

ENZIMI – MOGUĆNOSTI DOBIJANJA I PRIMENE

Enzimi su biološki katalizatori sa sve većom primenom u prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj, tekstilnoj i hemijskoj industriji. Imajući u vidu sve veću potrebu da se, zbog sve većeg zagađenja životne sredine, i klasični hemijski procesi zamene alternativnim, sve je važnije da enzimski i drugi biotehnološki procesi budu i ekonomski isplativi. U tom smislu se sve više radi na smanjenju cene koštanja i na povećanju stabilnosti i efikasnosti enzimskih preparata. U ovom radu je dat kratak pregled metoda za povećanje prinosa i poboljšanje kvaliteta pri dobijanju enzima kao komercijalnih proizvoda, kao i pregled mogućnosti njihove primene.

Pod pojmom "enzimi" se obično podrazumevaju katalizatori biološkog porekla koji su po strukturi proteini [1]. Zadnjih dvadesetak godina se, međutim, sreću i pojmovi "ribozimi" za enzime koji su biološkog porekla, ali po strukturi nisu proteini nego ribonukleinske kiseline, i "veštački enzimi" za katalizatore koji kao takvi ne postoje u prirodi, a koji po svojim svojstvima "imitiraju" enzime. U ovom radu će uglavnom biti opisani "klasični" enzimi proteinske prirode koji su najbolje izučeni i koji imaju najveću praktičnu primenu.

DOBIJANJE ENZIMA

Enzimi su prirodni proizvodi i dobijaju se iz različitih vrsta bioloških organizama (od virusa i bakterija do biljaka, životinja i čoveka). Od enzima koji su našli primenu u različitim oblastima, samo oko 4% se dobijaju iz različitih biljnih, a samo oko 8% iz različitih životinjskih vrsta. Primeri za ovo su papain iz papaje, b-amilaza iz proklijalog ječma, ficin iz smokve, renin iz želuca teladi, enzimi iz zmijskog otrova i dr. Većina drugih enzima se dobija iz mikroorganizama – i to preko jedne polovine iz gljivica i kvasaca, a preko jedne trećine iz bakterija. Razlozi za ovo su pre svega u činjenici što se, za razliku od biljaka i životinja, u ćelijama mikroorganizama količina stvorenog enzima može lako povećati selekcijom, izborom hranljive podloge i genetskim manipulacijama. Kod kataboličkih enzima se prinos može povećati do više hiljada, a kod biosintetičkih više stotina puta. Druga prednost mikroorganizama kao izvora za dobijanje enzima je u ekonomičnosti – zbog kratkih fermentacionih ciklusa i jeftinih hranljivih podloga [2]. Enzimi kod mikroorganizama mogu da budu ekstracelularni ili intracelularni u zavisnosti od toga da li se izlučuju ili ne u spoljnu sredinu, a inducibilni, delimično inducibilni ili konstitutivni u

zavisnosti od toga da li je za njihovu biosintezu neophodno prisustvo posebne supstance, induktora. Konstitutivni enzimi se uvek stvaraju od strane ćelija organizma, bez obzira na sastav okolne sredine (hranljive podloge kod mikroorganizama).

Prinos enzima kod mikroorganizama se može povećati: izborom soja, korišćenjem mutantnih mikroorganizama, korišćenjem imobilisanih ćelija mikroorganizama, optimizovanjem procesa kultivacije (sastava hranljive podloge i fizičkih parametara: temperatura, pH, aeracija i dr.), izborom najviše tačke ciklusa rasta, optimizovanjem procesa indukcije, sprečavanjem represije konačnim proizvodom, sprečavanjem kataboličke represije, korišćenjem fuzije protoplasta i korišćenjem tehnologije rekombinatne DNK (genetskog inženjerstva) [2,3]. Pored povećanja prinosa, izborom soja, korišćenjem mutantnih mikroorganizama i tehnologijom rekombinatne DNK se može ostvariti i poboljšanje svojstava dobijenih enzima.

