

SANJA Ž. GRBAVČIĆ¹
DEJAN I. BEZBRADICA¹
IVANKA M. KARADŽIĆ²
ZORICA D.
KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ¹

¹Tehnološko-metalurški fakultet,
Univerzitet u Beogradu, Beograd
²Medicinski fakultet, Univerzitet u
Beogradu, Beograd

NAUČNI RAD

UDK 661.185.6:66.097.3:579.841.1

DOI: 10.2298/HEMIND0904331G

LIPAZE I PROTEAZE DOBIJENE IZ EKSTREMOFILNE *Pseudomonas aeruginosa* VRSTE KAO ADITIVI U FORMULACIJAMA DETERDŽENATA

Enzimi iz ekstremofilne Pseudomonas aeruginosa vrste pokazuju visoku stabilnost u alkalnoj sredini što ih čini pogodnim za primenu u proizvodnji deterdženata. U ovom radu ispitana je aktivnost lipaza i proteaza dobijenih iz ove vrste u uslovima od značaja za industriju deterdženata. Ustanovljeno je da u realnim uslovima pranja, oba enzima zadržavaju visoku aktivnost u prisustvu različitih površinski aktivnih materija i oksidacionih agenasa. Takođe, prisustvo nekih aditiva kao što su Tween[®] 20, Triton[®] X-100, SDS i NaClO u početnoj fazi povećava lipolitičku aktivnost dok je povećanje proteolitičke aktivnosti primećeno u formulacijama koje sadrže Tween[®] 20 i Triton[®] X-100. Nadalje, sama lipaza je očuvala aktivnost u prisustvu nativnih proteaza što upućuje na zaključak da bi ovi enzimi zadržali visoku efikasnost u formulacijama deterdženata i tokom procesa pranja/čišćenja.

Deterdženti su kompleksne smeše koje sadrže površinski aktivne materije (PAM), omekšivače, oksidacione agense i različite enzime. Kako svest o zaštiti životne sredine raste tako i formulacije deterdženata koje sadrže enzime velikom brzinom zamenjuju konvencionalne hemijske formulacije koje sadrže slabo razgradljive, korozivne i toksične materije [1].

Enzimi se smatraju ekološki prihvatljivim aditivima jer su biodegradabilni, a kako se njihovom upotrebom povećava efikasnost čišćenja, moguće je smanjenje količine agresivnih supstanci u formulacijama za čišćenje kao i ušteda energije jer se proces pranja može vršiti pri nižim temperaturama [2].

Međutim, nisu svi enzimi pogodni za upotrebu u formulacijama deterdženata. Pored toga što njihova proizvodnja mora biti ekonomična, enzimi koji se koriste u formulacijama deterdženata moraju da budu stabilni u prisustvu agenasa koji često imaju inhibitorno ili deaktivirajuće dejstvo. Takođe, proces pranja se često vrši pri povišenim temperaturama (iznad 40 °C) i u izrazito alkalnoj sredini (pH 9–12) [3]. Proizvođači enzima su uspeli da izoluju različite mikrobne producente enzima koji su aktivni i stabilni pri navedenim temperaturnim i pH uslovima. Pored toga, metode molekularnog inženjeringa omogućile su dobijanje enzima stabilnih u prisustvu izbeljivača, omekšivača i drugih agresivnih supstanci [4].

U formulacijama deterdženata se kao aditivi koriste proteaze, lipaze, amilaze i celulaze [3]. Lipaze (EC 3.1.1.3) enzimi su koji katalizuju hidrolizu triglicerida do glicerola, slobodnih masnih kiselina, di- i monoglicerida [5]. Na taj način ovi enzimi razlažu masne fleke do hidrofiličnijih jedinjenja čime se olakšava njihovo uklanjanje. Komercijalno najviše upotrebljivan enzim ove grupe Lipolase[®] (Novozymes) dobijen je primenom tehnologije rekombinantne DNK. Druge komercijalne

