

## I. Wstęp

### 1.1 Enzymy o potencjalnym zastosowaniu przemysłowym

Enzymy to biokatalizatory reakcji chemicznych przyspieszają procesy metaboliczne 10<sup>8</sup>-10<sup>12</sup> razy szybciej w porównaniu do reakcji niekatalizowanej. Enzymy są zdolne do funkcjonowania także w środowisku zewnątrzkomórkowym (Walczak i in. 2013, Stryer 2003).

Produkcja przemysłowa enzymów została zapoczątkowana w roku 1874, kiedy to Christian Hansen wyizolował po raz pierwszy chymozyn (rennin) z żołądków cieląt. Początkowo była wykorzystywana do produkcji serów. Obecnie chymozyna jest produkowana z wykorzystaniem mikroorganizmów transformowanych genetycznie do których został wprowadzony został gen bydlęcej prochymozyny. Szczep *Escherichia coli* K-12 był pierwszym transformowanym organizmem dopuszczonym do użycia w produkcji żywności przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA, Food and Drug Administration) (Olempska-Beer i in. 2006). Enzymy zawdziaczają swoją popularność kilku zaletom: są specyficzne substratowo, obniżają energię aktywacji reakcji, są w pełni biodegradowane oraz istnieją możliwości ich immobilizacji.

Ze względu na typ przeprowadzanej reakcji chemicznej enzymy dzielą się na: oksydoreduktazy, transferazy, hydrolazy, ligazy, izomerazy. Do celów przemysłowych największe zastosowanie mają hydrolazy, które katalizują rozkład substratu z udziałem cząsteczki wody. Do hydrolaz zaliczamy m.in. amylazy, proteazy, celulazy, lipazy, chitynazy, nukleazy (Stryer 2003, Fronk i Zbek 1995).

Potencjalnie enzymy można pozyskiwać z mikroorganizmów, roślin i zwierząt. Jednak na skalę przemysłową wykorzystuje się mikroorganizmy, ponieważ są łatwe w utrzymaniu, wymagają mniej zasobów przestrzennych, czasowych i finansowych. Dodatkowo wprowadzenie modyfikacji genetycznych jest prostsze w porównaniu do roślin i zwierząt (Sundarram i Murthy 2014).

### 1.2 Enzymy amylolityczne

Skrobia jest polisacharydem składającym się z dwóch typów polimerów: amylozy w 20-25%, która jest liniowym łańcuchem składającym się z glukozy połączonych wiązaniem  $\alpha$ -1-4-glikozydowym oraz amylopektyny stanowicej 75% do 80% masy skrobi. Amylopektyna składa się z cząsteczek glukozy połączonych wiązaniami  $\alpha$ -1-4-glikozydowym oraz co około 15 do 45 podjednostek glukozy pojawia się rozgałęzienie za pomocą wiązania  $\alpha$ -1-6-glikozydowego (Sundarram i Murthy 2014).

Według nomenklatury biochemicznej enzymy amylolityczne dzielą się na:  $\alpha$ -amylazę,  $\beta$ -amylazę,  $\gamma$ -amylazę oraz glukoamylazę. Podczas upływniania skrobi  $\gamma$ -amylaza katalizuje hydrolizę wewnątrzcząsteczkowego wiązania  $\alpha$ -1,4-glikozydowego w skutek czego następuje szybko i spadek lepkości kleiku skrobiowego.  $\gamma$ -amylaza jest egzohydrolazą i przeprowadza hydrolizę wiązania  $\alpha$ -1,4-glikozydowego na nieredukującym końcu, w wyniku czego powstają cząsteczki maltozy. Optymalne pH dla tego enzymu wynosi 4,0 do 5,5. Jest używana w browarnictwie i gorzelnictwie, produkcji syropów maltozowych oraz badaniach naukowych nad strukturą skrobi i glikogenu (Sundarram i Murthy 2014).  $\beta$ -Amylaza odpowiada za rozkład wiązania  $\alpha$ -1-6-glikozydowych oraz dodatkowo  $\alpha$ -1,4-glikozydowych na niezredukowanym końcu uwalniając cząsteczki glukozy. Proces ten zachodzi najefektywniej w pH 3 (Sundarram i Murthy 2014). Glukoamylaza hydrolizuje wiązania  $\alpha$ -1,4-glikozydowe oraz  $\alpha$ -1,6-glikozydowe (Sundarram i Murthy 2014, Sauer i in. 2000).

Zastosowanie enzymów amylolitycznych

Enzymy amylolityczne są produkowane przez bakterie: *Chromohalobacter* sp. TVSP 101 (Prakash i in. 2009), *Bacillus coagulans* (Babu i Satyanarayana 1995), *Bacillus* sp. PS-7 (Sodhi i in. 2005) oraz grzyby: *Aspergillus kawachi* (Sudo i in. 1994), *Aspergillus awamori* (Prakasham i in. 2007), *Penicillium janthinellum* (NCIM 4960) (Sindhu i in. 2009).

Spośród wszystkich enzymów amylolitycznych największe zastosowanie przemysłowe ma  $\alpha$ -amylaza w piekarnictwie, przemśle chemicznym (produkcja detergentów), papiernictwie, przemśle tekstylnym oraz produkcji biopaliw (Sundarram i Murthy 2014).  $\alpha$ -Amylaza jest dodawana do maki podczas pieczenia ciasta, dzięki czemu następuje hydroliza skrobi do krótkich dekstryn, które dalej są wykorzystywane przez drożdże. Hydroliza skrobi zmniejsza lepkość maki co poprawia strukturę bochenka i zwiększa jego objętość. Podczas przechowywania chleba zachodzi wiele niekorzystnych zmian takich jak: stwardnienie, utrata chrupkości, wilgotności, smaku potocznie nazywanych starzeniem. Zapobieganie starzeniu chleba polega na dodaniu wraz z  $\alpha$ -amylazą pullulanazy.  $\alpha$ -Amylaza jest powszechnie wykorzystywana jest jako składnik detergentów. Konsumenci preferują używanie chłodnej wody i łagodnych warunków podczas prania z uwagi na mniejsze koszty oraz mniejsze zniszczenie ubrań. Do ubrań zabrudzonych skrobią do szybko przyczepiają się inne cząstki w wyniku czego plama powiększa się.  $\alpha$ -Amylaza rozkładając skrobię pomaga usuwać plamy (Sundarram i Murthy 2014). Współczesne procesy produkcji w przemyśle włókienniczym mogą prowadzić do rozerwania nici w tkaniu. Do zabezpieczania nici przed zerwaniem stosuje się różnego rodzaju protektory. Jednym z nich jest skrobia, którą jest tania, łatwo dostępna oraz jej usuwanie nie stanowi większego problemu. Po procesie tkania warstwa skrobi porywająca nie jest poddawana hydrolizie do cukrów prostych, które są łatwo usuwane podczas prania. Amylazy rozkładając skrobię pozostawiają włókna tkaniny nie naruszone (Sundarram i Murthy 2014).

W celu poprawy jakości papieru w trakcie jego wytwarzania i obróbki wykorzystuje się skrobię. Z uwagi na wysoką naturalną lepkość surowej skrobi należy ją wstępnie strawić  $\alpha$ -amylazą. Proces produkcji papieru można podzielić na trzy etapy. W pierwszym etapie skrobia jest dodawana do mokrej masy papierniczej, z której powstaje wstęga papieru. Dzięki temu wyprodukowany papier będzie mocniejszy oraz mniej podatny na blaknięcie. W kolejnym etapie na powierzchnię utworzonej wstęgi papieru nanosi się skrobię. Proces ten ma za zadanie wygładzenie struktury papieru oraz zabezpieczenie przed ewentualnym rozpylaniem atramentu na dalszych etapach. W ostatnim etapie skrobię w połączeniu z klejami oraz pigmentami pokrywa się papier w celu nadania ostatecznego koloru, połysku oraz gładkości (Maurer 2009, Krepulec 2008, Sundarram i Murthy 2014).

Amylazy są również wykorzystywane na szeroką skalę do produkcji napojów alkoholowych. Termotabilna  $\alpha$ -amylaza pochodząca z *Bacillus licheniformis* jest wykorzystywana do konwersji skrobi do dekstryn, które w kolejnym etapie są przekształcane przez glucoamylazę do glukozy. Drożdże wytwarzające etanol wykorzystują pozyskaną glukozę do produkcji alkoholu (Kandra 2003, Sivaramakrishnan i in. 2006). Pozyskany alkohol etylowy pochodzący z scukrzania skrobi przy udziale enzymów amylolitycznych jest wykorzystywany jako biopaliwo (Sundarram i Murthy 2014).

### 1.3 Enzymy lipolityczne

Lipazy katalizują hydrolizę triacylogliceroli do wolnych kwasów tłuszczowych oraz glicerolu. Dodatkowo mogą także przeprowadzać syntezę i transestryfikację estrów oraz wykazują właściwości

enantjoselektywne (Treichel i in. 2010). Lipazy są cennymi biokatalizatorami ze względu na to, że wykazują wysoką stabilność w łagodnych warunkach przeprowadzając z wysoką efektywnością regio- i/lub stereoselektywną katalizę. Poza tym umożliwiają łatwiejszy odzysk glicerolu z mieszaniny po reakcyjnej oraz transestryfikacje glicerydów o wysokiej zawartości kwasów tłuszczowych.

Oleje i tłuszcze są niezbędnymi składnikami żywności. Na wartość odżywczą właściwości fizyczne triglicerydów mają przede wszystkim wpływ pozycja kwasu tłuszczowego w szkieletie glicerolowym, długość łańcucha kwasu tłuszczowego oraz stopień jego wysycenia. Lipazy pozwalają na modyfikacje tych właściwości poprzez zmianę położenia kwasu tłuszczowego w szkieletie glicerolowym lub zmianę jednego albo kilku kwasów tłuszczowych na inne. Oleje roślinne mogą być ulepszone do wartości z odżywczego punktu widzenia triacyloglicerydów. Mikrobiologiczne lipazy, które są regio-specyficzne oraz specyficzne substratowo mogą być wykorzystane do produkcji olejów przemysłowych (Anduana i Gessesse 2012).

**Zastosowanie enzymów lipolitycznych**

Enzymy lipolityczne produkowane są przez bakterie *Pseudomonas fluorescens* (Rajmohan i in. 2002), *Pseudomonas cepacia* (Kaieda i in. 2001), *Acinetobacter radiorensistens* (Chen i in. 1998) oraz grzyby *Mucor miehei*, *Rizomucor miehei* (Robles-Medina i in. 2009), *Candida rugosa* (Jaeger i Reetz 1998).

Lipazy znalazły zastosowanie w wielu dziedzinach działalności człowieka: produkcji detergentów i kosmetyków, przemysłu spożywczym, skórzanym, papierniczym, produkcji materiałów biodegradowalnych oraz biopaliw (Anduana i Gessesse 2012).

Enzymy te są także wykorzystywane do syntezy estrów z krótkimi łańcuchowymi kwasami tłuszczowymi oraz alkoholi, aby nadać określony pożądaný zapach produktom spożywczym. Selektowna hydroliza triacylogliceroli umożliwia modyfikację smaku produktów spożywczych codziennego użycia takich jak sery, masło, margaryna, napojów alkoholowych, mleka, czekolady i słodczy. Są również używane w celu usuwania tłuszczu z produktów rybnych lub mięsnych w wyniku czego uzyskuje się chude mięso.

Pod względem komercyjnym najważniejsze zastosowanie lipazy znajdują jako składniki detergentów. Wykorzystane w tym celu enzymy powinny charakteryzować się: niską specyficznością substratów, aby hydrolizować tłuszcze o różnym składzie, zdolnością katalizowania reakcji w specyficznych warunkach występujących podczas prania (pH 10-11, 30-60°C) oraz zdolnością do współdziałania z surfaktantami np. liniowymi alkilobenzenosulfonami i enzymami najczęściej proteazami, które są ważnymi składnikami wielu detergentów. Ponadto utrzymująca się tendencja do prania ubra w niskich temperaturach sprawiła, że usuwanie tłuszczu i smarów z bawełny oraz poliestrów stało się o wiele trudniejsze. Zastosowanie lipazy aktywnej w niskich temperaturach przyczynia się do zminimalizowania strat energii oraz mniejszego zużycia i zniszczenia ubra (Feller i Gerday 2003).

Lipazy znajdują zastosowanie także w przemysle skórzanym. Zanim skóry zostaną poddane procesowi garbowania, muszą być pozbawione całkowicie lub częściowo tłuszczu oraz białek. Za proces usuwania białek odpowiedzialne są proteazy, jednak dzięki zastosowaniu enzymów proteolitycznych i lipolitycznych proces ten jest wydajniejszy. Lipazy specyficznie degradują tłuszcze nie powodując zniszczenia obrabianej skóry (Anduana i Gessesse 2012).

Enzymy lipolityczne znalazły również zastosowanie w produkcji

estrów trimethylopropanu, które stosuje się w rodkach nawilżających skórę (Bailey i Ollis 1976) oraz w wytwarzaniu: mistrynienu i zopropylu, palmitynienu i zoprololu oraz palmitynienu 2-etyloheksylu, wchodzących w skład kosmetyków. Wiele estrów woskowych stosowanych w celu ochrony ciała są produkowane z wykorzystaniem lipazy produkowanej przez *C. cylindracea* (Andualema i Gessesse 2012).

Lipazy znajdują zastosowanie w produkcji biodiesla czyli estrów metylowych trójglicerydów pochodzenia naturalnego. Produkcja tego biopaliwa polega na estryfikacji oleju roślinnego metanolem. W procesie produkcji biodiesla wykorzystuje się lipazę pozyskiwaną z *Candida antarctica*, której immobilizacja w żywicach akrylowych pozwala na wielokrotne wykorzystanie od 5 do 50 cykli (Bajaj i in. 2010).

#### 1.4 Enzymy pektynolityczne

Pektyny to strukturalne wielocukry roślin. Są zbudowane z reszt kwasu pektynowego (kwasu D-galakouronowego) połączonych wiązaniami  $\alpha$ -1,4-glikozydowymi w linowy łańcuch. Grupy karboksylowe w kwasie pektynowym mogą być w różnym stopniu zestryfikowane alkoholem metylowym. Pektyny występują w pierwotnej ścianie komórkowej oraz blaszce rodkowej i często dwie przylegające komórki. Pektyny szczególnie obficie znajdują się w miąższościach owoców (Fronk i Zbek 1995, Mastalerz 2009, Dłuski i Dłuska 2008, Willats i in. 2001). Są rozkładane do cukrów prostych przy udziale enzymów pektynolitycznych. Pektynazy są zaliczane do dwóch głównych grup enzymów hydrolaz (pektynoesterazy oraz poligalaktouronazy) i liaz (pektynolizazy). Pektynoesteraza (pektaza, metyloesteraza pektynowa) odszczepia hydrolitycznie grupę metoksylową ( $-OCH_3$ ) od pektynu w wyniku czego powstają niskometylowane pektyny oraz kwas pektynowy. Poligalaktouronaza (pektynohydrolaza) przeprowadza hydroliz wiązania  $\alpha$ -1,4-glikozydowego w kwasie pektynowym. Pektynolizazy rozrywają wiązanie glikozydowe bez udziału cząsteczki wody w procesie  $\beta$ -eliminacji. (Garg i in. 2016, Dłuski i Dłuska 2008, Willats i in. 2001).

Zastosowanie enzymów pektynolitycznych

Enzymy pektynolityczne produkowane są przez bakterie: *Bacillus pumilus* DT7 (Kashyap i in. 2001), *Bacillus subtilis* (Ahlawat i in. 2009) oraz grzyby *Penicillium chrysogenum* (Banu i in. 2010), *Aspergillus terreus* (Yadav i in. 2009), *Fusarium* sp. (Rajendran i in. 2011).

