

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

MILICA B. VELJKOVIĆ

**ENZIMSKA SINTEZA I MEMBRANSKO
PREČIŠĆAVANJE FRUKTO-OLIGOSAHARIDA**

doktorska disertacija

Beograd, 2025

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

MILICA B. VELJKOVIĆ

**ENZYMATIC SYNTHESIS AND MEMBRANE
PURIFICATION OF FRUCTO-OLIGOSACCHARIDES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2025

MENTORI:

Dr Dejan Bezbradica, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Milica Simović, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Mirjana Rajilić-Stojanović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Suzana Dimitrijević-Branković, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Milan Milivojević, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Darko Jaćimovski, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju,
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija urađena je na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju pod mentorstvom prof. dr Dejana Bezbradice i dr Milice Simović u okviru istraživanja finansiranih od strane Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije (br. 451-03-136/2025-03-200287) i nacionalnog projekta IDEJE pod nazivom „Prebiotics for functional food and bioactive cosmetics produced in intensified enzymatic processes“ (br. 7750109, PrIntPrEnzy), finansiranog od strane Fonda za nauku Republike Srbije. Deo istraživanja urađen je u Centru za zdravu ishranu i inovacije u hrani (Centre for Healthy Eating and Food Innovation) u Holandiji u okviru evropskog projekta pod nazivom „Twinning for intensified enzymatic processes for production of prebiotic containing functional food and bioactive cosmetics“ (ID 101060130, TwinPrebioEnz) finansiranog od strane Horizon Europe 2021-2027. Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije izveden je u laboratorijama na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju i Katedri za hemijsko inženjerstvo Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Želim da izrazim posebnu zahvalnost svom mentoru prof. dr Dejanu Bezbradici na prenetom znanju i angažovanju tokom izrade ove doktorske disertacije. Hvala Vam na konstruktivnim sugestijama koje su bile od neprocenjivog značaja u svim fazama istraživanja i koje su značajno doprinele mom akademskom usavršavanju.

Ogromnu zahvalnost na stručnim i dragocenim savetima, nesebičnom prenošenju znanja i posvećenosti tokom celokupnog procesa izrade ove doktorske disertacije dugujem i svojoj mentorki dr Milici Simović. Njen trud, pažljivo usmeravanje, temeljan i analitičan pristup u rešavanju istraživačkih izazova, otvorenost za diskusiju i podsticajni razgovori značajno su doprineli mom profesionalnom razvoju i oblikovanju naučnog pristupa. Veliko hvala na svemu!

Zahvaljujem se i prof. dr Mirjani Rajilić-Stojanović, na divnoj saradnji i prilici da steknem dragoceno iskustvo u radu sa studentima u okviru izvođenja eksperimentalnih vežbi i dodatno se razvijem u profesionalnom smislu, kao i na stručnim sugestijama, posebno u oblasti crevne mikrobiote. Zahvaljujem se i prof. dr Suzani Dimitrijević-Branković, prof. dr Milanu Milivojeviću i dr Darku Jaćimovskom na saradnji i stručnim smernicama koje su dodatno oblikovale i unapredile kvalitet ovog rada.

Najtoplije se zahvaljujem svojim dragim koleginicama iz istraživačkog tima dr Katarini Banjanac, Ani Vukoičić, dr Mariji Ćorović, dr Ani Milivojević i Katarini Katić na podršci, divnoj saradnji i timskom duhu, a posebno kolegini i prijateljici Anji Petrov Ivanković za sve ove godine saradnje, od samog upisa na fakultet pa sve do sada! Zajedno smo se suočavale sa izazovima i delile radost svakog uspeha. Hvala ti što si deo ovog putovanja!

Zahvaljujem se i kolegini Ani Bačić, na pomoći i posvećenosti oko bioinformatičke obrade i analize bioloških podataka, što je značajno doprinelo kvalitetu istraživanja i bilo ključno u donošenju važnih zaključaka.

Veliko hvala i svim kolegama i tehničarima sa Katedre za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju na divnom druženju i pomoći tokom svih ovih godina.