lipaze, Luma Fast[®] i Lipomax[®] (Gist-Brocades), dobijene su iz *Pseudomonas* spp. [6,7]. Proteaze se dodaju deterdžentima radi pospešenog uklanjanja mrlja na bazi proteina kao što su krv i neki tipovi hrane. Komercijalno korišćeni enzimi ove grupe su serinske proteaze dobijene iz različitih *Bacillus* vrsta. Novo Industri A/S proizvodi komercijalne enzimske preparate Alcalase[®] i Esperase[®] iz *Bacillus licheniformis* vrste i Savinase[®] iz alkalofilne *Bacillus amyloliquefaciens* vrste. Gist-Brocades je proizvođač enzimskeg preparata Maxatase[®] (*Bacillus licheniformis*) [3]. Kako su proteaze najviše korišćeni enzimi u industriji deterdženata, usled njihovog dejstva može doći do inaktivacije drugih enzima. Zbog toga je potrebno selektovati enzime manje podložne proteolizi i preduzeti različite mere njihove zaštite.

U prethodnim istraživanjima proizvedene su i karakterisane lipaza i proteaza iz ekstremofilnog *Pseudomonas aeruginosa* soja [8,9]. Ovaj mikroorganizam izolovan je iz izrazito alkalne emulzije (pH 10) korišćene kao mazivo pri sečenju i obradi metala. Izolovana ekstracelularna lipaza je pokazala izuzetna svojstva i potencijal za različite biotehnoške primene. Naime, 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) [9]. Pored toga, ova bakterijska vrsta istovremeno proizvodi i ekstracelularne proteaze što je čini izrazito atraktivnom vrstom bakterija za dobijanje aditiva za upotrebu u industriji deterdženata [8]. Nadalje, ove enzime je moguće dobiti fermentacijom u jeftinoj podlozi i pri blagim uslovima [10].

U ovom radu, enzimi dobijeni iz *P. aeruginosa* vrste su ispitani sa aspekta eventualne primene u deterdžentima. Efekat različitih surfaktanata i oksidujućih materija je praćen u odgovarajućem vremenskom periodu kako bi se sagledao sveukupan efekat ovih aditiva na stabilnost i aktivnost lipaza i proteaza.

EKSPERIMENTALNI DEO

Sirovi enzimski preparat dobijen je uzgajanjem *Pseudomonas aeruginosa* u podlozi sledećeg sastava:

Autor za prepisku: S.Ž. Grbavčić, Katedra za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju, Tehnološko-metalurški fakultet, Karnegijeva 4, 11000 Beograd.

E-pošta: sanjagrbcvic@yahoo.com

Rad primljen: 3. jun 2009.

Rad prihvaćen: 30. jun 2009.

pepton I (10 g dm^{-3}), ekstrakt kvasca (5 g dm^{-3}) i NaCl (5 g dm^{-3}). Fermentacija je vršena u erlenmajerovim sudovima zapremine 500 ml na $30 \text{ }^\circ\text{C}$ uz mešanje (250 o min^{-1}). Nakon tri dana, dobijena fermentaciona tečnost je centrifugirana tokom 10 minuta pri brzini od $10\,000 \text{ o min}^{-1}$ kako bi se uklonile bakterijske ćelije. Ovako dobijena fermentaciona tečnost smatrana je sirovim enzimskim preparatom i korišćena u ispitivanjima relevantnim za industriju deterdženata.