Podczas wytwarzania soków z owoców i warzyw praktykuje się stosowanie enzymów w celu obniżenia lepkości oraz poprawienia klarowności (Garg i in. 2016). Pektynazy odgrywają kluczową rolę podczas redukcji lepkości, rozkładu miąższu owocowo-warzywnego, co w efekcie prowadzi do wzrostu wydajności i klarowności soku.

Miękkie owoce takie jak papaja czy banan zawierają dużą ilość rozpuszczalnych pektyn, rozcieranie tych owoców powoduje powstawanie cząsteczek z elowanej konsystencji, która jest trudna do wyciśnięcia na dalszych etapach produkcji soku. Dzięki zastosowaniu pektynaz wyciskanie soku jest łatwiejsze oraz bardziej wydajne. Przy wykorzystaniu pektynaz ze 100g banana lub papai otrzymywano od 60 do 96 ml soku, co stanowiło 3 do 4-krotnie więcej soku niż w kontroli. Wykorzystując pektynazy można otrzymać trzykrotnie lub czterokrotnie więcej soku w porównaniu do metody tradycyjnej (Garg i in. 2016, Soares i in. 2001). Wyciskanie soku ze zmielonej marchewki tradycyjnymi metodami daje około 20ml ze 100g surowca. Podczas zastosowania enzymów z szczepów *Bacillus* Ar1.2, Ega16 i Ega22 uzyskano od 40 do 50 ml ze 100g marchewki (Tochi i in. 2009). Wzrost wydajności wynikał przede wszystkim z degradacji ścianek komórkowej przez enzym, co spowodowało

obniżenie lepkości soku w wyniku czego nie doprowadziło to do zapychania się membrany filtrującej (de Carvalho i in. 2008, Chaudhri i Suneetha 2012). Enzymatyczne trawienie skórek owoców może prowadzić do uwalniania składników fenolowych ze skórki (Sharma i in. 2013). Składniki fenolowe odgrywają ważną rolę jako antyoksydanty w utrzymaniu dobrego stanu zdrowia oraz zapobiegają przed chorobami wieńcowymi serca oraz nowotworami (Miller i Rice-Evans 1997). Zawartość związków fenolowych w sokach wyciskanych z użyciem metody enzymatycznej był o 15% wyższy w porównaniu do metody tradycyjnej (Nur'Alia i in. 2010).

Pektynazy są również wykorzystywane przy produkcji wina przede wszystkim na etapie wyciskania owoców, aby zoptymalizować wydajność, ułatwić filtrację oraz poprawić interesownie koloru i smaku. Niektóre prace badawcze wykazują, że użycie pektynaz w procesie produkcyjnym wina prowadzi do wzrostu poziomu metanolu w winie w wyniku aktywności esteraz pektynowych. Metanol ze względu na swoje toksyczne właściwości nie powinien występować w winie, dlatego stosowanie esterazy pektynowej musi polegać na ścisłej kontroli (Servili i in. 1992, Revilla i González-SanJosé 1998).

Pektynazy są wykorzystywane także w biorafineriach podczas hydrolizy pektyn pochodzących z przemysłu rolniczego (Biz i in. 2014). Odpady te są przetwarzane do cukrów prostych, a te z kolei mogą być wykorzystane do produkcji bioetanolu wykorzystywanego powszechnie biopaliwa (Collares i in. 2012, Alshammari i in. 2011). Do wydajnej konwersji polisacharydów ze ścian komórkowej do cukrów prostych stosuje się oprócz pektynaz hemicelulazy i celulazy (Beldman i in. 1984).

Do ekstrakcji olejów roślinnych używa się rozpuszczalników organicznych takich jak heksan, który jest on potencjalnym kancerogenem (Kashyap i in. 2001). Pektynazy degradują ścian komórek niwelując potrzebę użycia organicznych rozpuszczalników na etapie ekstrakcji. Obecnie w użyciu są preparaty posiadające w swoim składzie oprócz pektynaz również celulazy i hemicelulozy, aby zmaksymalizować ekstrakcję olejów. Ekstrakcja olejów z wykorzystaniem enzymów dodatkowo wzbogaca produkty w witaminie E oraz polifenole. (Kashyap i in. 2001, Hoondal i in. 2002, Iconomou i in. 2010).

Pektynazy znalazły zastosowanie podczas przetwarzania tekstyliów oraz oczyszczania włókien bawełny. Tradycyjne sposoby obróbki tekstyliów używane do oczyszczania bawełny wymagały użycia sody kaustycznej, która jest toksyczna. Użycie bezpiecznych i przyjaznych środowisku pektynaz odbyło się bez żadnych negatywnych wpływów na środowisko (Hoondal i in. 2002).

Pektynazy wykorzystuje się także w procesie fermentacji kawy w celu obniżenia ilości pektyn obecnych w ścianie komórkowej liści herbaty oraz do usuwania tłuszczowego płaszcza z ziaren kawy podczas fermentacji (Praveen i Suneetha 2014).

Pektynazy są wykorzystywane w produkcji suplementów dla zwierząt. Pomagają one zredukować lepkość paszy, co ma bezpośredni wpływ na podwyższenie absorpcji składników odżywczych uwalnianych z błonnika na drodze hydrolizy oraz redukuje ilość wydalanego kału (Praveen i Suneetha 2014).

### 1.5 Enzymy celulołityczne

Celuloza jest polimerem o prostym łańcuchu zbudowanym z kilkanaście tysięcy reszt glukozydowych połączonych wiązaniami  $\beta$ -1-4-glikozydowymi. Charakterystycznym elementem budowy celulozy jest to, że kolejne reszty glukozydowe są odwrócone względem siebie o  $180^\circ$  taki układ ułatwia powstanie linowych łańcuchów oraz wiązań wodorowych pomiędzy łańcuchami. Łańcuchy polisacharydowe są ustawione w szeregi tak, że tworzą włókna wykazujące dużą

wytrzymało na rozciąganiu (Hames i Hooper 2012, Mastalerz 2009). Celulazy są grupą enzymów przeprowadzających hydrolizę wiązania  $\beta$ -1-4-glikozydowego w celulozie i innych pochodnych celulozowych w których występuje powyższe wiązanie glikozydowe. Proces hydrolizy celulozy do cukrów prostych wymaga aktywności trzech typów enzymów: endoglukonazy (EC 3.2.1.4), egzoglukonazy (EC 3.2.1.91) i  $\beta$ -glukozydazy (EC 3.2.1.21). Endoglukonazy hydrolizują wewnątrz (amorficzne) cząsteczki celulozy. Egzoglukonazy np. celobiogidrolazy przeprowadzają hydrolizę na końcach cząsteczki celulozy produkując celobiozę.  $\beta$ -glukozydaza rozszczepiają uwolnione cząsteczki celobiozy przez celobiogidrolazy lub inne celodekstryny o niskim stopniu polimeryzacji do dekstryn.

Zastosowanie enzymów celulozolitycznych

Celulazy są produkowane przez bakterie: *Bacillus subtilis* (Heck i in. 2002), *Clostridium acetobutylicum* (López-Contreras i in. 2004), *Rhodothermus marinus* (Hreggvidsson i in. 1996), *Acinetobacter junii* (Lol i in. 2010), *Bacillus licheniformis* (Acharya i Chaudhary 2012), promieniowce: *Cellulomonas fimi* (Langsford i in. 1984), *C. Bioazotea* (Rajoka i Malik 1997) oraz grzyby: *Penicillium brasiliense* (Jørgensen i in. 2003), *Penicillium decumbens* (Moi i in. 2004), *Fusarium solani* (Ortega 1990), *Aspergillus niger* (Bansal i in. 2012), *A. terreus* (Sohail i in. 2016). Grzyby w szczególności przeprowadzają rozkład celulozy, przypuszcza się, że odpowiadają one za około 80% rozkładu celulozy na Ziemi (Sajith i in. 2016).

Celulazy są wykorzystywane przede wszystkim w przemyśle celulozowo-papierniczym. Mechaniczne procesy takie jak rozdrabnianie, rozciąganie oraz mielenie surowca drzewnego prowadzi do powstania masy celulozowej o wysokiej zawartości drobnego sztywnego błonnika, którego usuwanie jest uciążliwe oraz wiąże się z dużymi kosztami energetycznymi. Zastosowanie mechanicznego rozciągania z wykorzystaniem celulaz przyczyniło się do zmniejszenia zużycia energii od 20 do 40% oraz poprawy wytrzymałości papieru.

Recykling papieru polega na odbarwianiu papieru przez usuwanie tuszu. Proces ten może być przeprowadzony metodami klasycznymi z wykorzystaniem flotacji. Rozdrobniiony papier wsypane do zbiornika maszyny flotacyjnej poddaje go jednocześnie areacji. Częstki łatwo zwilżane nasikają wodą, pozostałe są otaczane przez pęcherzyki powietrza i wypływają na powierzchnię, gdzie tworzą pianę. Do poprawy efektywności procesu stosuje się odczynniki flotacyjne: spieniacze, zbieracze oraz modyfikatory (Konopacka 2005, Szyszka 2007, Aleksa i in. 2007). Po oddzieleniu tuszu, który migruje na powierzchnię odbarwiona pulpa kierowana jest do bielienia, które jest wykonywane za pomocą nadtlenku wodoru lub innych wybielaczy. Celulazy są dodawane na etapie odbarwiania, aby zwiększyć efektywność usuwania tuszu z papieru, w wyniku czego nowo wyprodukowane arkusze są jaśniejsze czystsze oraz można zminimalizować ilość dodawanych surfaktantów oraz wybielaczy.

Celulazy wykorzystywane w tym procesie pochodzą głównie z *Humicola* i *Aspergillus*. Ponadto celulazy umożliwiają przyspieszenie odwadniania pulpy, poprzez hydrolizę celulozy w wyniku czego uwolniona zostaje woda, uwięziona w włóknach celulozowych (Morozov i in. 1983, Kuhad i in. 2011, Wesolowska-Trojanowska i in. 2014). Enzymy te znalazły zastosowanie w produkcji łatwo biodegradowalnych kartonów, rękawików papierowych oraz papieru sanitarnego (Kuhad i in. 2011).

Ubrania wykonane z bawełny mają tendencję do mechacenia podczas tkania, szycia oraz dalszej obróbki co obniża wartość produktów oraz nie są preferowane przez konsumentów. Stąd wykorzystywane są

celulazy do usuwania zmechace oraz zapobiegania ich powtórnemu powstawaniu (Wesołowska-Trojanowska i in. 2014). Z uwagi na wi ksz stabilno barwników w kwa nym pH preferowana jest celulaza o optimum działania w kwa nym pH, do których nale y celulaza produkowana przez grzyba z rodzaju *Trichoderma* (Cortez i in. 2002, Ibrahim i in. 2011). Wst pny etap obróbki jeansu ma na celu sprawienie, aby ubrania były delikatniejsze i gotowe do założenia zaraz po zakupie. Tradycyjne metody obróbki polegały na praniu ubra z jeansu w raz z kamieniem pumeksowym. Celulazy wprowadziły zmiany tak e w tym procesie. Obecnie do zmie kczania tkanin u ywa si celulaz, gdy oprócz umo liwienia produkcji ubra o po danej delikatności s ta sze, powoduj mniejsze uszkodzenia włókien, s przyjazne dla rodowiska (Heikinheimo i in. 2000, Karmakar i Ray 2011).

Celulazy tak e znalazły zastosowanie w produkcji pasz dla zwierzt. Pasy dla zwierzt mog zawiera substancje takie jak: dekstryny, inuliny, ligniny, woski, chityn, pektyny,  $\beta$ -glukany, które nie s trawione i rozkładane w przewodzie pokarmowym zwierzt w wyniku czego efektywno karmienia zwierzt tak pasz jest niska, ponadto substancje te mog by czynnikami antyod ywczymi.  $\beta$ -gukany zwi kszaj lepko masy pokarmowej w wyniku czego nast puje zwi kszone wchłanianie wody, za wchłanianie w głowodorów i witamin jest zmniejszone. Ponadto wzrost lepkości paszy mo e powodowa czasow dysfunkcje przewodu pokarmowego (Wesołowska-Trojanowska i in. 2014).

Celulazy mog równie znale zastosowanie w produkcji biopaliw. Z biopaliw drugiej generacji najbardziej obiecuj cym paliwem wydaje si bioetanol produkowany z biomasy ligninocelulozowej. Głównym problemem stoj cym na przeszkodzie, aby proces ten był ekonomicznie opłacalny to konwersja celulozy do glukozy. Hydroliza celulozy jest problematyczna z uwagi na trudny dost p enzymu do celulozy, która jest uwię ziona w cianach komórkowych roślin oraz jej nierozpuszczalno w wodzie (Wang i in. 2012). Do zoptymalizowania tego procesu stosuje si obróbk wst pn, która ma na celu zniszczenie struktury włókien w rezultacie czego celulazy maja lepszy kontakt z substratami. Wst pne przygotowanie substratu przeprowadza si w temperaturze 180-250°C, w obecności 0,5-2-procentowego kwasu siarkowego przez kilka sekund do kilku minut, w rezultacie czego otrzymuje si roztwór o konsystencji klej cej zawiesiny, w którym st enie celulozy to 35-55%. W kolejnym etapie dodaje si celulazy najcz ciejsze pochodzące od *Trichoderma reesei*, w nast pstwie czego otrzymuje si glukoz, która jest wykorzystywana do produkcji bioetanolu (Gupta i in. 2011, Kuhad i in. 2010).

#### 1.6 Enzymy proteolityczne

W powszechnym u yciu funkcjonuj nazwy: proteazy, peptydazy, proteinazy. Jest to du a grupa enzymów przeprowadzaj ca katalityczn hydroliz białek do peptydów i aminokwasów. Proteazy mo na podzieli na endopeptydazy (EC 3.4.21-99) oraz egzopeptydazy (EC 3.4.11-19). Jest to podział ze wzgl du na miejsce wi zania i ci cie białka. Egzopeptydazy mog przeprowadza reakcje tylko od jednego z ko ców białka N-ko ca lub C-ko ca na tej podstawie dzieli si je na aminopeptydazy (EC 3.4.14) i karboksypeptydazy. Endopeptydazy mo na podzieli na 4 grupy ze wzgl du na mechanizm katalizy: proteazy serynowe (EC 2.4.21), proteazy cysteinowe (EC 2.4.22), proteazy aspartylowe (EC 2.4.23) oraz metaloproteazy (EC 2.4.24) Podział ten oparty jest na zawarto ci reszt aminokwasowych w centrum aktywnym enzymu (Rao i in. 1998). Peptydazy mo emy podzieli tak e ze wzgl du na pH w jakim przejawiaj najwy sz aktywno : kwa ne pH 2,0 do 6,0 oboj tne pH 6,0 - 8,0 i zasadowe

pH 8,0 - 13,0 (Gupta i in. 2002, Rao i in. 1998, Saboti i Kos 2012).

#### 1.6.1 Produkcji enzymów proteolitycznych

Mikroorganizmy wytwarzające enzymy hydrolityczne na przestrzeni miliardów lat przystosowały się do życia w różnych warunkach środowiska. Czynniki ograniczające ich rozwój są: wysoka i niska temperatura, alkaliczne i kwaśne pH, promieniowanie jonizujące, promieniowanie UV, wysokie ciśnienie oraz zbyt niska wilgotność powietrza. W przemyśle wykorzystuje się mikroorganizmy pochodzące z różnych środowisk naturalnych np. gleby czy wody. Jednak duże znaczenie technologiczne mogą mieć mikroorganizmy wyizolowane ze środowisk ekstremalnych np: pustynie, lodowce na Antarktyce, gorące źródła oraz głębiny oceaniczne. Drobnoustroje zamieszkujące środowiska ekstremalne są ogólnie nazywane ekstremofilami. Specyficzne właściwości ekstremofilii sprawiają, że są cennym zasobem o ogromnym potencjale do zastosowania w nowoczesnych technologiach produkcji: farmaceutyków, kosmetyków, odżywek dla sportowców, biologi molekularnej, enzymów przemysłowych oraz różnego rodzaju związków chemicznych. Produkowane enzymy (w tym proteolityczne) przez ekstremofile pozwoliły na usprawnienie i unowocześnienie wielu gałęzi produkcji. Dzięki czemu znacząco udało się zmniejszyć ilość wyprodukowanych odpadów, zużycie energii oraz surowców naturalnych, w wyniku czego ograniczono eksploatację nieodnawialnych zasobów środowiska naturalnego (Hendry 2006, van den Burg 2003, Pikuta i in. 2007).