U okviru iste vrste mikroorganizma postoji jako veliki broj sojeva izolovanih iz različitih izvora i sa različitim lokacijama (prilagođenih različitim uslovima života) koji se međusobno razlikuju po mnogim morfološkim i fiziološkim svojstvima, a takođe i po količini i svojstvima enzima koje stvaraju. Sojevi mikroorganizama se mogu dobiti ili kupiti iz odgovarajućih laboratorija, muzejnih i drugih kolekcija, a mogu se naći (ili razraditi) postupci njihovog izolovanja iz prirodnih izvora. Kriterijumi za izbor najpogodnijeg soja su veličina nađene enzimske aktivnosti, svojstva enzima i jednostavnost procedura neophodnih za dobijanje konačnog proizvoda. Što se tiče svojstava, često su veoma pogodni enzimi iz termofilnih mikroorganizama, a što se tiče jednostavnosti procedura – ekstracelularni enzimi uvek imaju prednost u odnosu na intracelularne.

Posle izbora soja mikroorganizama, polazna aktivnost se može povećati delovanjem fizičkih (povišene temperature, UV-, rendgensko i γ -zračenje), hemijskih (analozi baza, alkilirajući i interkalirajući agensi, HNO_2 , HONH_2 , nitrozogvanidin i dr.) i bioloških mutagenih fak-

Adresa autora: Ž.B. Petronijević, Tehnološki fakultet, Bulevar oslobođenja 124, 16000 Leskovac

Rad saopšten na skupu "Savremene tehnologije i privredni razvoj", Oktobar 10-11, 2003, Leskovac, kao sekcijско predavanje u okviru rada Sekcije za biohemijsko inženjerstvo.

tora. Izolovanje mutanata (morfoloških, biohemijskih, fizioloških ili revertanata) sa najboljim svojstvima (i najvećim prinosom enzima) iz mutagenizirane populacije se vrši različitim metodima selekcije [4–7]. U slučajevima kada do mutacija dolazi unutar strukturnih gena datog enzima, ovim postupkom se mogu poboljšati i svojstva enzima.

Optimizovanje procesa kultivacije podrazumeva izbor optimalnog sastava hranjive podloge (vrste i koncentracije izvora ugljenika, azota, fosfora, različitih metala, tenzida, faktora rasta i dr.) i fizičkih parametara koji obezbeđuju maksimalni prinos enzima [2,8]. Veoma je važno u svakom konkretnom slučaju izvršiti izbor najviše tačke ciklusa rasta (vremena pri kome se postiže maksimalni prinos), zato što posle tog vremena obično dolazi do brzog smanjenja prinosa.

Kod kataboličkih enzima do značajnog povećanja prinosa dolazi optimizovanjem procesa indukcije: a) izborom vrste i koncentracije induktora, ili b) dobijanjem "konstitutivnih" mutanata koji bez induktora stvaraju inducibilne enzime. I jednom i drugom metodom se mogu dobiti superproducenti kod kojih prinos enzima može da dostiže i 10% ukupne suve mase ćelija [2,3,9–13].

Kod biosintetičkih (a i nekih kataboličkih enzima) se prinos može značajno povećati sprečavanjem represije konačnim proizvodom. To se ostvaruje isključenjem konačnih proizvoda (ili supstrata iz kojih oni nastaju) iz hranjive podloge, primenom inhibitora enzima koji katalizuju njihovo stvaranje, ograničenjem pristupa faktora rasta auksotrofnom mutantu, ili korišćenjem regulacionih mutanata (mutanata rezistentnih na represiju konačnim proizvodom) [2,3].

Pošto je katabolička represija (isključenje ekspresije strukturnih gena inducibilnih enzima u prisustvu izvora ugljenika koji se lako i konstitutivno utiliziraju) vrlo čest uzrok malih prinosa mnogih komercijalno značajnih enzima, sprečavanje ove represije je važna mogućnost za povećanje prinosa. To se najčešće ostvaruje a) isključenjem iz sastava hranjive podloge komponenata koji izazivaju kataboličku represiju i njihova zamena drugim, ili (ako je to ekonomski neracionalno) njihovo održavanje na najnižem mogućem nivou, i b) korišćenjem mutanata rezistentnih na kataboličku represiju. Tako se npr. kod mutanta *Salmonella typhimurium* rezistentnog na kataboličku represiju enzima amidaze ovaj enzim stvara u količini do 10% ukupnih ćelijskih proteina [14].