Početna lipolitička aktivnost je određena *p*-nitrofenil-palmitatnom metodom [9]. Supstrat je pripremljen mešanjem 30 mg *p*-nitrofenil-palmitata sa 10 ml izopropanola. Aktivnost je ispitana na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ tako što se $100 \text{ } \mu\text{l}$ uzorka mešalo sa $810 \text{ } \mu\text{l}$ 0,05 M Sorensenovog fosfatnog pufera (pH 8,00). Ovako razblaženi uzorak ($910 \text{ } \mu\text{l}$) dodat je supstratu ($90 \text{ } \mu\text{l}$) direktno u kiveti spektrofotometra. Aktivnost je merena praćenjem promene apsorbancije u toku prva 3 min reakcije na 410 nm . Jedinica enzimske aktivnosti (IU) definisana je kao količina enzima koja oslobađa $1 \text{ } \mu\text{mol}$ *p*-nitrofenola po minuti ($\epsilon = 1500 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) pri opisanim uslovima.

Da bi se ispitala aktivnost lipaza i proteaza u prisustvu različitih aditiva, sirovi enzimski preparat je razblažen puferom u odnosu propisanim prethodno opisanom metodom za određivanje lipolitičke aktivnosti. U pufer je prethodno dodata odgovarajuća količina površinski aktivnih materija (oksidacionih agenasa) tako da je finalna koncentracija ovih aditiva u ispitivanoj smeši sirovog enzimskog preparata, pufera i PAM-a (oksidacionog agensa) iznosila 2% (w/v ili v/v). Natrijum dodecil benzol sulfonat (SDBS) i natrijum dodecil sulfat (SDS) su korišćeni u finalnoj koncentraciji od 0,1% (w/v). Takođe, lipolitička aktivnost je ispitana i u prisustvu 2% (w/v) različitih komercijalnih deterdženata koje proizvodi Midra Eko, Srbija.

Istovremeno je u svim slučajevima rađen i kontrolni uzorak, pripremljen na isti način, razblaženjem sirovog enzimskog preparata puferom, ali bez dodatka aditiva. Aktivnost enzima u prisustvu ispitivanih aditiva je preračunata u odnosu na kontrolni uzorak koji je uzet kao 100%.

Eksperimenti su izvedeni u termostatiranom vodenom kupatilu sa mešanjem (120 o min^{-1}) na temperaturi od $30 \text{ }^\circ\text{C}$ u toku 2,5 sata.

Na svakih pola sata vađeni su uzorci u kojima je određena lipolitička aktivnost spektrofotometrijskom metodom dodatkom rastvora *p*-nitrofenil-palmitata u izopropanolu u odgovarajućem odnosu.

Proteolitička aktivnost je određivana nakon jednog sata na osnovu reakcije hidrolize kazeina prema odgovarajućoj literaturi [11]. Jedinica enzimske aktivnosti (IU) proteaza je definisana kao količina enzima koja oslobađa $1 \text{ } \mu\text{mol}$ tirozina u minuti pri opisanim uslovima [11]. Relativna proteolitička aktivnost je preračunata u odnosu na kontrolni uzorak koji je uzet kao 100%.

PRIKAZ REZULTATA

U radu je ispitan uticaj nekoliko anjonskih i nejonskih površinski aktivnih materija na lipolitičku i proteolitičku aktivnost sirovog enzimskog preparata. Među ispitivanim surfaktantima su i natrijum dodecil benzol sulfonat (SDBS) i natrijum dodecil sulfat (SDS) koji se smatraju najagresivnijim agensima u formulacijama deterdženata i koji pokazuju snažno deaktivirajuće dejstvo na enzime. Takođe, ispitane su i različite komercijalne nejonske površinski aktivne materije na bazi estara poli-alkohola koje se koriste u modernim formulacijama deterdženata.

U početnim ispitivanjima je utvrđena visoka enzimska aktivnost dobijene fermentacione tečnosti. Naime, početna lipolitička aktivnost iznosila je oko 6400 IU dm^{-3} , dok je utvrđena aktivnost proteaza iznosila $18,8 \text{ IU cm}^{-3}$. Kako je inaktivacija lipaza proteazama jedan od osnovnih problema lagerovanja deterdženata koji sadrže enzime, prvi eksperimenti su se odnosili na utvrđivanje gubitka aktivnosti lipaze usled proteolize. Utvrđeno je da čuvanjem na sobnoj temperaturi u toku 24 časa, sirovi enzimski preparat zadržava više od 80% početne lipolitičke aktivnosti ukazujući na mogućnost korišćenja oba dobijena enzima u formulacijama deterdženata.