#### Proteolityczne bakterie

Współczesny przemysł biotechnologiczny wykorzystuje bakterie z rodzaju *Bacillus* do produkcji enzymów na skalę przemysłową. Dużą zaletą w wykorzystaniu bakterii z rodzaju *Bacillus* jest ich zdolność do zewnątrzkomórkowego wydzielania enzymów (Olępska-Beer i in. 2006). Bakterie stosowane do produkcji preparatów enzymatycznych dzielą się na trzy grupy: A, B i C. Do grup A i B zakwalifikowano 22 gatunki bakterii, niepatogenne, dobrze scharakteryzowane i akceptowane przez przemysł biotechnologiczny. Należą do nich m.in. *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*. Natomiast 26 gatunków bakterii z rodzaju *Bacillus* umieszczono w grupie C. Bakterie te wytwarzają enzymy i stosowane w produkcji żywności wymagają specjalistycznych testów, ponieważ mogą być patogenne (Libudzisz i in. 2008). *Bacillus subtilis* jest dobrze poznanym szczepem wytwarzającym proteazę, powszechnie występuje w glebie, w niekorzystnych warunkach życia wytwarza przetrwalniki (Hong i in. 2009, Perez i in. 2000). Jedynym z najlepiej poznanych szczepów tego gatunku jest dziki typ 168, którego genom zsekwencjonowano w ubiegłym wieku. Od niego wywodzi się wiele szczepów wykorzystywanych w przetwórstwie żywności. Szczep ten nie wytwarza toksyn, za bezpieczeństwo jego stosowania zostało potwierdzone przez GRAS (Olępska-Beer i in. 2006). *Bacillus subtilis* 168 produkuje wysoko aktywne proteazy na podłożu z maltosą, ekstraktem drożdżowym, w temperaturze 35°C w pH 13. Stwierdzono, że otręby pszenne znacznie zwiększają produkcję proteazy. Proteazy produkowane przez *Bacillus subtilis* RM 615, *Bacillus* sp. Y, *Bacillus* sp. KSM-K16 są stabilne w obecności detergentów. Na uwagę zasługuje M-proteaza produkowana przez *Bacillus* sp. KSM-K16, która wykazuje 70% aktywność po 3 tygodniowej inkubacji z mocnymi detergentami w temperaturze 40°C i pH 9,6 (Vanitha i in. 2014). Znaczenie technologiczne ma również szczep *Bacillus licheniformis* MIR 29, który produkuje termostabilną alkaliczną proteazę na podłożu z kazeiną oraz azotanami. Proteaza tego szczepu wykazywała



maksymalną aktywność w pH od 11 do 13 w temperaturze 37°C z maksimum w 60°C (Ferrero i in. 1996). *Bacillus cereus* (Aronson i in. 1971), *Bacillus thuringiensis* (Hotha i Banik 1997, Brar i in. 2007), pomimo zdolności do produkcji proteaz z patogenami człowieka, dlatego przy ich wykorzystaniu konieczne jest przeprowadzenie odpowiednich testów.

Enzymy proteolityczne mogą być również produkowane przez bakterie z rodzaju *Pseudomonas*. Jako przykład można podać *Pseudomonas fluorescens* zasiedlający wiele różnych środowisk, często jest izolowany z gleby, ryzosfery oraz roślin. Bakterie te produkują alkaliczne proteazy na podłożu zawierającym otręby pszenne, maltozę oraz pepton (Kalaiarasi i Sunitha 2009).

Promieniowce z rodzaju *Streptomyces* znane są z wytwarzania licznych metabolitów o znaczeniu technologicznym m.in. antybiotyków czy enzymów hydrolitycznych. Przykładem szczepu promieniowców wytwarzających enzymy proteolityczne jest *Streptomyces olivochromogenes*. Szczep ten produkuje alkaliczną metaloproteazę, wysoce stabilną w obecności utleniaczy, detergentów oraz rozpuszczalników organicznych, wykazując aktywność w pH od 7,5-10 oraz w temperaturze 50°C (Simkhada i in. 2010). *Streptomyces* sp. 594 produkuje termostabilną proteazę aktywną w 90°C (De Azeredo i in. 2006). Z kolei *Streptomyces clavuligerus* jest szczepem halotolerancyjnym wyizolowanym z zasolonej gleby u wybrzeża Indii, produkując wysokoaktywne proteazy na podłożu zasadowym zawierającym sacharozę, elatyn, pepton oraz 5% NaCl (Thumar i Singh 2007).

Proteolityczne grzyby pleśniowe

Królestwo grzybów jest zróżnicowane, do którego zaliczane są gatunki zdolne do wzrostu w różnych warunkach środowiska.

Większość grzybów jest jednak neutrofilami, rosnącymi optymalnie w warunkach temperaturowych: 25–30°C, pH 5–7. Cześć gatunków przystosowała się do przetrwania w ekstremalnych warunkach, gdzie abiotyczne czynniki są niesprzyjające. Jednym z takich czynników jest wysoka alkaliczność. Alkaliczne grzyby mogą rosnąć w pH powyżej 9 (Horikoshi 1999). Naturalnymi środowiskami życia dla tych mikroorganizmów są gleby i jeziora sodowe. Grzyby również występują w środowiskach antropogenicznych. Na przykład fabryki cementu oraz papieru, są zasiedlane przez alkalifilne i alkalotolerancyjne grzyby (Mueller i in. 2011). Już w 1923 Johnson (1923) wykazał zdolność do wzrostu w silnie wysokim pH 11 *Fusarium oxysporum*, *F. bullatum* i *Penicillium*. Okada i in. (1993) wyizolowali i opisywali mitosporyczny grzyb *Acremonium alcalophilum*, dla którego optymalne pH to 9. W kolejnych badaniach wyizolowano alkalotolerancyjne grzyby należące do rodzajów *Bionectriaceae*, *Trichocomaceae*, *Sporormiaceae*, *Ceratostomataceae* oraz *Sordariaceae* (Grum-Grzhimaylo i in. 2013).

Producentami enzymów są liczne gatunki grzybów strzępkowych z rodzaju *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Trichoderma*. W przemyśle mleczarskim wykorzystywane są kwaśne proteazy produkowane przez pleśń z rodzaju *Mucor*. Natomiast preparaty proteolityczne pochodzące z pleśni z rodzaju *Aspergillus* czy *Rhizopus* wykorzystywane są do modyfikacji funkcjonalnych właściwości białek (Libudziński i in. 2008). Dużego znaczenia technologicznego w produkcji enzymów mają pleśnie z rodzaju *Aspergillus*. Na przykład *Aspergillus niger* jest zdolny do produkcji alkalicznej proteazy aktywnej w pH 10 oraz w temperaturze 50°C. Proteazy wytwarzane przez te pleśnie nie tracą swojej aktywności w obecności detergentów, jednak są hamowane przez jony metali:  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  a także przez EDTA oraz azydek sodowy. (Devi i in. 2008). Z kolei *Aspergillus clavatus* ES1

wyizolowany ze cięków jest zdolny do produkcji alkalicznej proteazy. Pozyskany enzym wykazywał optimum temperaturowe w 50°C w pH od 8,0-9,5. Dodatkowo wykazano, że proteaza jest aktywna w obecności rodków powierzchniowo czynnych oraz wybielających, dzięki czemu możliwe jest jej zastosowanie jako składnik detergentów (Hajji i in. 2007).

Enzymy proteolityczne są również produkowane przez *Botrytis cinerea*. Jest to fitopatogen i powoduje gnicie owoców, warzyw i kwiatów. Pleśnie te produkują alkaliczną proteazę Prot-2 aktywną w szerokim zakresie pH 4,0 - 11, chociaż optimum aktywności przypada na pH 8,0 w 50°C. Proteaza Prot-2 jest oporna na działanie rodków utleniających, powierzchniowo czynnych oraz wybielających. Do katalizowania reakcji nie jest wymagana obecność jonów (Abidi i in. 2011).

Z kolei *Engyodontium album* należy do rodziny Cordycipitaceae. Szczep *E. album* BTMFS10 wyizolowany z morskich osadów morza Chińskiego w okolicach południowej części Wietnamu jest zdolny do produkcji alkalicznej proteazy. Badania wykazały, że pleśnie te produkowały wysokoaktywne proteazy przez 120 h na podłożu zawierającym otręby paszowe o pH 5 i 10 w temperaturze 25°C, (Chellappan i in. 2006).

Zanphorlin i in. (2010) odkryli nowy termofilny szczep *Myceliophthora* sp. który jest także zdolny do produkcji alkalicznej proteazy. Autorzy zoptymalizowali warunki hodowli do produkcji proteazy. Według nich synteza proteazy przebiegała 4,5 razy wydajniej w hodowli stałej niż w hodowli płynnej. Najwyższą aktywność proteolityczną obserwowali po 3 w temperaturze 50°C w mieszaninie otrębów zbożowych i kazeiny o pH 9.

#### 1.6.2 Metody pozyskiwania enzymów proteolitycznych

Na etapie badań mikroorganizmów oraz ich przemysłowego wykorzystania stosuje się trzy główne metody pozyskiwania enzymów proteolitycznych: powierzchniowa LFS (ang. Liquid Surface Fermentation), wgłębna SmF (ang. Submerged fermentation) oraz na pożywkach stałych SSF (ang. Solid State Fermentation). Do lat 50 XX w. przeważała głównie metoda powierzchniowa LFS wykorzystująca jako substrat melasę. Obecnie dominuje metoda SmF z uwagi na wyższą wydajność. Metodę SSF opracowano w Japonii w latach 70 XX w. W odróżnieniu od SmF nie wymaga budowy specjalistycznej aparatury oraz umożliwia zagospodarowanie odpadów surowców rolinnych. *Aspergillus niger* hodowany metodą SSF toleruje duże stężenie jonów metali w odróżnieniu od hodowli metodą LFS (Libudziński i in. 2008). Do zalet SSF zaliczyć można możliwość wykorzystania odpadów z przemysłu rolnego, szybsze i tańsze oczyszczanie produktów. W metodzie SSF hodowla przebiega bez udziału wolnej wody, w wyniku czego trzeba zapewnić i utrzymać na stałym poziomie odpowiednią wilgotność powietrza co jest problematyczne. Podwyższona aktywność metaboliczna pewnych regionów hodowli prowadzi do silniejszego ich nagrzewania, za brak wolnej wody uniemożliwia utrzymanie stałej temperatury w hodowli. Zalety produkcji wgłębnej wynikają z łatwiejszej kontroli produkcji i odzysku enzymów zewnątrzkomórkowych, mycelii czy sporów. Jednak te produkty są rozpuszczane w podłożu hodowlanym, co powoduje, że preparaty enzymatyczne mogą być mniej stabilne. (Germano i in. 2003, Ryoo i in. 1991, Lonsane i in. 1985).

Jest wiele czynników, które podczas hodowli grzybów mogą wpłynąć korzystnie bądź też mogą zahamować produkcję i wydzielanie enzymów. Obecnie substratów w postaci białek i złożonych w glównodanów np. skrobi, przy jednoczesnym braku łatwo dostępnych aminokwasów i ródeł w glównie przyczynia się do zwiększenia produkcji i wydzielania enzymów. Nie jest to jednak regułą, gdyż u

pewnych gatunków zachodzi konstytutywna produkcja i wydzielanie enzymu. Przez ostatnie lata podejmowano próby zoptymalizowania substratu do produkcji enzymów proteolitycznych. Badano wiele różnych substratów do produkcji enzymów proteolitycznych, z reguły otręby pszenne (Souza i in. 2015, Sandhya i in. 2005, Sun i Xu 2009).

### 1.6.3 Zastosowanie enzymów proteolitycznych

Mikrobiologiczne proteazy odgrywają dominującą rolę na światowym rynku enzymów, a ich udział jest znaczący i wynosi około 60% całkowitej sprzedaży enzymów na świecie (Savitha i in. 2011). Całkowita wartość sprzedaży enzymów została oszacowana na 3,3 biliona dolarów amerykańskich w 2010. Znajdują one zastosowanie w przemyśle tekstylnym, skórzanym, mleczarskim, farmaceutycznym oraz jako detergenty (Zambare i in. 2011). Alkaliczne proteazy dominują wśród wszystkich syntetyzowanych proteaz. Proteazy pochodzenia grzybowego są niezwykle cenne ze względu na niskie koszty substratów oraz dużą ilość związków wydzielanych do podłoża hodowlanego (Anitha i Palanivelu 2013).

#### Detergenty

Alkaliczne proteazy przyczyniają się do ulepszania domowych i przemysłowych detergentów. Umożliwiają hydrolizę i usuwanie trudnych plam z: krwi, jaj, sosów, mleka itp. Cały czas trwają badania w poszukiwaniu idealnej proteazy, która byłaby aktywna w szerokim zakresie temperatur, pH oraz była efektywna przy stosowaniu jej w małych stężeniach (0.4–0.8%). Jednym z najtrudniejszych wyzwań jest przystosowanie proteazy do działania z innymi składnikami detergentów takimi jak: rodki powierzchniowo czynne, aktywne wypełniacze, rodki wybielające, zmieszacze tkanin oraz inne składniki wspomagające. W 2002 roku większość dostępnych proteaz stosowanych w detergentach nie spełniała tych restrykcyjnych wymogów. Obecnie panuje trend nad opracowaniem detergentów, które zachowają wysoką aktywność w niskich temperaturach. Japońska firma Novo Nordisk Bioindustry opracowała detergent zawierający proteazy nazwany „Kannase”, który utrzymuje wysoką efektywność w niskich temperaturach od 10 do 20°C (Gupta i in. 2002). Z hodowli *Aspergillus flavus* oraz *Aspergillus niger* wyizolowano alkaliczną proteazę, która jest stabilna razem z komercyjnie stosowanymi detergentami (Yadav i in. 2011, Devi i in. 2008). Alkaliczne proteazy produkowane przez *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus* strain CBS, *Streptomyces* sp. strain AB1, *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Bacillus brevis*, *Bacillus subtilis* AG-1 wykazują bardzo dobrą kompatybilność z powszechnie stosowanymi detergentami oraz stabilizatorami takimi jak CaCl<sub>2</sub> oraz glicyna (Singhal i in. 2012).

#### Żywność i przemysł spożywczy

Alkaliczna proteaza jest stosowana na szeroką skalę w produkcji białkowych hydrolizatów posiadających dużą wartość odżywczą od ponad 40 lat. Są one dodawane do żywności w celu poprawy jakości. Białkowe hydrolizaty są używane jako pokarm dla niemowląt, terapeutyczne produkty dietetyczne dla ludzi z chorobami niestrawnościowymi lub uczuleniami na jakiś alergen zawarty w żywności (Neklyudov i in. 2000). Firma SEB Tender 70 skomercjalizowała alkaliczną proteazę, która jest używana na szeroką skalę przy tenderyzacji mięsa, usuwa kolagen z mięsa co czyni je bardziej przystępnym dla konsumentów. Białkowe hydrolizaty mogą być uzyskane w różnego rodzaju substratów: serwatki, soi, mięsa, kazeiny (Singhal i in. 2012).

Alkaliczne proteiny znalazły także zastosowanie w produkcji paszy dla zwierząt z odpadów zawierających kreatyniny oraz pierza.

