KRIVE I KONCEPT POČETNIH BRZINA.....	51
3.3. ZAVISNOST POČETNE BRZINE REAKCIJE OD KONCENTRACIJE SUPSTRATA.....	53
3.4. KATALITIČKI MODELI: APROKSIMACIJA KVAZI-RAVNOTEŽNOG I STACIONARNOG STANJA.....	55
3.4.1. Aproksimacija kvazi-ravnotežnog stanja: Mihaelis-Mentenova jednačina.....	56
3.4.2. Aproksimacija stacionarnog stanja: Brigs-Holdejnova jednačina ..	58
3.4.3. Red reakcije	61
3.4.3.1. Kinetika prvog reda	61
3.4.3.2. Kinetika nultog reda	63

3.4.4. Kinetičke konstante	64
3.4.4.1. Značaj kinetičkih konstanti	66
3.4.4.2. Metode određivanja kinetičkih konstanti	68
A. Metoda recipročnih vrednosti ili metoda po Lajnviver-Berku	69
B. Idi-Hofstijev i Hejnsov dijagram	71
C. Eizental i Korniš-Bodenov (Eisenthal Cornish-Bowden) dijagram	73
3.5. UTICAJ TEMPERATURE NA BRZINU ENZIMSKE REAKCIJE	74
3.6. UTICAJ pH NA BRZINU ENZIMSKE REAKCIJE	78
3.6.1. Uticaj pH na stepen disocijacije grupa od esencijalne važnosti za aktivnost enzima	82
3.6.2. Utvrđivanje strukture aktivnog centra enzima na osnovu uticaja pH	90
3.7. INHIBICIJA ENZIMSKE AKTIVNOSTI	91
3.7.1. Reverzibilna inhibicija	92
3.7.1.1. Kompetitivna inhibicija	93
3.7.1.2. Nekompetitivna inhibicija	101
3.7.1.3. Akompetitivna inhibicija	107
3.7.1.4. Mešovita inhibicija	111
3.7.1.5. Parcijalna inhibicija	114
3.7.1.6. Inhibicija supstratom u višku	115
3.7.2. Ireverzibilna inhibicija	118
3.7.3. Inhibitori kao lekovi	121
3.8. ALOSTERIČNI ENZIMI I ALOSTERIČNA INHIBICIJA	123
3.8.1. Osnovni pojmovi	123
3.8.2. Kriva vezivanja sigmoidnog oblika	124
3.8.3. Sekvencijalni model	125
3.8.4. Opšti oblik modela	126
3.8.5. Simetričan model	128
3.9. IZVOD	129
3.10. LITERATURA	131
4. PROIZVODNJA, PREČIŠĆAVANJE I IZOLOVANJE ENZIMA 133	
4.1. TREND OVI U SVETSKOJ PROIZVODNJI ENZIMA	133
4.2. NAČINI DOBIJANJA ENZIMA	136
4.2.1. Enzimi izolovani iz biljnih i životinjskih tkiva	139
4.2.2. Mikrobni enzimi	141
4.3. INDUSTRIJSKA PROIZVODNJA ENZIMA MIKROBNOG POREKLA	143
4.3.1. Uvodna razmatranja	143
4.3.2. Specifičnosti proizvodnje enzima	145
4.3.2.1. Uticaji različitih faktora na proizvodnju enzima na nivou biosinteze	145
4.3.2.2. Uticaj na regulatorne mehanizme	148