Tehnologija rekombinantne DNK (genetsko inženjerstvo) omogućava a) da se u genom, tj. u organizam domaćina, unese neki strani gen iz nekog drugog živog organizma (ili sintetizovan u laboratoriji), b) da se on normalno nasleđuje u toku razvoja, i c) da dolazi do njegove ekspresije, tj. do stvaranja proteina koji je njime kodiran. Razvoj genetskog inženjerstva je postao moguć pronalaskom enzima restrikcionih endonukleaza, koji su ključni element ove tehnologije. Restrikcione endonukleaze omogućavaju ugradnju fragmenata DNK u vektor (stvaranje rekombinantne DNK), dok se kovalentno po-

vezivanje fragmenata ostvaruje DNK–ligazama [5,7,9,15–17].

Tehnologija rekombinantne DNK omogućava:

– Industrijsku proizvodnju enzima i drugih proteina (hormona, citokina i dr.) koji se inače stvaraju u organizmu čoveka i drugih živih bića u veoma malim količinama [16,18].

– Da se procesi proizvodnje enzima učine jeftinijim tako što će se izolovanje iz biljnih i životinjskih tkiva zameniti procesom fermentacije sa mikroorganizmima. Primeri za ovo su dobijanje: a) renina (sirište za zgrušavanje mleka), b) pepsina, tripsina, himotripsina i dr. enzima digestivnog trakta, c) papaina i dr. [16,17,19].

– Da se sa dobrim prinosom dobiju enzimi sa dobrim karakteristikama, npr. mnogo veće stabilnosti. Klonovanjem gena za α -amilazu iz termofilnih mikroorganizama u *Bacillus subtilis* se koriste dobre karakteristike bakterije *B. subtilis*, kao producenta koji daje visoke prinose ekstracelularnih enzima, za produkciju visoko termostabilnog enzima kodiranog genom iz termofilnih mikroorganizama (koji inače daju slab rast i mali prinos enzima).

– Dobijanje superproducenta. Prinos enzima i drugih proteina (tj. učestanost ekspresije pod datim uslovima kultivacije) zavisi od: a) afiniteta RNK–polimeraze prema promotoru datog gena (operona) i b) broja kopija datog gena. Tehnologija rekombinantne DNK omogućava, pored ugradnje novog gena u organizam domaćina, i laku ugradnju vrlo efikasnih promotora (npr. *lac* ili *trp*) sa velikim afinitetom prema RNK–polimerazi. Broj kopija klonovanog gena se može uvećati i više hiljada puta primenom faga ili plazmida sa oslabljenom kontrolom replikacije [9].

– Klonovanje većeg broja različitih gena iz različitih organizama u jedan mikroorganizam. To bi bili geni za enzime (ili druge proteine) koji su svi potrebni za rešavanje datog problema. Primer: uvođenje u kvasac gena za enzime celulazu, ksilanazu, ksilozo–izomerazu i za enzime koji razlažu lignin, čime se omogućava prevođenje otpadnih proizvoda: slame, kukuruzovine, piljevine, lišća i dr. biljnih otpadaka u alkohol [17].

– Plansko stvaranje (dizajniranje) novih enzima (proteina) – proteinsko inženjerstvo. To se može ostvariti ciljanim izmenama u sekvenci na mestima od kojih značajno zavise svojstva proteina (specifično usmerena mutageneza) [5,19–23] ili međusobnim povezivanjem karakterističnih elemenata strukture (domena) različitih proteina. U prvom slučaju se dobijaju mutantni, a u drugom hibridni i fuzioni enzimi [24].

* * *

Kada se dobijanje enzima vrši iz mikroorganizama, uvek se prvo vrši gajenje (kultivacija) mikroorganizama (najčešće 1–2 dana kod bakterija i 4–10 dana kod kvasaca i gljivica). Ekstracelularni enzimi se (u sirovom, neprečišćenom obliku) dobijaju prostim uklanjanjem ćelija centrifugiranjem, dok je kod intracelularnih neophodno

razaranje ćelija i ekstrakcija enzima. Posle ovoga obično je potrebno izvršiti (u manjoj ili većoj meri) i prečišćavanje enzima.