Po strawieniu odpadów przez proteiny powstaje koncentrat białkowy wykorzystany w paszy dla zwierząt (Dalev 1994). Do produkcji alkalicznej proteazy używanej w przemyśle żywnościowym wykorzystywany jest szczep *Aspergillus oryzae* U1521, którego modyfikacje genetyczne spowodowały pięciokrotne podwyższenie produkcji alkalicznej proteazy (Singhal i in. 2012, Samarantani i in. 1999). Podczas pieczenia alkaliczna proteaza jest używana do hydrolizy glutenu w mące dzięki czemu pieczenie zajmuje mniej czasu. W procesie pieczenia niezwykle cenne są grzybowe alkaliczne proteazy ze względu na termostabilność. Mogłyby także być wykorzystane w produkcji serów. Dodawane do mleka zwiększają koagulację mleka przyspieszając proces produkcji serów. (Furhan i Sharama 2014).

W produkcji żywności wykorzystuje się *Bacillus licheniformis* (Matsui i in. 1993), *Bacillus subtilis* (Gonzalez-Tello i in. 1994) czy *Streptomyces fradiae* (Parrado i in. 1991).

#### Synteza peptydów

Użycie alkalicznej proteiny do syntezy peptydów ma kilka zalet: reakcja może być przeprowadzona stereospecyficznie, nie ma konieczności zabezpieczania łańcucha bocznego. Potrzeba mniej drogich protektorów-grup lub groźnych odczynników w porównaniu do tradycyjnych metod chemicznych. Do syntezy aminokwasów jest wykorzystywana alkaliczna proteaza pochodząca z *Aspergillus flavus* (Singhal i in. 2012, Yadav i in. 2011). Alkaliczna proteaza stosuje się także do syntezy dipeptydów oraz tripeptydów. Pochodząca z grzyba *Conidiobolus coronatus* jest wykorzystywana do rozdzielania mieszaniny di-fenylalaniny i di-fenylglicyny (Isono i Nakajima 2000, So i in. 2000, Sutar i in. 1992).

#### Przemysł skórny

W konwencjonalnych metodach wykorzystywanych w przemyśle skórzanym wykorzystuje się siarkowodór oraz inne chemikalia powodujące zatrucie środowiska naturalnego. Zastosowanie enzymów ma kilka zalet: łatwiejsza kontrola, zwiększenie szybkości, zmniejszenie produkcji odpadów. Proteazy stosuje się na etapach: namaczania, usuwania włosów oraz garbienia. Enzymatyczna aktywność usuwa niepożądane pigmenty oraz zwiększa powierzchnię nadając się do dalszej obróbki. Alkaliczne warunki umożliwiają obróbkę korzeni włosów w wyniku czego alkaliczna proteaza może swobodnie działać. Proteazy usuwają elastyn, kreatyn oraz kolagen dzięki czemu można wyprodukować lekkie i wygodne ubrania (Dettmer i in. 2011, Kumar i in. 1999). Z *Aspergillus flavus* możliwe jest pozyskiwanie proteazy, która prawdopodobnie znajdzie zastosowanie przemysłowe w obróbce skór (Chellapandi 2010, Malathi i in. 1991). Wykazano potencjalnie możliwe zastąpienie siarczku sodu przez alkaliczną proteazę z *B. subtilis* podczas procesu usuwania włosów ze skóry (Arunachalam i Saritha 2009).

#### Odzyskiwanie srebra

Alkaliczne proteazy znalazły zastosowanie w odzyskiwaniu srebra używanego w zdjęciach rentgenowskich. W zużytych kliszach rentgenowskich od 1,5 do 2% masy stanowi srebro zawarte w warstwach elatynowych. Konwencjonalne metody odzysku srebra polegają na wypalaniu klisz, powoduje to jednak ogromne zanieczyszczenia środowiskowe. Dzięki enzymatycznej hydrolizie elatynowych warstw zdjęć rentgenowskich nie tylko srebro, ale także poliester może zostać odzyskany. Z powodzeniem przeprowadzono odzyskanie srebra z użyciem alkalicznych proteaz pochodzących od *Bacillus subtilis*, *Conidiobolus coronatus*, *Streptomyces avermectinus* (Nakiboglu i in. 2001, Shankar i in. 2010, Ahmed i in. 2008). W powyższych procesach wykorzystuje się grzybowe alkaliczne proteazy pozyskane ze szczepu *Engyodontium*

album BTMFS10 (Singhal i in. 2012).

Zastosowanie w medycynie

Immobilizowane alkaliczne proteazy izolowane z *Bacillus subtilis* mają potencjalnie szanse na zastosowanie w medycynie w celu zapobiegania składowemu mikrobiologicznemu preparatów medycznych (Davidenko 1999, Singhal i in. 2012). Doustne podanie proteazy z *Aspergillus oryzae* zostało wykorzystane w celu skorygowania niedoboru proteolitycznych enzymów trawiennych (Rao i in. 1998). Przeprowadzone badania wskazują na możliwe zastosowanie alkalicznej proteazy ze szczepu *Aspergillus nidulans* HA710 w farmacji, ale oprócz tego w przemysłowym i skórzanym (Singhal i in. 2012, Charles i in. 2008). W przemysłowym farmaceutycznym i kosmetycznym proteazy mogą być wykorzystane do eliminacji kreatyny w trzdziku lub łuszczycy, eliminacji rogowizn, depilacji (Souza i in. 2015).

II. Cel pracy

Celem pracy było pozyskiwanie ze gleby w otoczeniu składowiska odpadów posodowych grzybów pleśniowych zdolnych do rozkładu białka oraz optymalizacja procesu produkcji enzymów proteolitycznych

III. Metodyka

2.1 Obszar badań

Materiał do badań pobierano na terenie składowiska w Janikowie. Zakłady Sódowe Janikosoda w Janikowie powstały w 1957 r. jako trzecia i równocześnie największa fabryka sody kalcyonowanej w Polsce. Podczas procesów technologicznych wytwarzania sody produktem ubocznym jest wapno posodowe. Jest to alkaliczny i zasolony odpad, szlam poprodukcyjny, składowany hydraulicznie na przyległych do zakładów terenach w stawach osadowych o powierzchni około 200 ha pomiędzy linią technologiczną „Janikosody” a Kanałem Noteckim. Wapno posodowe jest silnie alkaliczne o pH od 8 do 10,5, bogato wysyczone rozpuszczalnymi solami (do 9% s.m.), głównie chlorkowymi.

2.2 Pobór próbek i izolacja grzybów pleśniowych

Za pomocą próbniaka glebowego (Geomor Technik, Zabrze) pobierano powierzchniowy, zasolony (6-9% Cl<sup>-</sup>) warstw gleby w otoczeniu składowiska i umieszczono w sterylnych, szklanych słoikach o objętości 0,5l. Materiał przetransponowano do laboratorium w podrzędnej lodówce laboratoryjnej, w której temperatura nie przekraczała 4°C. W celu izolacji grzybów pleśniowych wykonano 1000-krotne rozcieńczenie gleby sterylnym roztworem soli fizjologicznej (0.85%). Następnie wykonano wysiew powierzchniowy na podłoże o składzie (g/l): PDA – 39, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – 3, MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O – 0,02, NaCl – 30. Odczyn podłoża doprowadzono do pH=8, a następnie sterylizowano w temperaturze 121°C przez 20 min. Inkubację prowadzono w temperaturze 26°C przez 14 dni.

Po inkubacji wyizolowano 50 kultur zwracając uwagę na wielkość kolonii, kształt czy barwę. Kolejnym etapem było wytypowanie kultur grzybów zdolnych do rozkładu białka. W tym celu przygotowano podłoże stałe o składzie (g/l): PDA – 39, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – 3, MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O – 0,02, NaCl – 30, kazeinian sodu 10, pH=8, a następnie punktowo posiewano wcześniej wyizolowane pleśnie. Inkubację prowadzono w temperaturze 26°C przez 7 dni. Jako wynik dodatni uznawano obecność strefy przejaśnienia wokół kolonii. Do dalszych badań wybrano pleśnie z największych stref przejaśnienia.

2.3 Identyfikacja wytypowanych grzybów pleśniowych

Do izolacji DNA pobrano materiał z 7 dniowej hodowli pleśni prowadzonych na zmodyfikowanym podłożu PDA o składzie (g/l): PDA – 39, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – 3, MgSO<sub>4</sub> – 0,02, NaCl – 30. Do izolacji DNA użyto zestawu Gene MATRIX Bacterial & Yeast Genomic DNA Purification Kit (EURx, Gdańsk) według zaleceń producenta. Do powyższej metody wprowadzono

następujące zmiany: użycie buforu lizującego (400mM Tris-HCl, pH=8,0, 60mM EDTA, pH=8,0, 150mM NaCl, 1% SDS), liz przeprowadzono w temperaturze 70°C przez 10 minut oraz zastosowano 75% 5 M octanu potasu o pH 4,8. Stężenie wyizolowanego DNA zmierzono za pomocą spektrofotometru Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Inc., USA). DNA przechowywano w lodówce w temperaturze 4°C.

Przeprowadzono reakcje PCR w celu amplifikacji ITS (Internal Transcribed Spacer) badanych izolatów grzybowych. Mieszanka reakcyjna zawierała 1 µl genomowego DNA, bufor 10 x Pol Buffer B (EURx, Gdańsk) zawierający 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, 0,25mM starterów ITS1 forward (5'-CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA-3'), ITS3 forward (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') oraz ITS4 reverse (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Bellemain i in. 2010) oraz 1 U polimerazy Taq (EURx, Polska). Dla izolatów G2L, 4 i 5 zastosowano ITS3 i ITS4. Dla izolatów 3, 17 oraz 33 zastosowano ITS1 i ITS4.

Reakcję PCR przeprowadzono w termocyklerze gradientowym Professional Basic Gradient (Biometra GmbH, Niemcy). Program temperaturowy obejmował denaturację początkową w temperaturze 95°C przez 4 min., denaturację właściwą w temperaturze 95°C przez 30 s, anealing w temperaturze 55°C przez 30 s, elongację w temperaturze 72°C przez 30s. oraz końcową elongację w 72°C przez 5 min i chłodzenie w temperaturze 4°C. Denaturacja, anealing i elongacja przebiegały w 30 cyklach.

W celu sprawdzenia obecności oraz jakości produktów reakcji PCR, wykonano ich rozdzielanie elektroforetyczne w 1% żelu agarozowym (GenoPlast Biochemicals, Polska) wybarwionym roztworem Midori Green (Nippon Genetics Europe GmbH, Niemcy) w buforze TAE w aparacie do elektroforezy (Biometra GmbH, Niemcy) (120V, 20 min). Do studzienek w żelu zaaplikowano 4 µl produktu PCR oraz obciążnik Loading Dye (Fermentas, Litwa). Analizę produktów PCR przeprowadzono w odniesieniu do markera molekularnego Quick-Load Purple 2-Log DNA Ladder (0,1-10,0 kb, New England, BioLabs Inc.). Produkty reakcji PCR dające prążki o długości 385 pz (dla prób w przypadku których stosowano primery ITS1-ITS4) oraz 686 pz (dla prób, w których wykorzystano ITS3-ITS4) wytrcono przy wykorzystaniu alkoholu absolutnego (99,8%) (EURx, Polska). W tym celu do zamplifikowanych prób dodano alkohol absolutny w stosunku 1:2,5 (v/v), następnie całość intensywnie worteksowano i pozostawiono na około 12 godzin w temperaturze 4°C. Następnie roztwór wirowano w 4°C przez 30 min (14 tys. obr./min). Po wirowaniu otrzymano osad DNA oraz supernatant, który odrzucono. Supernatant zawieszono w 12 µl sterylnej czystej wody wolnej od RNaz (EURx, Polska). Stężenie otrzymanego DNA zmierzono za pomocą spektrofotometru (Nanodrop Technologies, Inc., USA).

W kolejnym etapie dokonano sekwencjonowania produktów PCR metodą Sanger'a za pomocą zestawu Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, USA) według zaleceń producenta. Po sekwencjonowaniu produkty wtrcono używając alkoholu absolutnego (99,8%) (EURx, Polska).

Elektroforez kapilarną otrzymanych produktów sekwencjonowania wykonała Pracownia Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów (IBB PAS, Warszawa). Otrzymane chromatogramy poddano obróbce komputerowej wykorzystując program FinchTV (v.1.4.0). Następnie dokonano określenia przynależności taksonomicznej analizowanych gatunków grzybów za pomocą dedykowanej bioinformatycznej bazy danych UNITE (Abarenkov i in. 2010).

#### IV. Dyskusja

W celu obniżenia kosztów produkcji enzymów proteolitycznych cały

czas trwaj poszukiwani a mikroorganizmów produkcyjnych proteazy wydajniej przy zastosowaniu ta szych substratów. Alkaliczne proteazy stanowi około 25% wiatowej konsumpcji enzymów, dlatego optymalizacja produkcji proteaz przez alkalofile cieszy si szczególnie du ym zainteresowaniem. Wzrost mikroorganizmów oraz produkowane przez nie enzymy zale y głównie od składników podł o a: obecnie ci cukrów, ródł a białka, zasolenia oraz czasu prowadzonej hodowli, temperatury czy wytrzsania. Optymalizacja wzrostu mikroorganizmów cz sto nie jest skorelowana z produkowaniem przez nie enzymów. St d optymalizacja produkcji enzymów mikrobiologicznych jest podstawowym działaniem w przemy le (Vani tha i in. 2014).

Aby zapewni maksymalne wykorzystywanie substratów do produkcji enzymów proteolitycznych wa ne jest mieszanie. Z moich bada wynika, e *Penicillium flavigenum* du e wy sze warto ci aktywno ci proteazy osi gał w hodowli wytrzsanej (150 rpm) ni niewytrzsanej. Podobne wyniki uzyskali Kamath i in. (2010). Wedł ug autorów wytrzsanie hodowli *Aspergillus niger*, wpł ywał o korzystnie na wydajno produkcji proteazy. Najlepsze wyniki uzyskano w hodowli wytrzsanej przy 150 rpm po 5 dniach inkubacji. Z kolei Abidi i in. (2008) badali wpł yw wytrzsania hodowli *Botrytis cinerea* w zakresie od 110 do 220 rpm. Proteaz o najwy szej aktywno ci proteolitycznej uzyskano podczas wytrzsania hodowli przy 150 rpm. Wpł yw pr dko ci wytrzsania hodowli na produkcj proteazy jest cech indywi dualn . Conidiobolus coronatus, *Aspergillus oryzae* i *Aureobasidium pullulans* syntetyzował y wysokoaktywne proteazy na wytrzsarkach przy pr dko ciach odpowiednio: 200 rpm (Sutar i in. 1992), 350 rpm (Wang i in. 2005) oraz 150 rpm (Chi i in. 2007). Intensywno wytrzsania hodowli po rednio wpł ywa na natlenienie po ywki oraz wyrównanie st enia tlenu w całej obj to ci podł o a. Ponadto wytrzsanie hodowli powoduje równomierne rozmieszczenie substancji od ywczych w całej obj to ci podł o a, oraz wi ksz ich dost pno dla grzybów. Obecno tlenu i dost pno substratów ma istotne znaczenie na efektywno produkcji proteaz (Kumar i Takagi 1999). Ponadto wytrzsanie hodowli zmienia morfologi grzybów ple niowych. W hodowli stacjonarnej grzybni a porasta tylko powierzchni podł o a, dost p do substratów jest mniejszy i synteza enzymów jest ograniczona. Natomiast w hodowli prowadzonej na wytrzsarkach, grzybni a zajmuje cał obj to podł o a i lepiej wykorzystuje składniki po ywki.