Od srca se zahvaljujem i svojim prijateljima na iskrenosti, podršci, motivaciji i ohrabrenju da istrajem. Hvala vam što ste me pratili kroz ovaj proces!

Na kraju, najveću zahvalnost na bezuslovnoj podršci, ljubavi i strpljenju tokom svih ovih godina dugujem svojoj porodici. Neizmerno vam hvala što ste uvek tu - kroz izazove i uspehe i što verujete u mene. Ovaj uspeh posvećujem i vama! Zauvek zahvalna na svemu!

Milica

Enzimaska sinteza i membransko prečišćavanje frukto-oligosaharida

SAŽETAK

U okviru ove doktorske disertacije razvijeni su postupci sinteze frukto-oligosaharida (FOS) primenom slobodne i imobilisane fruktoziltransferaze (FT) iz industrijskog preparata Pectinex® Ultra SP-L. Primenom slobodne FT i izborom optimalnih uslova dobijena je smeša koja sadrži 60,2 % FOS i sporedne proizvode poput saharoze i monosaharida. Radi razvijanja efikasnijih postupaka proizvodnje FOS koji podrazumevaju primenu imobilisanih preparata, FT je imobilisana na nosače različitih funkcionalnih karakteristika putem adsorpcije ili kovalentnog vezivanja. Posebno pogodnim pokazali su se nemodifikovani i epoksi-modifikovani Purolite® A109 nosač čijom je primenom omogućena selektivna imobilizacija FT, a time i delimično prečišćavanje preparata od drugih enzima. Imobilisani preparati su upotrebljeni za proizvodnju FOS u šaržnom i pneumatskom reaktorskom sistemu. S obzirom na njihovu izuzetnu operativnu stabilnost, razvijeni su i kontinualni procesi proizvodnje FOS. Dobijena smeša FOS podvrgnuta je i prečišćavanju primenom nanofiltracije sa dijafiltracijom. Izvođenjem ovog procesa pri izabranim optimalnim uslovima, dobijena je smeša čistoće 87,2 % FOS. Radi dodatnog unapređenja procesa prečišćavanja, primenjen je i membranski reaktor gde je simultanim izvođenjem sinteze FOS i prečišćavanja, nakon 9 h dobijena smeša sa 91,8 % FOS. Visokoprečišćena smeša FOS testirana je u *in vitro* TIM-2 sistemu koji uključuje primenu ljudske crevne mikrobiote i simulira procese varenja u debelom crevu, gde rezultati potvrđuju postojanje prebiotskog potencijala. Primenom stečenih znanja, razvijen je i funkcionalni proizvod izvođenjem *in situ* biokonverzije saharoze u FOS primenom FT i komercijalnog javorovog sirupa. Ovim pristupom dobijen je javorov sirup sa dodatom vrednošću, smanjenog kalorijskog sadržaja i poboljšanih funkcionalnih karakteristika uz zadržavanje standardnih parametara kvaliteta.

Ključne reči: frukto-oligosaharidi; prebiotici; fruktoziltransferaza; imobilizacija; nanofiltracija; reaktorski sistemi; javorov sirup; funkcionalni proizvodi

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

Enzymatic synthesis and membrane purification of fructo-oligosaccharides

ABSTRACT

As part of this doctoral dissertation, procedures for the synthesis of fructo-oligosaccharides (FOS) were developed using free and immobilized fructosyltransferase (FT) from the industrial preparation Pectinex® Ultra SP-L. By applying free FT under selected optimal conditions, a mixture containing 60.2 % FOS and by-products such as sucrose and monosaccharides. To develop a more efficient FOS production process that involves immobilized preparations, FT is immobilized on supports with different functional characteristics via adsorption or covalent binding. The unmodified and epoxy-modified Purolite® A109 support are considered particularly suitable supports, which enabled selective immobilization of FT, and thus partial purification of the preparation from other enzymes. The immobilized preparations were used for the FOS production in batch and air-lift reactor system. Considering their exceptional operational stability, continuous FOS production processes have been developed. The synthesized FOS mixture was subjected to purification using nanofiltration with diafiltration. By performing this process under the selected optimal conditions, a mixture with a purity of 87.2 % FOS was obtained. To improve the purification process, a membrane reactor was used, where the simultaneous execution of the FOS synthesis and purification resulted in a mixture with 91.8 % FOS after 9 h. The highly purified FOS mixture was tested in the *in vitro* TIM-2 system, which includes the application of human gut microbiota and simulates digestion processes in the large intestine, where the results confirm the existence of prebiotic potential. By applying the acquired knowledge, a functional product was developed by performing *in situ* bioconversion of sucrose into FOS using FT and commercial maple syrup. This approach resulted in a value-added maple syrup with reduced caloric content and improved functional characteristics while maintaining standard quality parameters.