Za razaranje ćelija postoje mnogobrojne metode [2,25], a ekstrakcija enzima se vrši puferima odgovarajućeg pH i jonske jačine. Nekada se solubilizacija hidrofobnih enzima (uključenih u membrane) vrši i pomoću (nejonskih) deterdženata, organskih rastvarača, fosfolipaze A, ultrazvuka i dr. [25]. Za prečišćavanje enzima se koriste metode taloženja solima, organskim rastvaračima, vodorastvornim polimerima, raspodela u višefaznim sistemima, hromatografske i elektromigracione metode i dr [25].

PRIMENA ENZIMA

Prvi enzim koji je počeo komercijalno da se proizvodi (još 1890. godine) je bila α -amilaza iz *Aspergillus oryzae* [16]. Međutim, takvih proizvoda je bilo vrlo malo sve do početka 60-tih godina prošlog veka kada je počela primena enzima za hidrolizu skroba i u deterdžentima. Kasnije enzimi nalaze sve veću primenu u prehrambenoj i drugim industrijama. Već 1980. g. se godišnje proizvodi 530 t proteaza, 350 t glukoamilaze, 320 t α -amilaze i 70 t glukoziozomeraze [17]. Zadnjih godina je prodaja industrijskih enzima dostigla vrednost od 1,6 biliona US\$, od čega skoro trećinu čine enzimi u deterdžentima [26]. Taj trend se nastavlja, tako da imamo godišnji rast od oko 10% za koji se pretpostavlja da će se zadržati i u budućnosti [27]. Važno je i to da je ukupna vrednost dobijena uz pomoć enzima mnogo puta veća od vrednosti njih samih.

Pre konačne primene obično se vrši imobilizacija enzima, tj. njihovo prevođenje u nerastvorni oblik [28–32]. Na ovaj način se homogeni katalizator prevodi u heterogeni, što omogućava njegovo lako izdvajanje po završetku reakcije, njegovo višekratno korišćenje u šaržnim procesima, kao i dugotrajno (nekada i više od 100 dana) korišćenje u kontinualnim procesima. Imobilizacijom, hemijskim modifikacijama, umrežavanjem ili različitim dodacima se stabilnost enzima može povećati i više stotina puta, što njihovu primenu čini sve konkurentnijom u odnosu na alternativne procese.

U svetu, zbog sve većeg zagađenja životne sredine, već duže vreme postoji trend zamene hemijskih procesa biotehnološkim. Primena enzima za sintezu i modifikaciju organskih jedinjenja dolazi posebno do izražaja u tzv. finim (malotonažnim) organskim sintezama. Tu se koriste prednosti enzima: velika specifičnost, mogućnost ostvarivanja velikih brzina reakcije pod blagim uslovima i odsustvo sporednih proizvoda – najčešće za sintezu jedinjenja koja se koriste u farmaciji, kozmetici i sl. Ovi procesi, koji se obično izvode sa imobilisanim enzimima ili imobilisanim ćelijama, mogu da budu konkurentni čisto hemijskim procesima. Važnu ulogu igra i činjenica da enzimi mogu vrlo efikasno da katalizuju i reakcije u micelama, reversnim micelama, pa čak i u anhi-

drovanim organskim rastvaračima. Poznato je, takođe, da enzimi koji pod uobičajenim uslovima, u vodenom rastvoru katalizuju samo reakcije hidrolize, mogu u reversnim micelama i u organskim rastvaračima da katalizuju i reakcije sinteze, npr. estara, glikozida i sl. Zadnjih 10–15 godina se razvijaju i enzimski procesi u gasnoj fazi sa lipazama, hidrogenazama, alkohol-oksidadama i sl. [33].