Głównym czynnikiem wpł ywaj cym na syntez proteaz jest obecnie białka. Z moich bada wynika, e *Penicillium flavigenum* najlepiej syntetyzował proteazy w obecno ci peptonu bakteriologicznego lub wołowego jako ródł a azotu. Podobne wyniki uzyskał Chellapandi (2010). Wedł ug autora *Aspergillus flavus* i *Aspergillus terreus* najlepiej produkował y proteazy na podł o u z peptonem wołowym. Niyonzi ma i More (2013) wyizolowali z gleby szczep o wysokiej aktywno ci proteolitycznej. Identyfikacja molekularna wykazał a, e izolat nale y do *Aspergillus terreus* gr. Badania optymalizacji produkcji alkalicznej proteazy tego szczepu wykazał y, e produkował on wysokoaktywne enzymy na podł o u z peptonem sojowym. Jednocześnie autorzy stwierdzili, e zastosowanie azotu w formie organicznej skutkował o produkcj proteaz o wy szej aktywno ci w porównaniu do azotu w formie nie organicznej. Chocia Chi i in. (2007) uzyskali inne wyniki. Autorzy wyizolowali z Morza Południowoci ski ego oraz Oceanu Spokojnego grzyby. Spo ród 327 izolatów tylko 12 był o zdolnych do produkcji proteaz. Nast pnie izolat o najwy szej aktywno ci proteazy zidentyfikowano jako *Aureobasidium pullulans*. Autorzy podaj , e

*Aureobasidium pullulans* syntetyzował proteazy o kilkakrotnie wyższej aktywności na podłożu zawierającym mineralne źródła azotu ( $\text{NaNO}_3$  oraz  $\text{KNO}_3$ ) niż organiczne (z cytrynianem amonu, mocznikiem, peptonem, kazeiną lub tryptonem). Z kolei Negi i Banerjee (2010) stwierdzili, że *Aspergillus awamori* nakazawa MTCC 6652 najlepiej produkował enzymy proteolityczne na podłożu zawierającym azot w formie jonów  $\text{NH}_4^+$ , w następnej kolejności pepton. Podobnie Kamath i in. (2010) wykazali, że azot w formie nieorganicznej jest lepszym substratem do produkcji proteaz *Aspergillus niger* w porównaniu do form organicznych. Z kolei Abidi i in. (2008) podają, że *Botrytis cinerea* syntetyzował proteazy o niskiej aktywności na podłożu z azotanem (V) sodu oraz nie produkował w ogóle proteaz na podłożu z mocznikiem. Szczep ten najlepiej produkował enzymy proteolityczne na podłożu zawierającym mieszaninę peptonu (0,5%) i ekstraktu drożdżowego (0,5%). Aktywność proteolityczna może podlegać regulacji na zasadzie indukcji substratowej, tzn. odpowiedniego źródła białka może inicjować syntezę enzymów, bądź w przypadku enzymów konstytutywnych, zwiększa jej aktywność. Pepton jest częściowo zhydrolizowanym białkiem stąd aktywność na tym podłożu jest większa. Różne wyniki uzyskane przez autorów świadczą o tym, że każda mikroorganizm należałoby traktować indywidualnie. Zbadanie optymalnego źródła białka, bądź też dodatkowego źródła azotu będzie skutkowało wysoką produkcją enzymów proteolitycznych. W tym czynnikiem wpływającym zarówno na rozwój jak i produkcję enzymów proteolitycznych jest obecność cukrów w podłożu. Dla niektórych pleśni występuje stężenie cukru np. sacharozy obecnej w standardowych podłożach (40g/l) sprzyja rozwojowi, jednak nie zawsze korzystnie wpływa na produkcję wysokoaktywnych enzymów proteolitycznych. Z moich badań wynika, że *Penicillium flavigenum* najlepiej syntetyzował proteazy na podłożu z fruktozą, a najgłabiej na podłożu z sacharozą i skrobią. Podobne wyniki uzyskał Chellapandi (2010). Autor zoptymalizował produkcję alkalicznej proteazy *Aspergillus flavus* oraz *Aspergillus terreus*. Według niego *Aspergillus flavus* najlepiej produkował enzymy na podłożu z fruktozą, po 3 dniach hodowli, zaś najgłabiej na podłożu z rybozą. Natomiast *Aspergillus terreus* produkował wysokoaktywne enzymy proteolityczne na podłożu z glukozą, najgłabiej natomiast na podłożu z rybozą. Z kolei Malathi i in. (1991) badali wpływ cukrów (laktozy, sacharozy, skrobi, fruktozy, dekstryny oraz maltozy) na syntezę alkalicznej proteazy *Aspergillus flavus*. Według autorów *Aspergillus flavus* syntetyzował wysokoaktywne proteazy na podłożu zawierającym laktozę. Pozostałe cukry obniżały lub nie miały znaczącego wpływu na aktywność produkowanej alkalicznej proteazy. Badania Devi i in. (2008) pokazują, że *Aspergillus niger* najlepiej produkował alkalyczną proteazę na podłożu z mannitolem oraz podobnie jak badany przeze mnie *Penicillium flavigenum*, najgłabiej syntetyzował enzymy na podłożu zawierającym sacharozę. Inne źródła podają, że *Aspergillus awamori* nakazawa MTCC 6652 również syntetyzował wysoko aktywne proteazy w obecności laktozy. Z kolei dekstroza, skrobia, skrobia z palmy sagowej, skrobia ararutowa oraz galaktoza nie miały wpływu lub hamowały produkcję enzymów proteolitycznych (Negi i Banerjee 2010). Z kolei Abidi i in. (2008) identyfikowali fitopatogeny grzybowe zdolne do syntezy wysoko aktywnych enzymów proteolitycznych. Spośród 6 przebadanych gatunków najaktywniejsze enzymy proteolityczne produkował fitopatogen *Botrytis cinerea*. Następnie autorzy zoptymalizowali proces produkcji proteazy tej pleśni. Z ich badań wynika, że *Botrytis cinerea* najlepiej produkował proteazy na podłożu z melasą, a najgłabiej w obecności



maltozy sacharozy i skrobi. Natomiast Kamath i in. (2010) wyizolowali z gleby pleśnie, które następnie zbadali pod kątem produkcji enzymów proteolitycznych. Szczep o najwyższej aktywności zidentyfikowano w Agharkar Research Institute, Pune i zakwalifikowano do *Aspergillus niger*. W badaniach nad optymalizacją procesu produkcji enzymów proteolitycznych, autorzy obserwowali wzrost aktywności enzymów na podłożu z fruktoz i skrobi.

Glukoza bardzo często hamuje aktywność enzymów. U niektórych gatunków grzybów np. *Aspergillus nidulans* czy *Aspergillus oryzae* zachodzi glukozowa inhibicja metaboliczna. Wynika ona z adaptacji organizmu do stałego wykorzystania glukozy jako podstawowego źródła energii bez potrzeby syntetyzowania dodatkowych enzymów (Ichinose i in. 2017, Ronne 1995, Fukushima i in. 1989).

Srinubabu i in. (2007) badali wpływ cukrów na produkcję enzymów proteolitycznych *Aspergillus oryzae* 637. Autorzy obserwowali wzrost aktywności proteaz tych grzybów po wzbogaceniu pożywki o glukozę, ale tylko w stężeniach 0,6 - 1,2%, wyższe stężenia hamowały aktywność. Podobne wyniki uzyskali m.in. Chellapandi (2010) oraz Sharma i in. (2017). Według nich *Aspergillus terreus* najwyższą aktywność proteazy wykazał na podłożu z glukozą. Z kolei Sutar i in. (1992) podają, że *Conidiobolus coronatus* najlepiej syntetyzuje proteazy na podłożach zawierających glukozę, fruktozę i sacharozę. Jednak wzrost aktywności proteolitycznej był obserwowany przy 1% fruktozie oraz 2% glukozie. Wyższe stężenia tych cukrów hamowały produkcję proteaz.

Istotnym czynnikiem wpływającym na produkcję enzymów proteolitycznych jest również odczyn podłoża. Z moich badań wynika, że *Penicillium flavigenum* syntetyzował wysokoaktywne proteazy na podłożu o pH 9. Izolat przeze mnie badany pochodzi z gleby zasadowej i jest on zdolny do produkcji enzymów w podłożu o tak wysokim odczynie. Podobnie Niyonzima i More (2013) wykazali, że produkcja alkalicznej proteazy *Aspergillus terreus* gr. zależała od odczynu podłoża i najwyższą aktywność enzymów osiągnęła w pożywce o pH 10. Autorzy jednak nie podają parametrów fizykochemicznych gleby z pól ziemniaczanych w Bangalore, z której izolowali pleśnie, stąd trudno wnioskować czy pH środowiska, z którego pochodzi pleśń ma wpływ na aktywność proteolityczną. Moja przypuszcza, że gleba miała odczyn lekko zasadowy lub zasadowy.

Z kolei Oyelake i in. (2010) wyizolowali grzyby pleśniowe z gleby pochodzącej z wysypiska łusek ziaren ryżowych. Spośród badanych izolatów wybrano dwa, które produkowały enzymy proteolityczne o najwyższej aktywności. Na podstawie mikroskopowej analizy cech morfologicznej stwierdzono, że badane izolaty należą do *Aspergillus fumigatus* oraz *Aspergillus flavus*.

Autorzy wykazali, że *Aspergillus flavus* produkował aktywne proteazy wraz ze wzrostem odczynu pożywki, jednak najwyższą aktywność wykazał w podłożu o pH=8. Dalsze zwikszczenie stężenia jonów wodorowych w podłożu prowadziło do zahamowania syntezy enzymów proteolitycznych. Natomiast *Aspergillus fumigatus* syntetyzował proteazy o wysokiej aktywności na podłożu o pH=5. W tym przypadku środowisko izolacji producentów enzymów proteolitycznych nie miało większego znaczenia. Autorzy również nie podają, jaki był odczyn gleby z której izolowali grzyby, moja przypuszcza, że pH oscylowało w granicach 7-8, jak dla większości gleby uprawnej.

Produkcja wysoko aktywnych enzymów przez mikroorganizmy alkaliofilne wykazuje silną zależność od pH środowiska (Kumar i Takagi 1999). Odczyn podłoża hodowlanego ma kluczowe znaczenie

podczas produkcji proteazy. pH podłoża może wpływać pośrednio na produkcję proteazy poprzez zmiany dostępnoci substratów i/lub bezpośrednio oddziałując z powierzchnią komórki (Niyonzima i More 2013). W celu maksymalizacji produkcji proteaz przez mikroorganizmy alkalofilne odczyn pożywki powinien być utrzymywany powyżej pH 7,5 przez cały okres hodowli. Wykazano pewne zalety w wykorzystaniu w tym celu w glanu. Zastosowanie w glanu wapnia i siarczanu (VI) magnezu podczas hodowli *Aspergillus oryzae* zwiększa produkcję proteazy oraz zmniejsza konidyzację (Wang i in. 2005). W pewnych przypadkach podczas produkcji proteazy może dochodzić do obniżenia pH podłoża na co mogą wpływać wydzielane związki o charakterze kwasowym. Zmiany pH podłoża podczas hodowli mikroorganizmów mogą być wykorzystane do ustalenia początku i zakończenia produkcji proteazy (Kumar i Takagi 1999).

Temperatura, podobnie jak odczyn podłoża, istotnie wpływa na produkcję enzymów proteolitycznych. Wisko enzymów najwyższą aktywność wykazuje w temperaturze około 40°C. Można wnioskować, że optymalna temperatura rozwoju mikroorganizmów będzie korelowała się z syntezą enzymów proteolitycznych o wysokiej aktywności. Z moich badań wynika, że *Penicillium flavigenum* syntetyzował proteazy o wysokiej aktywności w temperaturach 20-30°C. W takiej temperaturze stwierdzono najlepszy wzrost pleśni. Podobne wyniki uzyskali Kamath i in. (2010). Autorzy prowadzili hodowlę *Aspergillus niger* w zakresie temperatur od 20 do 40°C przez 6 dni. Ich badania wykazały, że szczep ten syntetyzował wysokoaktywne proteazy w 28°C po 5 dniach inkubacji. Inne gatunki *Aspergillus*: *A. flavus* i *A. fumigatus* najwyższą wartość aktywności proteaz osiągały w hodowli prowadzonej w temperaturze 30°C (Oyeleke i Egwim 2010), *A. niger* w temperaturze 35°C (Paranthaman i in. 2009). Z kolei Niyonzima i More (2013) podają, że *Aspergillus terreus* produkował proteazy w szerokim zakresie temperatur 30 - 55°C, jednak najwyższą aktywność proteazy osiągały w hodowli prowadzonej w temperaturze 37°C. Podobne wyniki uzyskali Negi i Banerjee (2010). Autorzy badali produkcję enzymów proteolitycznych *A. awamori* w przedziale temperaturowym od 28 do 40°C. Badany szczep produkował proteazy o najwyższej aktywności w temperaturze 35°C.

rodowiska ekstremalne np. gleby alkaliczne i zasolone mogą być interesującym źródłem pozyskiwania mikroorganizmów. Enzymy proteolityczne syntetyzowane przez takie drobnoustroje mają duże znaczenie w przemyśle. Z moich badań wynika, że *Penicillium flavigenum* najlepiej syntetyzował proteazy przy 3% zasoleniu podłoża. Podobne wyniki uzyskali Wang i in. (2005). Autorzy wykazali, że dodanie do podłoża 1% NaCl skutkowało wzrostem produkcji enzymów proteolitycznych *Aspergillus oryzae* o 55% w porównaniu do hodowli bez NaCl. Jednak dalsze zwiększenie stężenia NaCl hamowało syntezę proteaz (Wang i in. 2005).

Dla mikroorganizmów halofilnych czy halotolerancyjnych ważne jest określenie stężenia soli w podłożu, gdy warunkuje ich optymalny wzrost i produkcję enzymów proteolitycznych. Niektóre gatunki grzybów np. *Aspergillus oryzae* NISL 1913 był zdolny do syntezy aktywnych proteaz w podłożu zawierającym 10% NaCl (Fukushima i in. 1989). Co nie oznacza, że przy niższych stężeniach NaCl zostaje zahamowana produkcja enzymów. Mikroorganizmy wykazują wysoką tolerancję na zasolenie i mogą rozwijać się i produkować enzymy przy szerokim zakresie stężenia soli w podłożu. Badania jednak wykazują, że rodzajowo, z którego izolowane są mikroorganizmy wpływa na syntezę enzymów proteolitycznych. Na przykład *Bacillus subtilis* NS wyizolowany z wody morskiej produkuje proteazy już przy niskich stężeniach NaCl, a najwyższe

wartości aktywności osi ga w hodowli na podłożu zawierającym 7% NaCl (Nisha i in. 2014). Z kolei Shivanand i Jayaraman (2009) wyizolowali halotolerancyjny szczep *Bacillus aquimaris* VITP4 z zasolonej gleby oraz wody. Szczep ten był zdolny do produkcji wysoko aktywnych proteaz na podłożu zawierającym 1M NaCl. Najlepszym stężeniem soli dla produkcji alkalicznej proteazy okazało się 1 M. Podłoże hodowlane o zasoleniu 1M było najlepsze dla produkcji alkalicznej proteazy.

#### 1. Dyskusja

W celu obniżenia kosztów produkcji enzymów proteolitycznych cały czas trwają poszukiwania mikroorganizmów produkcyjnych proteazy wydajniej przy zastosowaniu tańszych substratów. Alkaliczne proteazy stanowią około 25% światowej konsumpcji enzymów, dlatego optymalizacja produkcji proteaz przez alkalofile cieszy się szczególnie dużym zainteresowaniem. Wzrost mikroorganizmów oraz produkowane przez nie enzymy zależą głównie od składników podłoża: obecności cukrów, źródła białka, zasolenia oraz czasu prowadzonej hodowli, temperatury czy wytrzsania. Optymalizacja wzrostu mikroorganizmów często nie jest skorelowana z produkowaniem przez nie enzymów. Stąd optymalizacja produkcji enzymów mikrobiologicznych jest podstawowym działaniem w przemyśle (Vanitha i in. 2014).