4.3.3. Načini povećanja prinosa enzima	150
4.3.3.1. Odabir početnog prirodnog mikroorganizma	151
4.3.3.2. Oplemenjivanje soja prirodnog mikroorganizma	153
4.3.3.3. Optimizacija sastava hranljive podloge i uslova kultivacije .	153
<i>Primer 1: Optimizacija proizvodnje penicilin-amidaze iz E. coli</i>	156
<i>Primer 2: Optimizacija proizvodnje lipaza iz sojeva kvasca Candida i plesni Geotrichum</i>	158
4.3.3.4. Primena genetičkog inženjerstva	161
Rekombinantni nasuprot nerekombinantnih enzima	163
Izbor mikroorganizma-domaćina	166
Ekspresioni vektori	168
4.3.4. Tehnološki postupci proizvodnje enzima	170
4.3.4.1. Priprema inokuluma	170
4.3.4.2. Kultivisanje proizvodnog mikroorganizma u cilju biosinteze enzima	171
Gajenje na čvrstim hranljivim podlogama	172
Tehnika submerznog gajenja u tečnim hranljivim podlogama	176
4.4. IZOLOVANJE, PREČIŠĆAVANJE I KARAKTERIZACIJA ENZIMA	177
4.4.1. Osnovni principi izolovanja i prečišćavanja enzima	177
4.4.2. Metode dezintegracija ćelija	183
4.4.2.1. Mehanička dezintegracija	185
Homogenizatori pod visokim pritiskom	185
Ultrazvučna dezintegracija	187
Mlevenje ćelija uz dodatak abrazivnih sredstava	188
Dezintegracija ćelija primenom presa	189
4.4.2.2. Nemehaničke metode	189
4.4.3. Uklanjanje nukleinskih kiselina i lipida	191
4.4.4. Koncentrovanje i osnovno prečišćavanje	192
4.4.4.1. Taloženje enzima	192
4.4.4.2. Koncentrovanje izmenom jona	196
4.4.4.3. Ostale metode koncentrovanja	198
4.4.5. Izdvajanje enzima koji su vezani za membranu	198
4.4.6. Prečišćavanje enzima	199
4.4.6.1. Jonoizmenjivačka hromatografija	201
4.4.6.2. Gel-filtraciona hromatografija	203
4.4.6.3. Hidrofobna hromatografija	206
4.4.6.4. Afinitetna hromatografija	207
4.4.7. Određivanje čistoće i homogenosti enzimskog preparata	211
4.5. PRIMERI PROIZVODNJE INDUSTRIJSKIH ENZIMA	213
4.5.1. Industrijska proizvodnja tehničkih enzima	213

4.5.2. Industrijska proizvodnja enzima koji se koriste u terapijske i dijagnostičke svrhe	216
4.5.3. Standardi kvaliteta enzimskih preparata	218
4.6. IZVOD	220
4.7. LITERATURA	222
5. OPTIMIZACIJA SVOJSTAVA INDUSTRIJSKIH ENZIMA METODAMA MOLEKULARNOG INŽENJERSTVA.....	225
5.1. UVODNA RAZMATRANJA.....	225
5.2. PROMENE SVOJSTAVA ENZIMA PRIRODNOM EVOLUCIJOM.....	226
5.3. PROMENA SVOJSTVA ENZIMA PRIMENOM TEHNIKA MOLEKULARNOG INŽENJERSTVA.....	227
5.3.1. Racionalni enzimski dizajn (usmerena mutageneza).....	229
5.3.1.1. Uvodna razmatranja: elementi racionalnog enzimskog dizajna	229
5.3.1.2. Primeri konstrukcije nekih industrijskih enzima racionalnim dizajnom	231
Primer 1: Povećanje termalne stabilnosti glukoze-izomeraze usmerenom mutagenezom	232
Primer 2: Promena svojstava subtilizina usmerenom mutagenezom ..	232
Primer 3: Povećanje enantiospecifičnosti enzima usmerenom mutagenezom	233
5.3.2. Usmerena evolucija ili <i>in vitro</i> evolucija (nasumična mutageneza)	234
5.3.2.1. Uvodna razmatranja: pojam i značaj	234
5.3.2.2. Metode za kreiranje biblioteke roditeljskog gena.....	236
5.3.2.3. Primeri konstrukcije nekih industrijskih enzima usmerenom evolucijom	239
5.3.3. Identifikacija unapređenih enzimskih varijanti.....	240
5.4. IZVOD	242
5.5. LITERATURA	243
6. IMOBILISANI ENZIMI	245
6.1. DEFINICIJA I OSNOVNI POJMOVI	245
6.2. METODE IMOBILIZACIJE ENZIMA.....	249
6.3. NOSAČI ZA IMOBILIZACIJU ENZIMA.....	251
6.3.1. Morfološka klasifikacija čvrstih nosača	254
6.3.2. Hemijska klasifikacija nosača.....	256
6.3.2.1. Neorganski nosači	256
6.3.2.2. Prirodni polisaharidi	258
6.3.2.3. Sintetski polimeri	262
6.4. ADSORPCIJA ENZIMA NA ČVRSTIM NOSAČIMA	264
6.4.1. Mehanizmi adsorpcije i klasifikacija	264
6.4.2. Uticaj različitih činilaca na adsorpciju enzima	268