Drugi set eksperimenata obuhvatio je ispitivanje aktivnosti lipaza i proteaza u prisustvu anjonskih i nejonskih površinski aktivnih materija, kao i različitih oksidujućih agenasa.

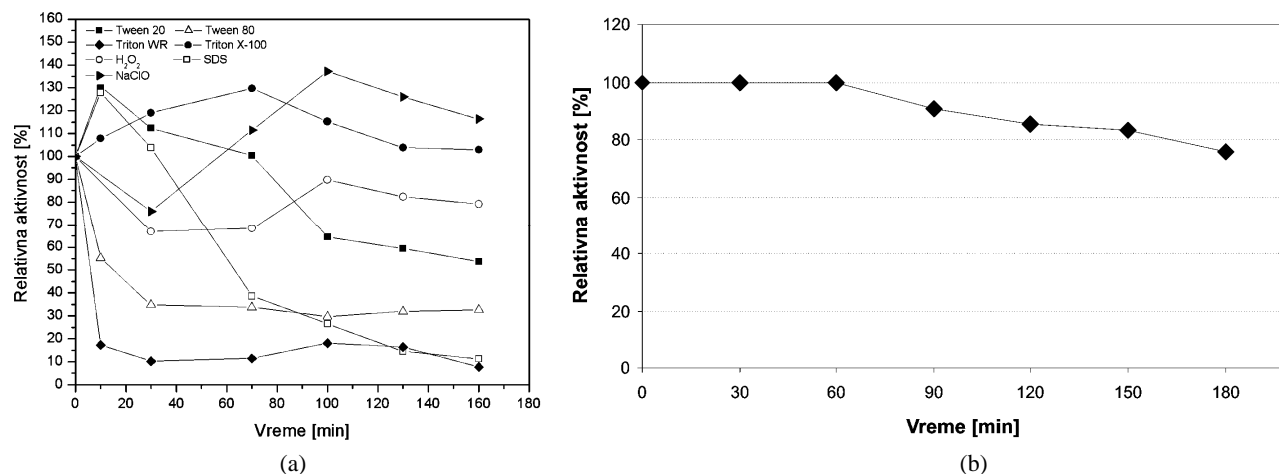
Na slici 1 prikazan je uticaj različitih površinski aktivnih materija i oksidacionih agenasa na aktivnost lipaza dobijenih iz *Pseudomonas aeruginosa*. Na slici 1b prikazana je aktivnost kontrolnog uzorka (bez dodatka PAM-ova ili oksidacionih agenasa). Aktivnost kontrolnog uzorka je preračunata u odnosu na aktivnost kontrolnog uzorka u trenutku razblaženja koja je uzeta kao 100%. Proteolitička aktivnost, određena pri istim uslovima nakon sat vremena, data je u tabeli 1.

Takođe, jedan od ciljeva ovog rada je ispitivanje dobijenih enzima u uslovima od realnog značaja za eventualnu primenu. Tako je ispitana kompatibilnost dobijene lipaze sa komercijalnim hemijskim deterdžentima. Rezultati ovog ispitivanja su prikazani na slici 2.

DISKUSIJA

Kao što se sa slike 1a vidi, jonske površinski aktivne materije već u malim koncentracijama snažno deaktivirajuće deluju na aktivnost lipaza. Tako, u prisustvu SDBS enzim već u prvih pola sata gubi oko 80% aktivnosti u odnosu na kontrolni uzorak.