Aby zapewnić maksymalne wykorzystywanie substratów do produkcji enzymów proteolitycznych ważne jest mieszanie. Z moich badań wynika, że *Penicillium flavigenum* daje wyższą wartość aktywności proteazy osi gał w hodowli wytrzsanej (150 rpm) niż niewytrzsanej. Podobne wyniki uzyskali Kamath i in. (2010). Według autorów wytrzsanie hodowli *Aspergillus niger*, wpływało korzystnie na wydajność produkcji proteazy. Najlepsze wyniki uzyskano w hodowli wytrzsanej przy 150 rpm po 5 dniach inkubacji. Z kolei Abidi i in. (2008) badali wpływ wytrzsania hodowli *Botrytis cinerea* w zakresie od 110 do 220 rpm. Proteazę o najwyższej aktywności proteolitycznej uzyskano podczas wytrzsania hodowli przy 150 rpm. Wpływ prędkości wytrzsania hodowli na produkcję proteazy jest cechą indywidualną. *Conidiobolus coronatus*, *Aspergillus oryzae* i *Aureobasidium pullulans* syntetyzowały wysokoaktywne proteazy na wytrzsarkach przy prędkościach odpowiednio: 200 rpm (Sutar i in. 1992), 350 rpm (Wang i in. 2005) oraz 150 rpm (Chi i in. 2007). Intensywność wytrzsania hodowli pośrednio wpływa na natlenienie pożywki oraz wyrównanie stężenia tlenu w całej objętości podłoża. Ponadto wytrzsanie hodowli powoduje równomierne rozmieszczenie substancji odżywczych w całej objętości podłoża, oraz zwiększa ich dostępność dla grzybów. Obecność tlenu i dostępność substratów ma istotne znaczenie na efektywność produkcji proteaz (Kumar i Takagi 1999). Ponadto wytrzsanie hodowli zmienia morfologię grzybów pleśniowych. W hodowli stacjonarnej grzybnia porasta tylko powierzchnię podłoża, dostęp do substratów jest mniejszy i synteza enzymów jest ograniczona. Natomiast w hodowli prowadzonej na wytrzsarkach, grzybnia zajmuje całą objętość podłoża i lepiej wykorzystuje składniki pożywki.

Głównym czynnikiem wpływającym na syntezę proteaz jest obecność białka. Z moich badań wynika, że *Penicillium flavigenum* najlepiej syntetyzował proteazy w obecności peptonu bakteriologicznego lub wołowego jako źródła azotu. Podobne wyniki uzyskał Chellapandi (2010). Według autora *Aspergillus flavus* i *Aspergillus terreus* najlepiej produkowały proteazy na podłożu z peptonem wołowym. Niyonzi ma i More (2013) wyizolowali z gleby szczep o wysokiej aktywności proteolitycznej. Identyfikacja molekularna wykazała, że izolat należał do *Aspergillus terreus* gr. Badania optymalizacji

produkcji alkalicznej proteazy tego szczepu wykazały, że produkował on wysokoaktywne enzymy na podłożu z peptonem sojowym. Jednocześnie autorzy stwierdzili, że zastosowanie azotu w formie organicznej skutkowało produkcją proteaz o wyższej aktywności w porównaniu do azotu w formie nieorganicznej. Chociaż Chi i in. (2007) uzyskali inne wyniki. Autorzy wyizolowali z Morza Południowochińskiego oraz Oceanu Spokojnego grzyby. Spośród 327 izolatów tylko 12 było zdolnych do produkcji proteaz. Następnie izolat o najwyższej aktywności proteazy zidentyfikowano jako *Aureobasidium pullulans*. Autorzy podają, że *Aureobasidium pullulans* syntetyzował proteazy o kilkakrotnie wyższą aktywność na podłożu zawierającym mineralne źródła azotu ( $\text{NaNO}_3$  oraz  $\text{KNO}_3$ ) niż organiczne (z cytrynianem amonu, mocznikiem, peptonem, kazeiną lub tryptonem). Z kolei Negi i Banerjee (2010) stwierdzili, że *Aspergillus awamori* nakazawa MTCC 6652 najlepiej produkował enzymy proteolityczne na podłożu zawierającym azot w formie jonów  $\text{NH}_4^+$ , w następnej kolejności pepton. Podobnie Kamath i in. (2010) wykazali, że azot w formie nieorganicznej jest lepszym substratem do produkcji proteaz *Aspergillus niger* w porównaniu do form organicznych. Z kolei Abidi i in. (2008) podają, że *Botrytis cinerea* syntetyzował proteazy o niskiej aktywności na podłożu z azotanem (V) sodu oraz nie produkował w ogóle proteaz na podłożu z mocznikiem. Szczep ten najlepiej produkował enzymy proteolityczne na podłożu zawierającym mieszaninę peptonu (0,5%) i ekstraktu drożdżowego (0,5%). Aktywność proteolityczna może podlegać regulacji na zasadzie indukcji substratowej, tzn. odpowiedniemu źródłu białka może inicjować syntezę enzymów, bądź w przypadku enzymów konstytutywnych, zwiksza jego aktywność. Pepton jest częściowo zhydrolizowanym białkiem stąd aktywność na tym podłożu jest większa. Różne wyniki uzyskane przez autorów świadczą o tym, że każdy mikroorganizm należy traktować indywidualnie. Zbadanie optymalnego źródła białka, bądź też dodatkowego źródła azotu będzie skutkowało wysoką produkcją enzymów proteolitycznych. W tym czynnikiem wpływającym zarówno na rozwój jak i produkcję enzymów proteolitycznych jest obecność cukrów w podłożu. Dla niektórych pleśni wyśsestnienie cukru np. sacharozy obecnej w standardowych podłożach (40g/l) sprzyja rozwojowi, jednak nie zawsze korzystnie wpływa na produkcję wysokoaktywnych enzymów proteolitycznych. Z moich badań wynika, że *Penicillium flavigenum* najlepiej syntetyzował proteazy na podłożu z fruktozą, a naj słabiej na podłożu z sacharozą i skrobią. Podobne wyniki uzyskał Chellapandi (2010). Autor zoptymalizował produkcję alkalicznej proteazy *Aspergillus flavus* oraz *Aspergillus terreus*. Według niego *Aspergillus flavus* najlepiej produkował enzymy na podłożu z fruktozą, po 3 dniach hodowli, zaś naj słabiej na podłożu z rybozą. Natomiast *Aspergillus terreus* produkował wysokoaktywne enzymy proteolityczne na podłożu z glukozą, naj słabiej natomiast na podłożu z rybozą. Z kolei Malathi i in. (1991) badali wpływ cukrów (laktozy, sacharozy, skrobi, fruktozy, dekstryn oraz maltozy) na syntezę alkalicznej proteazy *Aspergillus flavus*. Według autorów *Aspergillus flavus* syntetyzował wysokoaktywne proteazy na podłożu zawierającym laktozę. Pozostałe cukry obniżały lub nie miały znaczącego wpływu na aktywność produkowanej alkalicznej proteazy. Badania Devi i in. (2008) pokazują, że *Aspergillus niger* najlepiej produkował alkalyczną proteazę na podłożu z mannitolem oraz podobnie jak badany przeze mnie *Penicillium flavigenum*, naj słabiej syntetyzował enzymy na podłożu zawierającym sacharozę. Inne źródła podają, że *Aspergillus awamori* nakazawa MTCC 6652 również syntetyzował wysoko aktywne

proteazy w obecności laktozy. Z kolei dekstroza, skrobia, skrobia z palmy sagowej, skrobia ararutowa oraz galaktoza nie miały wpływu lub hamowały produkcję enzymów proteolitycznych (Negi i Banerjee 2010). Z kolei Abidi i in. (2008) identyfikowali fitopatogeny grzybowe zdolne do syntezy wysoko aktywnych enzymów proteolitycznych. Spośród 6 przebadanych gatunków najaktywniejsze enzymy proteolityczne produkował fitopatogen *Botrytis cinerea*. Następnie autorzy zoptymalizowali proces produkcji proteazy tej pleśni. Z ich badań wynika, że *Botrytis cinerea* najlepiej produkował proteazy na podłożu z melasy, a naj słabiej w obecności maltozy sacharozy i skrobi. Natomiast Kamath i in. (2010) wyizolowali z gleby pleśnie, które następnie zbadali pod kątem produkcji enzymów proteolitycznych. Szczep o najwyższej aktywności zidentyfikowano w Agharkar Research Institute, Pune i zakwalifikowano do *Aspergillus niger*. W badaniach nad optymalizacją procesu produkcji enzymów proteolitycznych, autorzy obserwowali wzrost aktywności enzymów na podłożu z fruktoz i skrobi.

Glukoza bardzo często hamuje aktywność enzymów. U niektórych gatunków grzybów np. *Aspergillus nidulans* czy *Aspergillus oryzae* zachodzi glukozowa inhibicja metaboliczna. Wynika ona z adaptacji organizmu do stałego wykorzystania glukozy jako podstawowego źródła energii bez potrzeby syntetyzowania dodatkowych enzymów (Ichinose i in. 2017, Ronne 1995, Fukushima i in. 1989).

Srinubabu i in. (2007) badali wpływ cukrów na produkcję enzymów proteolitycznych *Aspergillus oryzae* 637. Autorzy obserwowali wzrost aktywności proteaz tych grzybów po wzbogaceniu pożywki o glukozę, ale tylko w stężeniach 0,6 - 1,2%, wyższe stężenia hamowały aktywność. Podobne wyniki uzyskali m.in. Chellapandi (2010) oraz Sharma i in. (2017). Według nich *Aspergillus terreus* najwyższą aktywność proteazy wykazał na podłożu z glukozą. Z kolei Sutar i in. (1992) podają, że *Conidiobolus coronatus* najlepiej syntetyzuje proteazy na podłożach zawierających glukozę, fruktozę i sacharozę. Jednak wzrost aktywności proteolitycznej był obserwowany przy 1% fruktozie oraz 2% glukozie. Wyższe stężenia tych cukrów hamowały produkcję proteaz.

Istotnym czynnikiem wpływającym na produkcję enzymów proteolitycznych jest również odczyn podłoża. Z moich badań wynika, że *Penicillium flavigenum* syntetyzował wysokoaktywne proteazy na podłożu o pH 9. Izolat przeze mnie badany pochodzi z gleby zasadowej i jest on zdolny do produkcji enzymów w podłożu o tak wysokim odczynie. Podobnie Niyonzima i More (2013) wykazali, że produkcja alkalicznej proteazy *Aspergillus terreus* gr. zależała od odczynu podłoża i najwyższą aktywność enzymów osiągnęła w pożywce o pH 10. Autorzy jednak nie podają parametrów fizykochemicznych gleby z pól ziemniaczanych w Bangalore, z której izolowali pleśnie, stąd trudno wnioskować czy pH rodowiska, z którego pochodzi pleśń ma wpływ na aktywność proteolityczną. Można przypuszczać, że gleba miała odczyn lekko zasadowy lub zasadowy.

Z kolei Oyeloke i in. (2010) wyizolowali grzyby pleśniowe z gleby pochodzącej z wysypiska łusek ziaren ryżowych. Spośród badanych izolatów wybrano dwa, które produkowały enzymy proteolityczne o najwyższej aktywności. Na podstawie mikroskopowej analizy cech morfologicznej stwierdzono, że badane izolaty należą do *Aspergillus fumigatus* oraz *Aspergillus flavus*.

Autorzy wykazali, że *Aspergillus flavus* produkował aktywne proteazy wraz ze wzrostem odczynu pożywki, jednak najwyższą aktywność wykazał w podłożu o pH=8. Dalsze zwikszczenie stężenia jonów wodorowych w podłożu prowadziło do zahamowania syntezy

enzymów proteolitycznych. Natomiast *Aspergillus fumigatus* syntetyzował proteazy o wysokiej aktywności na podłożu o pH=5. W tym przypadku środowisko izolacji producentów enzymów proteolitycznych nie miało większego znaczenia. Autorzy również nie podają, jaki był odczyn gleby z której izolowali grzyby, mo na przypuszcza, e pH oscylowało w granicach 7-8, jak dla wi kszoci gleby uprawnej.

Produkcja wysoko aktywnych enzymów przez mikroorganizmy alkalofilne wykazuje siln e zale no od pH rodoiska (Kumar i Takagi 1999). Odczyn podłoa hodowlanego ma kluczowe znaczenie podczas produkcji proteazy. pH podłoa mo e wpływa po rednio na produkcj proteazy poprzez zmiany dost pno ci substratów i lub bezpo rednio oddziaływa z powierzchnią ci any komórkowej (Niyonzima i More 2013). W celu maksymalizacji produkcji proteaz przez mikroorganizmy alkalofilne odczyn po ywki powinien by utrzymywany powy ej pH 7,5 przez cały okres hodowli. Wykazano pewne zalety w wykorzystaniu w tym celu w glanu. Zastosowanie w glanu wapnia i siarczanu (VI) magnezu podczas hodowli *Aspergillus oryzae* zwi ksza produkcj proteazy oraz zmniejsza konidyzacje (Wang i in. 2005). W pewnych przypadkach podczas produkcji proteazy mo e dochodzi do obni enia pH podłoa na co mog wpływa wydzielane zwi zki o charakterze kwasowym. Zmiany pH podłoa podczas hodowli mikroorganizmów mog by wykorzystane do ustalenia pocztku i zakoczenia produkcji proteazy (Kumar i Takagi 1999).

Temperatura, podobnie jak odczyn podłoa, istotnie wpływa na produkcj enzymów proteolitycznych. Wi kszoci enzymów najwy sz aktywno wykazuje w temperaturze około 40°C. Mo na wnioskowa, e optymalna temperatura rozwoju mikroorganizmów b dzie korelowała si z syntez enzymów proteolitycznych o wysokiej aktywności. Z moich bada wynika, e *Penicillium flavigenum* syntetyzował proteazy o wysokiej aktywności w temperaturach 20-30°C. W takiej temperaturze stwierdzono najlepszy wzrost ple ni. Podobne wyniki uzyskali Kamath i in. (2010). Autorzy prowadzili hodowl *Aspergillus niger* w zakresie temperatur od 20 do 40°C przez 6 dni. Ich badania wykazały, e szczep ten syntetyzował wysokoaktywne proteazy w 28°C po 5 dniach inkubacji. Inne gatunki *Aspergillus*: *A. flavus* i *A. fumigatus* najwy sze warto ci aktywności proteaz osi gały w hodowli prowadzonej w temperaturze 30°C (Oyeleke i Egwim 2010), *A. niger* w temperaturze 35°C (Paranthaman i in. 2009). Z kolei Niyonzima i More (2013) podaj, e *Aspergillus terreus* produkował proteazy w szerokim zakresie temperatur 30 - 55°C, jednak najwy sz aktywno proteazy osi gały w hodowli prowadzonej w temperaturze 37°C. Podobne wyniki uzyskali Negi i Banerjee (2010). Autorzy badali produkcj enzymów proteolitycznych *A. awamori* w przedziale temperaturowym od 28 do 40°C. Badany szczep produkował proteazy o najwy ej aktywności w temperaturze 35°C.

Środowiska ekstremalne np. gleby alkaliczne i zasolone mog by interesuj cym ró dłem pozyskiwania mikroorganizmów. Enzymy proteolityczne syntetyzowane przez takie drobnoustroje maj du e znaczenie w przemy le. Z moich bada wynika, e *Penicillium flavigenum* najlepiej syntetyzował proteazy przy 3% zasoleniu podłoa. Podobne wyniki uzyskali Wang i in. (2005). Autorzy wykazali, e, dodanie do podłoa 1% NaCl skutkowało wzrostem produkcji enzymów proteolitycznych *Aspergillus oryzae* o 55% w porównaniu do hodowli bez NaCl. Jednak dalsze zwi kszanie st enia NaCl hamowało syntez proteaz (Wang i in. 2005).