Komercijalno najznačajniji procesi ove vrste su dobijanje prirodnih (L-oblika) aminokiselina (asparaginske kiseline iz fumarne sa aspartatamonijakliazom, alanina iz L-asparaginske kiseline, lizina iz α -aminokaprolaktama, tirozina, triptofana i dr.), prevođenje racemske smeše (D,L-oblika) aminokiselina (dobijenih hemijskom sintezom) u L-oblik (sa enzimom aminoacilazom), dobijanje jabučne kiseline (iz fumarne sa fumarathidratiazom), urokanove kiseline (iz histidina sa histidinamonijakliazom), 6-aminopenicilinske i 7-aminodezoksicefalosporinske kiseline (intermedijera za proizvodnju modifikovanih β -laktamskih antibiotika) sa penicilinamidazom, i dr. [28]

Pored toga što se koriste kao katalitički agensi u procesima dobijanja lekova, mnogi enzimi se i sami koriste kao lekovi. To su, pre svega, fibrinolizin, urokinaza i streptokinaza za trombolitičku terapiju, L-asparaginaza i L-glutaminaza za terapiju kancera, β -glukocerebrozida za tip 1 Gaučerove bolesti, DNK-aza za terapiju cistične fibroze [26] i dr. Da bi se povećala njihova efikasnost, za primenu u medicini se koriste enzimi u modifikovanom obliku, često ugrađeni u mikrokapsule ili liposome [28]. Značajno je korišćenje enzima i kao glavnih "meta" (targeta) za stvaranje novih lekova.

Sve je značajnija primena enzima (samih ili u kombinaciji sa hemijskom sintezom) u sintezi novih polimernih materijala. Lipaze i proteaze se koriste za sintezu poliestara tipa A–B i AA–BB polikondenzacijom oksikiselina ili derivata dikarbonskih kiselina (AA) sa diolima (BB) [34]. Enzim peroksidaza se može upotrebiti za dobijanje polimera fenola, aromatičnih amina, stirena, akrilamida i drugih jedinjenja polimerizacijom preko slobodnih radikala [35,36]. Očekuje se da ovakvi procesi nađu posebnu primenu za uklanjanje fenolnih i drugih jedinjenja iz otpadnih voda [37,38].

Najveću primenu u prehrambenoj industriji imaju enzimi α -amilaza i glukoamilaza kod hidrolize skroba i dobijanja glukoznog sirupa i glukoziozomeraza za prevođenje glukoze u fruktozu. Značajna je i primena α -amilaze u pekarskoj industriji, β -amilaze u proizvodnji maltoznog sirupa, proteaza za razmekšavanje mesa i hidrolizu sojinih proteina, želatina, mesa i ribe, renina (i drugih proteaza) u proizvodnji sira, pektinolitičkih enzima za povećanje prinosa i bistrenje sokova od voća i povrća, i laktaze (β -galaktozidaze) za dobijanje bezlaktognog mleka i obradu surutke [39]. Fitaze i ksilanaze se koriste kao dodatak hrani za životinje, koji omogućava njeno bolje iskorišćenje [26].

U industriji deterdženata najveću primenu imaju proteolitički enzimi (subtilizin, alkalne i metalo-proteaze)

i amilaze, dok se lipaze primenjuju u manjoj meri (u deterdžentima za posuđe) [39].

U tekstilnoj industriji se enzimi koriste za odskrobijavanje (amilaze), biopoliranje, biokamenovanje i poboljšanje opipa pamučnih tkanina (celulaze), uklanjanje voskastih nečistoća (pektinaze, lipaze i celulaze), modifikaciju poliestarskih vlakana (esteraze i lipaze), popravljavanje sjaja i mekoće vunjenih i svilenih tkanina (proteaze), i za uklanjanje H₂O₂ posle beljenja (katalaza) [40].

U industriji kože se za uklanjanje dlaka i vune, kao i u procesu štavjenja, primenjuju alkalne i druge proteaze, što proces čini bržim i boljim sa tačke gledišta zaštite životne sredine.