Key words: fructo-oligosaccharides; prebiotics; fructosyltransferase; immobilization; nanofiltration; reactor systems; maple syrup; functional products

Scientific field: Technological engineering

Scientific subfield: Biochemical engineering and biotechnology

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DEO	3
2.1. Gastrointestinalna mikrobiota	3
2.1.1. Definicija i sastav crevne mikrobiote.....	3
2.1.2. Disbalans crevne mikrobiote i strategije prevencije	4
2.2. Prebiotici	5
2.2.1. Evolucija promene definicije prebiotika	5
2.2.2. Klasifikacija prebiotika	6
2.2.3. Uloga prebiotika u očuvanju zdravlja.....	8
2.3. Frukto-oligosaharidi (FOS)	11
2.3.1. Hemijska struktura.....	11
2.3.2. Prirodni izvori FOS.....	12
2.3.3. Načini dobijanja FOS.....	12
2.3.3.1. Ekstrakcija iz prirodnih izvora	12
2.3.3.2. Hemijski katalizovano dobijanje FOS.....	13
2.3.3.3. Enzimski katalizovano dobijanje FOS.....	13
2.3.4. Fizička svojstva i primena FOS.....	16
2.4. In vitro modeli gastrointestinalnog trakta za istraživanje prebiotika	19
2.4.1. Statički modeli.....	19
2.4.2. Dinamički modeli	20
2.4.3. In vitro modeli u analizi svarljivosti i prebiotske aktivnosti FOS.....	23
2.5. Enzimaska sinteza FOS	25
2.5.1. Izvor enzima.....	25
2.5.2. Mehanizam odvijanja reakcije	25
2.5.3. Uticaj reakcionih faktora.....	27
2.5.3.1. Uticaj pH i temperature	27
2.5.3.2. Uticaj početne koncentracije saharoze.....	28
2.5.3.3. Uticaj koncentracije enzima.....	28
2.5.4. Fruktoziltransferaze	29

2.5.4.1 Fruktoziltransferaza iz <i>Aspergillus aculeatus</i> -a	31
2.6. Sinteza FOS primenom imobilisanih enzima	34
2.6.1. Definicija i metode imobilizacije.....	34
2.6.1.1. Imobilizacija enzima na čvrst nosač	35
2.6.1.2. Obuhvatanje enzima nosačem	36
2.6.1.3. Unakrsno povezivanje enzima	36
2.6.2. Nosači za imobilizaciju.....	36
2.6.2.1. Karakteristike nosača za imobilizaciju.....	36
2.6.2.2. Podela nosača za imobilizaciju	38
2.6.3. Primeri primene imobilisanih enzima u sintezi FOS.....	39
2.7. Reaktorski sistemi za proizvodnju FOS	41
2.8. Separacija FOS.....	44
2.8.1. Prečišćavanje adsorpcijom	44
2.8.2. Prečišćavanje fermentacijom	45
2.8.3. Membranske separacione tehnike.....	45
2.8.3.1. Vrste membranskih konfiguracija.....	46
2.8.3.2. Vrste membrana za nanofiltraciju.....	47
2.8.3.3. Način izvođenja procesa nanofiltracije	48
2.8.3.4. Uticaj operativnih parametara na proces nanofiltracije	49
2.9. Membranski reaktor	52
2.10. Plan istraživanja	53
3. EKSPERIMENTALNI DEO.....	54
3.1. Materijali.....	54
3.2. Metode.....	57
3.2.1. Određivanje transfruktozilacione aktivnosti.....	57
3.2.2. Određivanje pektinolitičke aktivnosti	57
3.2.3. Određivanje proteina	58
3.2.3.1. Određivanje koncentracije proteina metodom po Loriju	58
3.2.3.2. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bredfordu	59
3.2.4. Određivanje koncentracije ugljenih hidrata HPLC metodom.....	60
3.2.5. Enzimaska sinteza FOS upotrebom slobodnog enzima.....	60
3.2.5.1. Parametri praćenja procesa enzimske sinteze FOS	60