Dla mikroorganizmów halofilnych czy halotolerancyjnych wa ne jest okre lenie st enia soli w podłożu, gdy warunkuje ich optymalny wzrost i produkcj enzymów proteolitycznych. Niektóre gatunki

grzybów np. *Aspergillus oryzae* NISL 1913 był zdolny do syntezy aktywnych proteaz w podłożu zawierającym 10% NaCl (Fukushima i in. 1989). Co nie oznacza, że przy niskich stężeniach NaCl zostaje zahamowana produkcja enzymów. Mikroorganizmy wykazują wysoką tolerancję na zasolenie i mogą rozwijać się i produkować enzymy przy szerokim zakresie stężeń soli w podłożu. Badania jednak wykazują, że rodzaj substratu, z którego izolowane są mikroorganizmy wpływa na syntezę enzymów proteolitycznych. Na przykład *Bacillus subtilis* NS wyizolowany z wody morskiej produkuje proteazy już przy niskich stężeniach NaCl, a najwyższą wartość aktywności osiąga w hodowli na podłożu zawierającym 7% NaCl (Nisha i in. 2014). Z kolei Shivanand i Jayaraman (2009) wyizolowali halotolerancyjny szczep *Bacillus aquimaris* VITP4 z zasolonej gleby oraz wody. Szczep ten był zdolny do produkcji wysoko aktywnych proteaz na podłożu zawierającym 1M NaCl. Najlepszym stężeniem soli dla produkcji alkalicznej proteazy okazało się 1 M. Podłoże hodowlane o zasoleniu 1M było najlepsze dla produkcji alkalicznej proteazy (Thomson i Thom 2014).

#### Bibliography

- Zan1, L. M., Facchini, F. D. A., Vasconcelos, F., Bonugli-Santos, R. C., Rodrigues, A., Sette, L. D., ... & Bonilla-Rodríguez, G. O. (2017). Production, partial characterization, and immobilization in alginate beads of an alkaline protease from a new thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. *The Journal of Microbiology*, 48(3), 331-336.
- Yadav, S. K., Bisht, D., Shikha, S., & Darmwal, N. S. (2011). Oxidant and solvent stable alkaline protease from *Aspergillus flavus* and its characterization. *African Journal of Biotechnology*, 10(43), 8630-8640.
- Abarenkov, K., Nilsson R, Larsson KH, Alexander I, Eberhardt U, Erland S, et al. (2010). The UNITE database for molecular identification of fungi - recent updates and future perspectives. *New Phytologist*, 186: 281-285.
- Abidi, F., Chobert, J. M., Haertlé, T., & Marzouki, M. N. (2011). Purification and biochemical characterization of stable alkaline protease Prot-2 from *Botrytis cinerea*. *Process Biochemistry*, 46(12), 2301-2310.
- Abidi, F., Limam, F., & Nejib, M. M. (2008). Production of alkaline proteases by *Botrytis cinerea* using economic raw materials: assay as biode detergent. *Process Biochemistry*, 43(11), 1202-1208.
- Acharya, S., & Chaudhary, A. (2012). Optimization of fermentation conditions for cellulases production by *Bacillus licheniformis* MVS1 and *Bacillus* sp. MVS3 isolated from Indian hot spring. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55(4), 497-503.
- Ahlat, S., Dhiman, S. S., Battan, B., Mandhan, R. P., & Sharma, J. (2009). Pectinase production by *Bacillus subtilis* and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric. *Process Biochemistry*, 44(5), 521-526.
- Ahmed, S. A., Al-domany, R. A., El-Shayeb, N. M., Radwan, H. H., & Saleh, S. A. (2008). Optimization, immobilization of extracellular alkaline protease and characterization of its enzymatic properties. *Res. J. Agric. Biol. Sci*, 4(5), 434-446.
- Aleksa, H., Dyduch, F., & Wierzbowski, K. (2007). Chloriryt w wglu i moliwo ci ich obni enia metodami przeróbki mechanicznej. *Górnictwo i Geoinżynieria*, 31, 35-48.
- Alshammari, A. M., Adnan, F. M., Mustafa, H., & Hammad, N. (2011). Bioethanol fuel production from rotten banana as an environmental waste management and sustainable energy. *African Journal of Microbiology Research*, 5(6), 586-598.

Andualema, B., & Gessesse, A. (2012). Microbial lipases and their industrial applications. *Biotechnology*, 11(3), 100-118.

Anitha, T. S., & Palanivelu, P. (2013). Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. *Protein expression and purification*, 88(2), 214-220.

Aronson, A. I., Angelo, N., & Holt, S. C. (1971). Regulation of extracellular protease production in *Bacillus cereus* T: characterization of mutants producing altered amounts of protease. *Journal of bacteriology*, 106(3), 1016-1025.

Arunachalam, C., & Saritha, K. (2009). Protease enzyme: An eco-friendly alternative for leather industry. *Indian Journal of Science and Technology*, 2(12), 29-32.

Babu, K. R., & Satyanarayana, T. (1995).  $\alpha$ -Amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 30(4), 305-309.

Bailey, J. E., & Ollis, D. F. (1976). *Biochemical engineering fundamentals*. Chemical Engineering Education.

Bajaj, A., Lohan, P., Jha, P. N., & Mehrotra, R. (2010). Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: an overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62(1), 9-14.

Bansal, N., Tewari, R., Soni, R., & Soni, S. K. (2012). Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. *Waste management*, 32(7), 1341-1346.

Banu, A. R., Devi, M. K., Gnanaprabhal, G. R., Pradeep, B. V., & Palani swamy, M. (2010). Production and characterization of pectinase enzyme from *Penicillium chrysogenum*. *Indian Journal of Science and Technology*, 3(4), 377-381.

Beldman, G., Rombouts, F. M., Voragen, A. G. J., & Pilnik, W. (1984). Application of cellulase and pectinase from fungal origin for the liquefaction and saccharification of biomass. *Enzyme and microbial technology*, 6(11), 503-507.

Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., & Kauserud, H. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC microbiology*, 10(1), 189.

Biz, A., Farias, F. C., Motter, F. A., de Paula, D. H., Richard, P., Krieger, N., & Mitchell, D. A. (2014). Pectinase activity determination: an early deceleration in the release of reducing sugars throws a spanner in the works!. *PloS one*, 9(10), e109529.

Bosso, A. (1993). On-skin maceration during white wine making in the presence of pectolytic enzyme preparations. *Vini d'Italia*, 34, 25-40.

Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y., Barnabé, S., & Valéro, J. R. (2007). *Bacillus thuringiensis* proteases: Production and role in growth, sporulation and synergism. *Process Biochemistry*, 42(5), 773-790.

Charles, P., Devanathan, V., Anbu, P., Ponnuswamy, M. N., Kalai chelvan, P. T., & Hur, B. K. (2008). Purification, characterization and crystallization of an extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* HA710. *Journal of basic microbiology*, 48(5), 347-352.

Chaudhri, A., & Suneetha, V. (2012). Microbially derived pectinases: A review. *J Pharm Biol Sci*, 2, 01-05.

Chellapandi, P. (2010). Production and preliminary characterization of alkaline protease from *Aspergillus flavus* and *Aspergillus terreus*. *Journal of Chemistry*, 7(2), 479-482.

Chellappan, S., Jasmin, C., Basheer, S. M., Elias, K. K., Bhat, S.



G., & Chandrasekaran, M. (2006). Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 41(4), 956-961.

Chen, S. J., Cheng, C. Y., & Chen, T. L. (1998). Production of an alkaline lipase by *Acinetobacter radioresistens*. *Journal of fermentation and bioengineering*, 86(3), 308-312.

Chi, Z., Ma, C., Wang, P., & Li, H. F. (2007). Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. *Bioresource Technology*, 98(3), 534-538.

Collares, R. M., Miklasevicius, L. V., Bassaco, M. M., Salau, N. P., Mazutti, M. A., Bisognin, D. A., & Terra, L. M. (2012). Optimization of enzymatic hydrolysis of cassava to obtain fermentable sugars. *Journal of Zhejiang University-Science B*, 13(7), 579-586.

Cortez, J. M., Ellis, J., & Bishop, D. P. (2002). Using cellulases to improve the dimensional stability of cellulosic fabrics. *Textile Research Journal*, 72(8), 673-680.

Dalev, P. G. (1994). Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of a protein concentrate. *Bioresource Technology*, 48(3), 265-267.

Davidenko, T. I. (1999). Immobilization of alkaline protease on polysaccharides of microbial origin. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 33(9), 487-489.

De Azeredo, L. A. I., De Lima, M. B., Coelho, R. R. R., & Freire, D. M. G. (2006). A low-cost fermentation medium for thermophilic protease production by *Streptomyces* sp. 594 using feather meal and corn steep liquor. *Current microbiology*, 53(4), 335.

De Carvalho, L. M. J., De Castro, I. M., & Da Silva, C. A. B. (2008). A study of retention of sugars in the process of clarification of pineapple juice (*Ananas comosus*, L. Merrill) by micro-and ultra-filtration. *Journal of Food Engineering*, 87(4), 447-454.

Demain, A. L., & Adrio, J. L. (2008). Contributions of microorganisms to industrial biology. *Molecular Biotechnology*, 38(1), 41.

Dettmer, A., Ayub, M. A., & Gutterres, M. (2011). Hide unhairing and characterization of commercial enzymes used in leather manufacture. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28(3), 373-380.

Devi, M. K., Banu, A. R., Gnanaprabha, G. R., Pradeep, B. V., & Palani swamy, M. (2008). Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian journal of science and technology*, 1(7), 1-6.

Dłu ewski, M., & Dłu ewska, A. (2008). *Technologia żywności: podr ęcznik dla technikum*. Wydawnictwa Szkolne i Pedagogiczne.

Feller, G., & Gerday, C. (2003). Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nature reviews microbiology*, 1(3), 200-208.

Ferrero, M. A., Castro, G. R., Abate, C. M., Baigori, M. D., & Sineriz, F. (1996). Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45(3), 327-332.

Fronk, J., Z bek, J. (1995) *Słownik Biochemia Szkolny* Wydawnictwa Szkolne i Pedagogiczne

Fukushima, Y., Itoh, H., Fukase, T., & Motai, H. (1989). Continuous protease production in a carbon-limited chemostat culture by salt tolerant *Aspergillus oryzae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 30(6), 604-608.

Furhan, J., & Sharma, S. (2014). Microbial alkaline proteases:

Findings and Applications. *Int. J. Inv. Pharm. Sci.*, 4, 823-834.

Garg, G., Singh, A., Kaur, A., Singh, R., Kaur, J., & Mahajan, R. (2016). Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. *3 Biotech*, 6(1), 47.

Germano, S., Pandey, A., Osaku, C. A., Rocha, S. N., & Soccol, C. R. (2003). Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(2), 246-251.

González-Tello, P., Camacho, F., Jurado, E., Paez, M. P., & Guadix, E. M. (1994). Enzymatic hydrolysis of whey proteins: I. Kinetic models. *Biotechnology and Bioengineering*, 44(4), 523-528.

Grum-Grzhimaylo, A. A., Debets, A. J. M., van Diepeningen, A. D., Georgieva, M. L., & Bilanenko, E. N. (2013). *Sodiomyces alkalinus*, a new holomorphic alkaliphilic ascomycete within the Plectosphaerellaceae. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 31, 147.

Gupta, R., Beg, Q., & Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 59(1), 15-32.

Gupta, R., Khasa, Y. P., & Kuhad, R. C. (2011). Evaluation of pretreatment methods in improving the enzymatic saccharification of cellulosic materials. *Carbohydrate polymers*, 84(3), 1103-1109.

Hajji, M., Kanoun, S., Nasri, M., & Gharsallah, N. (2007). Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. *Process Biochemistry*, 42(5), 791-797.

Hames, B. D., Hooper, N. M. (2012). *Krótkie wykłady-biochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.

Heck, J. X., Hertz, P. F., & Ayub, M. A. (2002). Cellulase and xylanase productions by isolated Amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33(3), 213-218.

Heikinheimo, L., Buchert, J., Miettinen-Oinonen, A., & Suominen, P. (2000). Treating denim fabrics with *Trichoderma reesei* cellulases. *Textile Research Journal*, 70(11), 969-973.

Hendry, P. (2006). Extremophiles: there's more to life. *Environmental Chemistry*, 3(2), 75-76.

Hong, H. A., Khaneja, R., Tam, N. M., Cazzato, A., Tan, S., Urdaci, M., ... & Cutting, S. M. (2009). *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract. *Research in microbiology*, 160(2), 134-143.

Hoondal, G., Tiwari, R., Tewari, R., Dahiya, N. B. O. K., & Beg, Q. (2002). Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 59(4-5), 409-418.

Horiuchi, K. (1999). Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 63(4), 735-750.

Hotha, S., & Banik, R. M. (1997). Production of Alkaline Protease by *Bacillus thuringiensis* H 14 in Aqueous Two-Phase Systems. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental AND Clean Technology*, 69(1), 5-10.

Hreggviðsson, G. O., Kaiuste, E., Holst, O., Eggertsson, G., Pálsdóttir, A., & Kristjánsson, J. K. (1996). An extremely thermostable cellulase from the thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*. *Applied and environmental microbiology*, 62(8), 3047-3049.

Ibrahim, N. A., El-Badry, K., Eid, B. M., & Hassan, T. M. (2011). A new approach for biofinishing of cellulose-containing fabrics

using acid cellulases. *Carbohydrate Polymers*, 83(1), 116-121.

Ichinose, S., Tanaka, M., Shintani, T., & Gomi, K. (2017). Increased production of biomass-degrading enzymes by double deletion of *creA* and *creB* genes involved in carbon catabolite repression in *Aspergillus oryzae*. *Journal of bioscience and bioengineering*.

Iconomou, D., Arapoglou, D., & Israilides, C. (2010). Improvement of phenolic antioxidants and quality characteristics of virgin olive oil with the addition of enzymes and nitrogen during olive paste processing. *Grasas y Aceites*, 61(3), 303-311.

Iso, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T., & Shrestha, S. (2001). Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 16(1), 53-58.

Isono, Y., & Nakajima, M. (2000). Enzymic peptide synthesis using a microaqueous highly concentrated amino acid mixture. *Process Biochemistry*, 36(3), 275-278.

Jaeger, K. E., & Reetz, M. T. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in biotechnology*, 16(9), 396-403.

Johnson, H. W. (1923). Relationships between hydrogen ion, hydroxyl ion and salt concentrations and the growth of seven soil molds. *Research Bulletin (Iowa Agriculture and Home Economics Experiment Station)*, 5(76), 1.

Jørgensen, H., Eriksson, T., Börjesson, J., Tjerneld, F., & Olsson, L. (2003). Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(7), 851-861.

Kaieda, M., Samukawa, T., Kondo, A., & Fukuda, H. (2001). Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91(1), 12-15.

Kalaiarasi, K., & Sunitha, P. U. (2009). Optimization of alkaline protease production from *Pseudomonas fluorescens* isolated from meat waste contaminated soil. *African Journal of Biotechnology*, 8(24).

Kamath, P., Subrahmanyam, V. M., Rao, J. V., & Raj, P. V. (2010). Optimization of cultural conditions for protease production by a fungal species. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 72(2), 161.

Kandra, L. (2003).  $\alpha$ -Amylases of medical and industrial importance. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 666, 487-498.

Karmakar, M., & Ray, R. R. (2011). Current trends in research and application of microbial cellulases. *Research Journal of Microbiology*, 6(1), 41.

Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., & Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource technology*, 77(3), 215-227.

Konopacka, . (2005). *Flotacja mechaniczna*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej.

Krepulec, A. (2008). Możliwości wykorzystania skrobi zbożowych w innych niż spożywczy przemysłach. *Przegląd Zbożowo-Młynarski*, 52(09), 61-62.