S druge strane, dodatak SDS-a je imao drugačije dejstvo na aktivnost lipaze iz *P. aeruginosa*, u odnosu na SDBS, pa je u početnoj fazi primećeno i povećanje aktivnosti ($\sim 104\%$ nakon pola sata) u prisustvu ovog



Slika 1. a) Uticaj površinski aktivnih i oksidujućih materija na aktivnost lipaze u funkciji vremena na 30 °C; b) aktivnost kontrolnog uzorka u funkciji vremena na 30 °C.

Figure 1. a) The effect of surfactants and oxidizing agents on lipase activity as a function of time at 30 °C; b) control activity as a function of time at 30 °C.

surfaktanta. Međutim, nakon povećanja aktivnosti lipaze u prisustvu SDS-a, dolazi do naglog pada (nakon jednočasovne inkubacije u prisustvu ovog surfaktanta, zadržana je aktivnost lipaze od oko 40%). Ovo se može protumačiti tako da se u toku prvih 10 min povećava fleksibilnost supstrat vezujućeg/aktivnog mesta enzima, pa time i njegova aktivnost, a zatim kako enzim dejstvom SDS-a sve više gubi nativnu konformaciju, dolazi i do gubitka njegove aktivnosti. Dodatak nejonskih surfaktanata (Tween[®] 20 i Triton[®] X-100) takođe je pokazao potitivan uticaj na aktivnost lipaza u početnom periodu inkubacije enzima. Tako je nakon sat vremena, aktivnost lipaza u prisustvu Triton-a[®] X-100 iznosila čak 129,7% dok je dodatak Tween-a[®] 20 u manjoj meri aktivirao ovaj enzim (100,4%). Kako je nativni enzim bio stabilan u toku prvih 60 min, ovaj pozitivan uticaj navedenih surfaktanata se može objasniti aktivacijom enzima. Tako, moguće je da jonske interakcije između polarne glave SDS-a i enzima imaju ulogu u aktivaciji, dok nejonski surfaktanti slabo reaguju sa enzimom usled nedostatka doprinosa elektrostatičkih sila. Sumirajući objavljene podatke, pretpostavlja se da između lanaca etilen oksida nejonskih PAM i molekula enzima dolazi do stvaranja vodoničnih veza, što za posledicu ima povećanje konformacione fleksibilnosti u aktivnom centru enzima [14]. Ovi rezultati ukazuju na to da dobijeni enzim ima bolje karakteristike od do sada ispitanih alkalnih lipaza kao i od komercijalno korišćenog preparata Lipolase[®]. Naime, literaturni podaci pokazuju da u prisustvu 1% Triton-a[®] X-100, Tween-a[®] 20 i SDS-a, Lipolase[®] nakon sat vremena zadržava 67, 33 i 20% početne aktivnosti, redom [12]. Sa druge strane, lipaza dobijena iz našeg soja *P. aeruginosa* snažno je inhibirana dodatkom Tween-a[®] 80 i Triton-a[®] WR 1339 za koje je pokazano da stimulišu aktivnost nekih mikrobni lipaza [13].

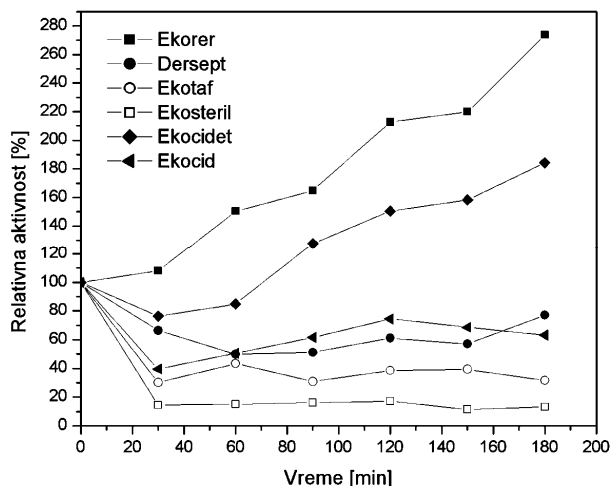
Tabela 1. Uticaj surfaktanata i oksidacionih agenasa na aktivnost proteaza nakon sat vremena na 30 °C