Interes za korišćenje enzima i sličnih biokatalitičkih sistema za konverziju jednog oblika energije u drugi je veliki zato što su kod bioloških sistema ti mehanizmi skoro savršeni. Tri glavne grupe takvih rešenja čine: a) konverzija jeftinih ili otpadnih ugljenohidratnih sirovina u H₂, CH₄ i niže alkohole, b) prevođenje sunčeve energije u energiju H₂ i O₂ pomoću enzima fotosintetičkog aparata biljaka i bakterija (biofotoliza vode), i c) enzimski konverzija hemijske energije goriva u električnu [28]. Jedan od primera za takva rešenja je i biokatalitička ćelija sa imobilisanom glukozooksidazom koja stvara električnu energiju za mikrohirurške robote i veštačke organe [41].

Za primenu u hemijskim analizama se koriste enzimi u rastvoru, kao i enzimi u imobilisanom obliku i u obliku imobilisanih ćelija i organela. Za analitičke svrhe se koriste i posebni reaktori sa imobilisanim enzimima (automatski analizatori), kao i enzimski elektrode i biosenzori. Ovim metodama se određuje urea (sa ureazom), glukoza (sa glukozooksidazom i peroksidsazom), urati, aminokiseline, etanol, lipidi, nukleotidi, antibiotici i mnoga druga organska i neorganska jedinjenja. Poseban značaj u medicini imaju imunoenzimski metode ispitivanja [28].

Osim navedenih enzima koji se koriste u velikim količinama značajna je i proizvodnja mnogih drugih koji se troše u malim količinama, npr. za istraživanja. Značajna je i komercijalizacija mnogih enzima koji deluju na DNK i RNK (restriktione endonukleaze i dr.) u cilju razvoja moderne biotehnoške industrije [26].

LITERATURA

[1] Ž. Petronijević, Opšta i primenjena enzimologija I, Tehnološki fakultet, Leskovac, 2000.
 [2] D. I. C. Wang, C. L. Coonney, A. L. Demain, P. Dunnill, A. E. Humphrey and M. D. Lilly, Fermentation and enzyme technology, Wiley Int. Publ., New York, 1979.
 [3] Ž. Petronijević, Facta Universitatis, Series: Physics, Chemistry and Technology, **1** (1996) 268–296.
 [4] F.G. Priest, Extracellular enzymes, Van Nostrand Reinhold Co. Ltd., London, 1984.
 [5] V. G. Debabov i V. A. Livshic, Sovremennye metody sozdaniya promishlennyh shtamov mikroorganizmov, Vishaya shkola, Moskva, 1988.
 [6] G. A. Nikitin, Biohimicheskie osnovy mikrobiologicheskikh proizvodstv, Vishaya shkola, Kiev, 1981.