Kuhad, R. C., Gupta, R., & Singh, A. (2011). Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme research*, 2011.

Kuhad, R. C., Gupta, R., Khasa, Y. P., & Singh, A. (2010). Bioethanol production from *Lantana camara* (red sage): pretreatment, saccharification and fermentation. *Bioresource technology*, 101(21), 8348-8354.

Kumar, C. G., & Takagi, H. (1999). Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology advances*, 17(7), 561-594.

Langsford, M. L., Gilkes, N. R., Wakarchuk, W. W., Kilburn, D. G., Miller Jr, R. C., & Warren, R. A. J. (1984). The cellulase system of *Cellulomonas fimi*. *Microbiology*, 130(6), 1367-1376.

Libudzi sz, Z., Kowal, K., akowska, Z. (2008). *Mikrobiologia techniczna*. Wydawnictwo Naukowe PWN.

Lo, Y. C., Lu, W. C., Chen, C. Y., Chen, W. M., & Chang, J. S. (2010). Characterization and high-level production of xylanase from an indigenous cellulolytic bacterium *Acinetobacter junii* F6-02 from southern Taiwan soil. *Biochemical Engineering Journal*, 53(1), 77-84.

Lonsane, B. K., Ghildyal, N. P., Budi atman, S., & Ramakrishna, S. V. (1985). Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 7(6), 258-265.

López-Contreras, A. M., Gabor, K., Martens, A. A., Renckens, B. A., Claassen, P. A., Van Der Oost, J., & De Vos, W. M. (2004). Substrate-induced production and secretion of cellulases by *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and environmental microbiology*, 70(9), 5238-5243.

Malathi, S., & Chakraborty, R. (1991). Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid-substrate fermentation conditions for use as a depilation agent. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(3), 712-716.

Mastalerz, P., (2009) *Elementarna Biochemia* Wydawnictwo Chemiczne 2009.

Matsui, T., Matsufuji, H., Seki, E., Osajima, K., Nakashima, M., & Osajima, Y. (1993). Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolyzates derived from sardine muscle. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 57(6), 922-925.

Maurer, H. W. (2009). Starch in the paper industry. In *Starch* (Third Edition) (pp. 657-713).

Miller, N. J., & Rice-Evans, C. A. (1997). The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chemistry*, 60(3), 331-337.

Mo, H., Zhang, X., & Li, Z. (2004). Control of gas phase for enhanced cellulase production by *Penicillium decumbens* in solid-state culture. *Process Biochemistry*, 39(10), 1293-1297.

Morozov, N. V., Khanchich, O. A., & Serkov, A. T. (1983). Bound water in cellulose. *Fibre Chemistry*, 15(2), 133-135.

Mueller, G. M. (2011). *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Elsevier.

NAK?BO?LU, N., Toscali, D., & YA A, ?. (2001). Silver recovery from waste photographic films by using enzymatic method. *Turkish Journal of Chemistry*, 25(3), 349-353.

Negi, S., & Banerjee, R. (2010). Optimization of culture parameters to enhance production of amylase and protease from *Aspergillus awamori* in a single fermentation. *African Journal of Biochemistry Research*, 4(3), 73-80.

Neklyudov, A. D., Ivankin, A. N., & Berdutina, A. V. (2000). Properties and uses of protein hydrolysates. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 36(5), 452-459.

Nisha, N. S., & Divakaran, J. (2014). Optimization of alkaline protease production from *Bacillus subtilis* NS isolated from sea water. *African Journal of Biotechnology*, 13(16).

Niyonzima, F. N., & More, S. S. (2013). Screening and optimization of cultural parameters for an alkaline protease production by

*Aspergillus terreus* gr. under submerged fermentation. *Int J Pharm Bio Sci*, 4(1), 1016-1028.

Nur'Alia, A. R., Siti Mazlina, M. K., & Taip, F. S. (2010). Impact of commercial pectolytic enzymes on selected properties of white dragon fruit juice.

Okada, G., Niimura, Y., Sakata, T., Uchimura, T., Ohara, N., Suzuki, H., & Kozaki, M. (1993). *Acermonium alkalophilum*, a new alkalophilic cellulolytic hyphomycete. *Transactions of the Mycological Society of Japan*.

Olempska-Beer, Z. S., Merker, R. I., Ditto, M. D., & Di Novi, M. J. (2006). Food-processing enzymes from recombinant microorganisms—a review. *Regulatory toxicology and Pharmacology*, 45(2), 144-158.

Ortega, J. (1990). Production of extracellular cellulolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *The Texas journal of science (USA)*.

Oyeleke, S. B., Egwim, E. C., & Auta, S. H. (2010). Screening of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* strains for extracellular protease enzyme production. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 2(7), 83-87.

Paranthaman, R., Alagusundaram, K., & Indhumathi, J. (2009). Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *World Journal of Agricultural Sciences*, 5(3), 308-312.

Parrado, J., Bautista, J., & Machado, A. (1991). Production of soluble enzymic protein hydrolyzate from industrially defatted nondehulled sunflower meal. *Journal of agricultural and food chemistry*, 39(3), 447-450.

Perez, A. R., Abanes-De Mello, A., & Pogliano, K. (2000). SpoII B localizes to active sites of septal biogenesis and spatially regulates septal thinning during engulfment in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 182(4), 1096-1108.

Pikuta, E. V., Hoover, R. B., & Tang, J. (2007). Microbial extremophiles at the limits of life. *Critical reviews in microbiology*, 33(3), 183-209.

Prakash, B., Vidyasagar, M., Madhukumar, M. S., Muralikrishna, G., & Sreeramulu, K. (2009). Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali-stable  $\alpha$ -amylases from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101. *Process Biochemistry*, 44(2), 210-215.

Prakasham, R. S., Subba Rao, C., Sreenivas Rao, R., & Sarma, P. N. (2007). Enhancement of acid amylase production by an isolated *Aspergillus awamori*. *Journal of applied microbiology*, 102(1), 204-211.

Praveen, K. G., & Suneetha, V. (2014). A cocktail enzyme-pectinase from fruit industrial dump sites: a review. *Res J Pharm Biol Chem Sci*, 5(2), 1252-1258.

Rajendran, R., Sundaram, S. K., Radhai, R., & Rajapriya, P. (2011). Bioscouring of cotton fabrics using pectinase enzyme its optimization and comparison with conventional scouring process. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 14(9), 519-525.

Rajmohan, S., Dodd, C. E. R., & Waites, W. M. (2002). Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. *Journal of Applied Microbiology*, 93(2), 205-213.

Rajoka, M. I., & Malik, K. A. (1997). Cellulase production by *Cellulomonas biazotea* cultured in media containing different cellulosic substrates. *Bioresource Technology*, 59(1), 21-27.

Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(3), 597-635.

Revilla, I., & González-SanJosé, M. L. (1998). Methanol release during fermentation of red grapes treated with pectolytic enzymes. *Food chemistry*, 63(3), 307-312.

Robles-Medina, A., González-Moreno, P. A., Esteban-Cerdán, L., & Molina-Grima, E. (2009). Biocatalysis: towards ever greener biodiesel production. *Biotechnology advances*, 27(4), 398-408.

Ronne, H. (1995). Glucose repression in fungi. *Trends in Genetics*, 11(1), 12-17.

Ryoo, D., Murphy, V. G., Karim, M. N., & Tengerdy, R. P. (1991). Evaporative temperature and moisture control in a rocking reactor for solid substrate fermentation. *Biotechnology techniques*, 5(1), 19-24.

Saboti, J., & Kos, J. (2012). Microbial and fungal protease inhibitors—current and potential applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(4), 1351-1375.

Sajith, S., Priji, P., Sreedevi, S., & Benjamin, S. (2016). An overview on fungal cellulases with an industrial perspective. *J Nutr Food Sci*, 6(1).

Samarntarn, W., Cheevadhanarak, S., & Tanticharoen, M. (1999). Production of alkaline protease by a genetically engineered *Aspergillus oryzae* U1521. *The Journal of general and applied microbiology*, 45(3), 99-103.

Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., & Pandey, A. (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process biochemistry*, 40(8), 2689-2694.

Sauer, J., Sigurskjold, B. W., Christensen, U., Frandsen, T. P., Mirgorodskaya, E., Harrison, M., ... & Svensson, B. (2000). Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543(2), 275-293.

Savitha, S., Sadhasivam, S., Swaminathan, K., & Lin, F. H. (2011). Fungal protease: production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42(2), 298-304.

Servili, M., Begliomini, A. L., Montedoro, G., Petruccioli, M., & Federici, F. (1992). Utilisation of a yeast pectinase in olive oil extraction and red wine making processes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 58(2), 253-260.

Shankar, S., More, S. V., & Laxman, R. S. (2010). Recovery of silver from waste X-ray film by alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. *Kathmandu university journal of science, engineering and technology*, 6(1), 60-69.

Sharma, A., Shrivastava, A., Sharma, S., Gupta, R., & Kuhad, R. C. (2013). Microbial pectinases and their applications. In *Biotechnology for Environmental Management and Resource Recovery* (pp. 107-124). Springer India.

Sharma, K. M., Kumar, R., Panwar, S., & Kumar, A. (2017). Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 115-126.

Shivanand, P., & Jayaraman, G. (2009). Production of extracellular protease from halotolerant bacterium, *Bacillus aquimaris* strain VITP4 isolated from Kumta coast. *Process Biochemistry*, 44(10), 1088-1094.

Simkhada, J. R., Cho, S. S., Park, S. J., Mander, P., Choi, Y. H., Lee, H. J., & Yoo, J. C. (2010). An oxidant-and organic solvent-resistant alkaline metalloprotease from *Streptomyces olivochromogenes*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 162(5), 1457-1470.

Sindhu, R., Suprabha, G. N., & Shashidhar, S. (2009). Optimization of process parameters for the production of  $\alpha$ -amylase from *Penicillium janthinellum* (NCIM 4960) under solid state fermentation. *African Journal of Microbiology Research*, 3(9), 498-503.

Singhal, P., Nigam, V. K., & Vidyarthi, A. S. (2012). Studies on production, characterization and applications of microbial alkaline proteases. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 3(3), 653-669.

Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2006).  $\alpha$ -Amylases from microbial sources—an overview on recent developments. *Food Technol Biotechnol*, 44(2), 173-184.

So, J. E., Shin, J. S., & Kim, B. G. (2000). Protease-catalyzed tripeptide (RGD) synthesis. *Enzyme and microbial technology*, 26(2), 108-114.

Soares, M. M. C. N., Da Silva, R., Carmona, E. C., & Gomes, E. (2001). Pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species and their potential application on juice extraction. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(1), 79-82.

Sodhi, H. K., Sharma, K., Gupta, J. K., & Soni, S. K. (2005). Production of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. *Process Biochemistry*, 40(2), 525-534.

Sohail, M., Ahmad, A., & Khan, S. A. (2016). Production of cellulase from *Aspergillus terreus* MS105 on crude and commercially purified substrates. *3 Biotech*, 6(1), 103.

Souza, P. M. D., Bittencourt, M. L. D. A., Caprara, C. C., Freitas, M. D., Almeida, R. P. C. D., Silveira, D., Fonseca Y. M.; Filho X. F., Junior A. P., Magalhães, P. O. (2015). A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 337-346.

Srinubabu, G., Lokeswari, N., & Jayaraju, K. (2007). Screening of nutritional parameters for the production of protease from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Chemistry*, 4(2), 208-215.

Stryer, L., (2003). *Biochemia*. PWN

Sudo, S., Ishikawa, T., Sato, K., & Oba, T. (1994). Comparison of acid-stable  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus kawachii* in solid-state and submerged cultures. *Journal of fermentation and biotechnology*, 77(5), 483-489.

Sun, S. Y., & Xu, Y. (2009). Membrane-bound 'synthetic lipase' specifically cultured under solid-state fermentation and submerged fermentation by *Rhizopus chinensis*: a comparative investigation. *Bioresour technol*, 100(3), 1336-1342.

Sundarram, A., & Murthy, T. P. K. (2014).  $\alpha$ -amylase production and applications: a review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2(4), 166-175.

Sutar, I. I., Srinivasan, M. C., & Vartak, H. G. (1992). Production of an alkaline proteinase from *Conidiobolus coronatus* and its use to resolve dl-phenylalanine and dl-phenylglycine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8(3), 254-258.

Szyszk, D. (2007). Wyniesienie mechaniczne ziaren poddanych flotacji wylczni e spieniaczem. *Górnictwo i Geoinżynieria*, 31, 81-86.

Thumar, J. T., & Singh, S. P. (2007). Secretion of an alkaline protease from a salt-tolerant and alkaliphilic, *Streptomyces clavuligerus* strain MIT-1. *Brazilian journal of Microbiology*, 38(4), 766-772.

Tochi, B. N., Wang, Z., Xu, S. Y., & Zhang, W. (2009). The

influence of a pectinase and pectinase/hemicellulases enzyme preparations on percentage pineapple juice recovery, particulates and sensory attributes. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8(8), 1184-1189.

Treichel, H., de Oliveira, D., Mazutti, M. A., Di Luccio, M., & Oliveira, J. V. (2010). A review on microbial lipases production. *Food and bioprocess technology*, 3(2), 182-196.

Van Den Burg, B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current opinion in microbiology*, 6(3), 213-218.

Vani tha, N., Rajan, S., & Murugesan, A. G. (2014). Optimization and production of alkaline protease enzyme from *Bacillus subtilis* 168 isolated from food industry waste. *International journal of current microbiology and applied sciences*, 3(6), 36-44.

Walczak, M., Burkowska, A., Swiontek Brzezinska, M., Kalwasi ska, A., (2013). *Podstawy mikrobiologii w praktyce*.

Wang, M., Li, Z., Fang, X., Wang, L., & Qu, Y. (2012).

Cellulolytic enzyme production and enzymatic hydrolysis for second-generation bioethanol production. In *Biotechnology in China III: Biofuels and Bioenergy* (pp. 1-24). Springer Berlin

Heidelberg.

Wang, R., Law, R. C. S., & Webb, C. (2005). Protease production and conidiation by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation. *Process Biochemistry*, 40(1), 217-227.

Wesolowska-Trojanowska, M., & Targonski, Z. (2014). Celulazy- wla ciwo ci, otrzymywanie i zastosowanie. *Nauki Inzynierskie i Technologie*, (2 (13)).

Willats, W. G., McCartney, L., Mackie, W., & Knox, J. P. (2001). Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant molecular biology*, 47(1-2), 9-27.

Yadav, S. K., Bisht, D., Shikha, S., & Darmwal, N. S. (2011). Oxidant and solvent stable alkaline protease from *Aspergillus flavus* and its characterization. *African Journal of Biotechnology*, 10(43), 8630-8640.

Yadav, S., Yadav, P. K., Yadav, D., & Yadav, K. D. S. (2009). Purification and characterization of pectin lyase produced by *Aspergillus terricola* and its application in retting of natural fibers. *Applied biochemistry and biotechnology*, 159(1), 270-283.

Zambare, V., Nilegaonkar, S., & Kanekar, P. (2011). A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: enzyme production and its partial characterization. *New biotechnology*, 28(2), 173-181.

Zanphorlin, L. M., Facchini, F. D. A., Vasconcelos, F., Bonugli - Santos, R. C., Rodrigues, A., Sette, L. D., ... & Bonilla - Rodriguez, G. O. (2010). Production, partial characterization, and immobilization in alginate beads of an alkaline protease from a new thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. *The Journal of Microbiology*, 48(3), 331-336.

Zanphorlin, L. M., Facchini, F. D. A., Vasconcelos, F., Bonugli - Santos, R. C., Rodrigues, A., Sette, L. D., ... & Bonilla - Rodriguez, G. O. (2010). Production, partial characterization, and immobilization in alginate beads of an alkaline protease from a new thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. *The Journal of Microbiology*, 48(3), 331-336.