Table 1. The effect of surfactants and oxidizing agents on protease activity after 1 hour on 30 °C

Površinski aktivna materija (oksidacioni agens)	Relativna proteolitička aktivnost, %
Tween [®] 20	134,5
Tween [®] 80	31,03
Triton [®] X-100	140,3
Triton [®] WR 1339	86,21
SDBS	54,54
SDS	40,21
H ₂ O ₂	63,64
NaClO	94,74

Pseudomonas aeruginosa lipaza je pokazala i dobru aktivnost u prisustvu oksidacionih agenasa. Aktivnost u prisustvu oksidacionih agenasa je važna osobina enzima koja se ostvaruje metodama usmerene evolucije i proteinskog inženjeringa [4]. Ispitivana lipaza je pokazala superiorne karakteristike u poređenju sa komercijalnim lipolitičkim aditivom Lipolase[®], za koji je u literaturi navedeno da zadržava samo 33% aktivnosti u prisustvu H₂O₂, odnosno 43% u prisustvu NaClO pri koncentracijama od 1% nakon sat vremena [12]. Naime, nakon 100 min, u prisustvu 2% H₂O₂ i NaClO, ispitivana *P. aeruginosa* lipaza zadržala je 137 i 90% aktivnosti, redom. Aktivnost lipaze u prisustvu ovih aditiva pokazuje interesantan trend: u početnoj fazi aktivnost enzima je smanjena, nakon čega dolazi do povećanja aktivnosti lipaze. Kako je povećanje aktivnosti lipaze u prisustvu vodonik-peroksida i natrijum-hipohlorita utvrđeno u periodu inkubacije kada nativna lipaza gubi aktivnost (kontrolni uzorak), ovaj pozitivan efekat oksidacionih sredstava može da bude posledica stabilizacije

enzima oksidacionim sredstvima. Isto tako, moguće je da je do porasta aktivnosti došlo i usled gubitka oksidacione moći H_2O_2 i $NaClO$, koji dalje više ne utiču na enzim. Moguće je da su ovom gubitku oksidacione moći doprinele i komponente sirovog preparata enzima koje, iako prisutne u tragovima, smanjuju oksidacionu moć H_2O_2 i $NaClO$ od samog početka inkubiranja.



Slika 2. Uticaj dodatka komercijalnih deterdženata (2%) na aktivnost lipaza u funkciji vremena na 30 °C.

Figure 2. The effect of commercial detergent formulations (2%) on lipase activity as a function of time at 30 °C.

Prisustvo nekih komercijalnih hemijskih formulacija deterdženata (2%) takođe je povećalo lipolitičku aktivnost (slika 2). Ekocidet[®], komercijalna formulacija za čišćenje i dezinfekciju medicinskih instrumenata i površina u zdravstvenim ustanovama, pod navedenim uslovima uvećava početnu aktivnost lipaze za 84% u toku 3 h. Pod istim uslovima, formulacija za čišćenje rerni Ekorer[®] povećava aktivnost lipaze više od 2,5 puta. U literaturi je zabeleženo da komercijalni deterdženti čak i pri malim koncentracijama, a usled sinergijskog inhibirajućeg ili deaktivirajućeg dejstva komponenti koje sadrže, u velikoj meri umanjuju aktivnost komercijalnog enzimskog preparata Lipolase[®]. Tako je očuvana aktivnost ovog komercijalnog enzimskog preparata u prisustvu 1% (w/v) komercijalnih deterdženata Ariel[®], Wheel[®], Surf Ultra[®] i Rin Supreme[®] nakon sat vremena bila u opsegu 40–46%, dok je aktivnost alkalne lipaze iz *Burkholderia cepacia* vrste u prisustvu istih komercijalnih deterdženata bila 67, 80, 67, i 57%, redom [12].