[7] J. E. Bailey and D. F. Ollis, Biochemical engineering fundamentals, McGraw-Hill Book Co., New York, 1987.
 [8] Ž. Petronijević, B. Cvetković, R. Nešić and S. Stanković, Mikrobiologija, **30** (1993) 89–96.
 [9] B. Lewin, Genes, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1987.
 [10] A. L. Demain, Increasing enzyme production by genetic and environmental manipulation, Meth. Enzymol., **22** (1971) 86–95.
 [11] D. Kim and J. F. Robyt, Enzyme Microb. Technol., **16** (1994) 659–664.
 [12] D. Kim and D. F. Day, Lett. Appl. Microbiol., **20** (1995) 268–270.
 [13] Ž. Petronijević, R. Mihajlović, S. Ristić and D. Pešić, Mikrobiologija, **38** (u štampi).
 [14] J. L. Betz, P. R. Brown, J. M. Smith and P. H. Clarke, Nature, **247** (1974) 261–264.
 [15] T. Maniatis, E.E. Fritsch and J. Sambrook, Molecular cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Labor., 1982.
 [16] I.J. Higgins, D.J. Best and J. Jones (Eds.), Biotechnology. Principles and applications, Blackwell Sci. Publ., Oxford, 1985.
 [17] A. Sasson, Biotechnologies: challenges and promises, Unesco, 1985.
 [18] R.F. Beers, Jr. and E.G. Bassett (Eds.), Recombinant molecules: impact on science and society, Raven Press, New York, 1977.
 [19] M.V. Arbige and W. H. Pitcher, Trends Biotechnol., **7** (1989) 330–335.
 [20] P. Collman and W. F. van Gunsteren, Meth. Enzymol., **154** (1987) 430–450.
 [21] R.W. Old and S.B. Primrose, Principles of gene manipulation, Blackwell Scientific Publ., Oxford, 1989.
 [22] M.J. Zoller and M. Smith, Meth. Enzymol., **154** (1987) 329–350.
 [23] A. Skandalis, L. P. Encell and L. A. Loeb, Chemistry & Biology, **4** (1997) 889–898.
 [24] F.J. Dilworth, S.M. Black, Y.-D. Guo, W.L. Miller, and G. Jones, Biochem. J., **320** (1996) 267–271.
 [25] R.K. Scopes, Protein purification. Principles and practice, Springer Verlag, New York, 1982.
 [26] E. Weck, Commercial Opportunities in Enzyme Technologies, D&MD Reports, Report #9069, 2002.
 [27] <http://www.tab.fzk.de/en/projekt/zusammenfassung/AB46.htm>
 [28] I. V. Berezin i K. Martinek (Red.), Vvedenie v prikladnuyu ENZIMOLOGIYU. Immobilizovannyye fermenty, Izd. Mosk. Un-ta, Moskva, 1982.
 [29] Ž. Petronijević, Dobijanje, prečišćavanje i imobilizacija enzima dekstransaharaze iz *Leuconostoc mesenteroides* B-512F, Disertacija, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 1988.
 [30] Ž. Petronijević, S. Jovanović and R. Nešić, J. Serb. Chem. Soc., **53** (1988) 581–586.
 [31] Ž. Petronijević, S. Jovanović and R. Nešić, J. Serb. Chem. Soc., **55** (1990) 145–151.
 [32] Ž. Petronijević, S. Jovanović and R. Nešić, Facta Universitatis, Series: Physics, Chemistry and Technology, **1** (1994) 95–102.
 [33] S. Lamare and M.-D. Legoy, Trends Biotechnol., **11** (1993) 413–418.
 [34] J.S. Dordick, Trends Biotechnol., **10** (1992) 287–293.

- [35] A. Singh, D. Ma and D. L. Kaplan, *Biomacromolecules*, **1** (2000) 592–596.
- [36] M.S.R. Ayyagari, D.L. Kaplan, S. Chatterjee, J.E. Walker and J.A. Akkara, *Enzyme Microb. Technol.*, **30** (2002) 3–9.
- [37] M. Masuda, A. Sakurai and M. Sakakibara, *Enzyme Microb. Technol.*, **28** (2001) 295–300.
- [38] D.A. Villalobos and I.D. Buchanan, *J. Environ. Eng. Sci.*, **1** (2002) 65–73.
- [39] W.M. Fogarty (Eds.), *Microbial enzymes and biotechnology*, Applied Science Publishers, London–New York, 1983.
- [40] <http://science.ntu.ac.uk/research/enzytex/>
- [41] S. Sasaki and I. Karube, *Trends Biotechnol.*, **17** (1999) 50–52.

SUMMARY

ENZYMES – THE POSSIBILITY OF PRODUCTION AND APPLICATIONS

(Review paper)

Živomir B. Petronijević
Faculty of Technology, University of Niš, Leskovac

Enzymes are biological catalysts with increasing application in the food, pharmaceutical, cosmetic, textile and chemical industry. They are also important as reagents in chemical analysis, leather fabrications and as targets for the design of new drugs. Keeping in mind the growing need to replace classical chemical processes by alternative ones, because of ever growing environmental pollution, it is important that enzyme and other biotechnological processes are economical. Therefore, price decrease and stability and enzyme preparation efficiency increase are required more and more. This paper presents a short review of methods for yield increase and the improvement of the quality of enzyme products as commercial products, as well as a review of the possibilities of their application.

Key words: Enzymes • Yield • Optimisation • Recombinant DNA technology • Superproducers • Applications •
Ključne reči: Enzimi • Prinos • Optimizovanje • Tehnologija rekombinantne DNK • Superproducenti • Primena •