6.5. KOVALENTNA IMOBILIZACIJA ENZIMA	270
6.5.1. Postupci aktivacije nosača	271
6.5.2. Prednosti i nedostaci kovalentne imobilizacije.....	277
6.6. OBUHVATANJE ENZIMA NOSAČEM	278
6.6.1. Imobilizacija enzima u polimerne matrice.....	279
6.6.2. Umrežavanje enzima	282
6.7. SMEŠTANJE ENZIMA U/IZA ČVRSTE MEMBRANE	283
6.7.1. Inkapsulacija enzima	283
6.7.2. Imobilizacija enzima u membranama	285
6.8. EFEKTI IMOBILIZACIJE NA ENZIMSKU KINETIKU I SVOJSTVA BIOKATALIZATORA.....	288
6.8.1. Kinetika reakcije katalizovana imobilisanim enzimom.....	288
6.8.2. Konformacioni i sterni efekti.....	290
6.8.3. Efekti raspodele komponenti u sistemu sa imobilisanim enzimom	291
6.8.3.1. Efekti raspodele supstrata, inhibitora i aktivatora	291
6.8.3.2. Efekti raspodele protona vodonika	294
6.8.4. Difuzioni efekti u sistemu sa imobilisanim enzimom.....	295
6.8.4.1. Difuzioni efekti u slučaju enzima imobilisanih na površini neporoznih nosača	297
6.8.4.2. Difuzioni efekti u slučaju enzima imobilisanih u poroznim nosačima	301
6.9. IZVOD	306
6.10. LITERATURA	307
7. OPTIMIZACIJA ENZIMSKOG POSTUPKA PROIZVODNJE... 311	
7.1. UVODNA RAZMATRANJA.....	311
7.2. RAVNOTEŽNE I KINETIČKI KONTROLISANE ENZIMSKE REAKCIJE.....	312
7.3. KRITERIJUMI OCENE EFIKASNOSTI ENZIMSKOG POSTUPKA	315
7.3.1. Prinos proizvoda	315
7.3.2. Produktivnost enzima	316
7.3.3. Prostorno-vremenski prinos reaktora.....	316
7.3.4. Operativna stabilnost	318
7.3.5. Stepen konverzije i stepen konverzije po prolazu kroz reaktor	319
7.4. OSNOVNI PRINCIPI OPTIMIZACIJE ENZIMSKIH PROCESA	319
7.5. UTICAJ FIZIČKIH FAKTORA NA RAVNOTEŽNE I KINETIČKI KONTROLISANE REAKCIJE.....	323
7.5.1. Uvodna razmatranja.....	323
7.5.2. Uticaj temperature	325
7.5.2.1. Temperaturni optimumi aktivnosti i stabilnosti enzima	325
7.5.2.2. Termalna inaktivacija enzima.....	326

7.5.3. Uticaj pH.....	330
7.5.3.1. Uticaj pH na ravnotežu reakcije	330
7.5.3.2. Optimumi pH aktivnosti i pH stabilnosti enzima	331
7.6. OPTIMIZACIJA PROCESA KOJI SE ZASNIVAJU NA PRIMENI ENANTIOSPECIFIČNIH ENZIMA	334
7.6.1. Definicija i određivanje enantiomernog odnosa	334
7.6.2. Optimizacija enantiomernog odnosa na osnovu stepena konverzije	337
7.6.2.1. Enantiospecifičnost ireverzibilne enzimске reakcije.....	337
7.6.2.2. Enantiospecifičnost ravnotežne enzimске reakcije	338
7.6.3. Uticaj temperature na enantiospecifičnost enzima	339
7.7. MATEMATIČKO OPISIVANJE ENZIMSKIH REAKCIJA	340
7.7.1. Enzimске reakcije u homogenim sistemima.....	342
7.7.2. Enzimске reakcije sa imobilisanim enzimima.....	348
7.7.3. Enzimске reakcije u membranskom reaktoru	353
7.8. IZVOD	356
7.9. LITERATURA	357
8. INDUSTRIJSKI ENZIMI	359
8.1 AMILAZE.....	359
8.1.1. Skrob kao supstrat.....	360
8.1.2. Endo-amilaze: α -amilaze.....	362
8.1.2.1. Osnovna svojstva, struktura i mehanizam delovanja.....	362
8.1.2.2. Termostabilne endo-amilaze	367
8.1.3. Egzo-amilaze: β -amilaze i glukoamilaze	369
8.1.3.1. β -Amilaze	369
8.1.3.2. Glukoamilaze.....	371
8.1.4. Enzimi koji otkidaju grane.....	374
8.1.5. Primena amilaza u industriji skroba.....	375
8.1.5.1. Prednosti enzimskog postupka	375
8.1.5.2. Proizvodi hidrolize skroba.....	376
8.1.5.3. Tehnološki postupak proizvodnje skrobnih sirupa.....	377
8.1.5.4. Primarna hidroliza skroba	379
A) Dvostepeni kiselinsko/enzimski postupak	381
B) Jednostepena enzimska likvefakcija.....	382
8.1.5.5. Saharifikacija skroba	384
A) Proizvodnja glukoznih sirupa i glukoze	384
B) Proizvodnja maltoznih sirupa.....	387
8.1.6. Primena ostalih enzima u industriji skroba.....	388
8.1.6.1. Glukozo-izomeraza i njena primena za dobijanje visokofruktoznih sirupa.....	388
Industrijski značaj proizvodnje fruktoznih sirupa	388
Osnovna svojstva glukozo-izomeraze	389