Sirovi enzimski preparat pokazao je i značajnu proteolitičku aktivnost u prisustvu surfaktanata (tabela 1). Tako je zabeleženo da nakon jednočasovne inkubacije pod navedenim uslovima, Tween[®] 20 i Triton[®] X-100 značajno povećavaju aktivnost proteaza (≈134 i 140%, redom). Sličan trend je primećen i kod drugih *Pseudomonas* spp. proteaza. Naime, u literaturi je zabeleženo da je aktivnost proteaze *Pseudomonas* sp. JH1014 u

prisustvu Tween-a 20 povećana za 5%, dok je u prisustvu 2% Tritona-a X-100 ona iznosila 96% u odnosu na kontrolni uzorak [15]. S druge strane, naš sirovi enzimski preparat je u većoj meri inhibiran u prisustvu Tween-a 80 koji aktivira neke *Pseudomonas* spp. proteaze [16]. Takođe, aktivnost u prisustvu SDS-a nije zanemarljiva, tako je da nakon sat vremena očuvano oko 40% proteolitičke aktivnosti. Ovi rezultati su ohrabrujući jer je u literaturi zabeleženo da, u uslovima pod kojima su izvršena ta istraživanja, SDS u većoj meri inhibira proteaze dobijene iz nekih pripadnika roda *Bacillus* čije vrste se komercijalno koriste za dobijanje proteaza za upotrebu u industriji deterdženata [17].

ZAKLJUČAK

Enzimi dobijeni iz ispitane *Pseudomonas aeruginosa* vrste su pokazali izuzetnu aktivnost u prisustvu različitih površinski aktivnih materija, oksidacionih agenasa i komercijalnih deterdženata. Prisustvo nekih surfaktanata, kao što su Tween[®] 20 i Triton[®] X-100, povećalo je i lipolitičku i proteolitičku aktivnost ispitivanog sirovog enzimskog preparata. Takođe, primećena je i značajna aktivnost oba enzima u prisustvu oksidacionih agenasa. Sama lipaza je pokazala nepodložnost proteolizi, što ispitivani mikroorganizam čini industrijski atraktivnim za dobijanje aditiva za formulacije deterdženata.

Zahvalnica

Autori se zahvaljuju Dr N. Fujiwara (Technology Research Institute of Osaka Prefecture, Osaka, Japan) i Katedri za hemiju Medicinskog fakulteta (Beograd) na ljubaznoj donaciji radnog mikroorganizma. Autori se takođe zahvaljuju Ministarstvu za nauke i tehnološkog razvoj Republike Srbije na finansijskoj podršci ovih istraživanja (u okviru projekta TR 20064).

LITERATURA

- [1] E. Jurado, V. Bravo, G. Luzon, M. Fernandez-Serrano, M. Garcia-Roman, D. Altmajer-Vaz, J. Maria Vicaria, Hard-Surface Cleaning Using Lipases: Enzyme-Surfactant Interactions and Washing Tests, *J. Surfactant Deterg.* **10** (2007) 61–70.
- [2] C. Hemachander, R. Puvanakrishnan, Lipase from *Ralstonia pickettii* as an additive in laundry detergent formulations, *Process Biochem.* **35** (2000) 809–814.
- [3] Z. Knežević, Enzimsko inženjerstvo, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 2008, str. 439–446.
- [4] R. Gaur Ruchi, A. Gupta and S.K. Khare, Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain: Production optimization by response surface methodology and application, *Bioresour. Technol.* **99** (2008) 4796–4802.
- [5] S.Ž. Grbavčić, S.I. Dimitrijević-Branković, D.I. Bezbradica, S.S. Šiler-Marinković, Z.D. Knežević, Effect of

- fermentation conditions on lipase production by *Candida utilis*, J. Serb. Chem. Soc. **72** (2007) 757–766.
- [6] A. Gillis, Research discovers new roles for lipases, J. Am. Oil Chem. Soc. **65** (1988) 846–852.
- [7] H.B.M. Lenting, O. Misset, J.J.M. Labout, R. Bolle, A.J.A.M. Oomen, L.J.S.M. Mulleners, Identification of lipase for use in household detergents, In: International Meeting: Lipases Structure, Function and Protein Engineering (Book of Abstracts). Elsinore, Denmark, 1993.
- [8] I. Karadžić, A. Masui, N. Fujiwara, Purification and characterization of a protease from *Pseudomonas aeruginosa* grown in cutting oil, J. Biosci. Bioeng. **98** (2004) 145–152.
- [9] I. Karadžić, A. Masui, L. Izrael-Zivkovic, N. Fujiwara, 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.
- [10] S. Grbavčić, I. Lidija Izrael-Živković, D. Bezbradica, I. Karadžić, S. Šiler-Marinković and Z. Knežević, Uticaj sastava fermentacione podloge na prinos produkovanih lipaza pomoću *Pseudomonas aeruginosa* san-ai, 46. savetovanje SHD, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 2008, str. 51–54.
- [11] http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Enzyme_Assay/proteasecaseinsub.Par.0001.File.tmp/proteasecaseinsub.pdf
- [12] P. Rath, R.K. Saxena, R. Gupta, A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation, Process Biochem. **37** (2001) 187–192.
- [13] R. Gaur, A. Gupta, S.K. Khare, Purification and characterization of lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA, Process Biochem. **43** (2008) 1040–1046.
- [14] S.F. Santos, D. Zanette, H. Fisher, H., R.J. Itri, A systematic study of bovine serum albumin (BSA) and sodium dodecyl sulfate (SDS) interactions by surface tension and small angle X-ray scattering. Colloid. Interface. Sci. **262** (2003) 400–408.
- [15] H. Kim, J. Kim, Isolation and identification of detergent-compatible alkaline protease producing *Pseudomonas* JH1014, Agric. Chem. Biotechnol. **45** (2002) 61–65.
- [16] A. Gupta, I. Roy, S.K. Khare, M.N. Gupta, Purification and characterization of a solvent stable protease from *Pseudomonas aeruginosa* PseA, J. Chromatogr. A **1069** (2005) 155–161.
- [17] W.C. Almeida do Nascimento, M.L. Leal Martins, Studies on the stability of protease from *Bacillus sp.* and its compatibility with commercial detergent, Braz. J. Microbiol. **37** (2006) 307–311.

SUMMARY

LIPASES AND PROTEASES PRODUCED BY INDIGENOUS *Pseudomonas aeruginosa* STRAIN AS POTENTIAL DETERGENT ADDITIVES

Sanja Ž. Grbavčić¹, Dejan I. Bezbradica¹, Ivanka M. Karadžić², Zorica D. Knežević-Jugović¹

¹Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

²School of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

(Scientific paper)

Enzymes produced by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* strain have been subjected to research considering their potential application as detergent additives. As previously noted, lipase produced by *Pseudomonas aeruginosa* is highly alkaline, thermostable and solvent tolerant. Furthermore, same strain exhibits both lipase and protease activity establishing this lipase as potentially desirable component of enzyme-containing detergents. Further research was carried out to investigate insusceptibility of this lipase against coexisting native protease, several commercial surfactants, oxidizing agents and commercial detergents. Lipases and proteases remained highly active when incubated with several different surfactants and oxidizing agents under washing conditions. Moreover, presence of surfactants and oxidizing agents such as Tween[®] 20 and Triton[®] X-100 initially augment lipase and protease activity. Additionally, crude lipase preparation was insusceptible to coexisting native protease hence indicating possible storage stability. Overall, the remarkable properties of these enzymes make them potential detergent additives.

Ključne reči: Lipaza • Proteaza • Deterdženti • *Pseudomonas aeruginosa*
Key words: Lipase • Protease • Detergent • *Pseudomonas aeruginosa*