Proizvodnja visokofruktoznih sirupa.....	393
8.1.6.2. Ciklodekstrin-glukanottransferaze i njihova primena u industriji skroba	396
Industrijski značaj proizvodnje ciklodekstrina	396
Osnovna svojstva ciklodekstrin-glukanottransferaza	398
8.2. CELULAZE I HEMICELULAZE.....	399
8.2.1. Celuloza, hemiceluloza i lignin kao supstrati	401
8.2.2. Osnovna svojstva celulaza	402
8.2.3. Osnovna svojstva hemicelulaza	404
8.2.3.1. Mananaze	405
8.2.3.2. Ksilanaze	406
8.2.4. Primena celulaza i hemicelulaza u prehrambenoj industriji	408
8.2.5. Primena celulaza u industriji deterdženata	409
8.2.6. Primena celulaza u tekstilnoj industriji.....	410
8.2.7. Ostale primene celulaza	412
8.3. OLIGOSAHARIDAZE.....	412
8.3.1. β -Galaktozidaza	413
8.3.1.1. Industrijski značaj.....	413
8.3.1.2. Osnovna svojstva β -galaktozidaza	413
8.3.1.3. Tehnološki postupci enzimske hidrolize laktoze iz surutke ..	415
8.3.2. β -Fruktofuranozidaza	417
8.4. PEKTINAZE.....	418
8.4.1. Pektinske materije kao supstrati	418
8.4.2. Osnovna svojstva i tipovi pektinaza	419
8.4.2.1. Pektin-esteraze.....	420
8.4.2.2. Hidrolitičke depolimeraze	421
8.4.2.3. Eliminacione depolimeraze (liaze).....	422
8.4.3. Primena pektinaza u prehrambenoj industriji	423
8.4.3.1. Primena pektinaza u proizvodnji voćnih sokova.....	424
8.5. PROTEOLITIČKI ENZIMI.....	426
8.5.1. Osnovna svojstva i klasifikacija proteaza	426
8.5.2. Primena proteaza u mesnoj industriji.....	432
8.5.3. Primena proteaza u pekarstvu i u proizvodnji piva.....	433
8.5.4. Primena proteaza u mlečnoj industriji	434
8.5.5. Primena termolizina u proizvodnji aspartama	437
8.5.6. Primena proteaza i drugih enzima u proizvodnji deterdženata	438
8.5.6.1. Kratak istorijat primene enzima u deterdžentima i uvodna razmatranja	439
8.5.6.2. Sastav deterdženta i stabilnost enzima	440
A) Stabilnost enzima pri skladištenju deterdženta	442
B) Stabilnost u toku pranja.....	443
8.5.6.3. Enzimi koji se koriste i njihova svojstva.....	443

A) Proteaze	444
B) α -Amilaze.....	446
C) Lipaze	447
D) Celulaze.....	448
8.6. PENICILIN-AMIDAZA I NJENA PRIMENA	448
8.7. IZVOD	452
8.8. LITERATURA	455
9. PRILOZI.....	457
10. SPISAK SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U TEKSTU	469
11. LISTA SIMBOLA KORIŠĆENIH U TEKSTU I NJIHOVIH SI JEDINICA	471
12. REGISTAR.....	475