3.2.6. Imobilizacija enzima.....	61
3.2.6.1. Modifikacije nanočestica za imobilizaciju.....	61
3.2.6.1.1. Modifikacija neporoznih nanočestica silike 3 - aminopropiltrimetoksisilanom (APTMS-om).....	61
3.2.6.1.2. Aktivacija amino-modifikovanih nanočestica silike cijanuril - hloridom	61
3.2.6.2. Priprema makroporoznih nosača za imobilizaciju.....	61
3.2.6.3. Modifikacije makroporoznih nosača za imobilizaciju.....	61
3.2.6.3.1. Modifikacija makroporoznog nosača upotrebom epihlorhidrina	61
3.2.6.3.2. Modifikacija makroporoznog nosača upotrebom glutaraldehida (GA)	62
3.2.6.4. Desorpcija enzima.....	62
3.2.6.5. Odredjivanje koncentracije amino grupa na površini nosača	62
3.2.6.6. Odredjivanje koncentracije epoksidnih grupa na površini nosača.....	62
3.2.6.7. Protokol i optimizacija imobilizacije FT	62
3.2.6.7.1. Protokol i optimizacija imobilizacije FT na nanočestice silike	62
3.2.6.7.2. Protokol i optimizacija selektivne imobilizacije FT na polimetakrilatne porozne nosače.....	63
3.2.6.7.3. Protokol i optimizacija selektivne imobilizacije FT na nemodifikovani makroporozni nosač.....	63
3.2.6.7.4. Protokol i optimizacija selektivne imobilizacije FT na epoksi- modifikovani makroporozni nosač	63
3.2.6.7.5. Protokol i optimizacija selektivne imobilizacije FT na GA- modifikovani makroporozni nosač.....	64
3.2.6.7.6. Protokol i optimizacija umrežavanja enzima upotrebom GA.....	64
3.2.6.8. Parametri procesa imobilizacije enzima.....	64
3.2.7. Termička stabilnost	64
3.2.8. Operativna stabilnost.....	65
3.2.9. Enzimaska sinteza FOS upotrebom imobilisanog enzima u šaržnom reaktorskome sistemu.....	65
3.2.10. Enzimaska sinteza FOS upotrebom imobilisanog enzima u pneumatskom (air -lift) reaktorskome sistemu.....	65
3.2.11. FTIR analiza	66
3.2.12. Prečišćavanje dobijene smeše FOS	66

3.2.12.1. Priprema smeše FOS za prečišćavanje.....	66
3.2.12.2. Aparatura za izvođenje procesa prečišćavanja	67
3.2.12.3. Protokol i optimizacija procesa prečišćavanja	67
3.2.12.4. Parametri procesa prečišćavanja.....	68
3.2.13. Enzimaska sinteza FOS i prečišćavanje u membranskom reaktoru	69
3.2.14. Ispitivanje rasta mikroorganizma i određivanje standardne prave.....	69
3.2.15. Ispitivanje prebiotske aktivnosti proizvoda na pripadnike crevne mikrobiote	70
3.2.16. Ispitivanje uticaja prečišćene smeše FOS na pripadnike crevne mikrobiote upotrebom <i>in vitro</i> TIM-2 modela.....	71
3.2.16.1. Protokol pripreme rastvora za izvođenje eksperimenata na TIM-2 modelu.....	71
3.2.16.2. Priprema fekalnog inokuluma.....	72
3.2.16.3. Protokol izvođenja eksperimenata na TIM-2 modelu	72
3.2.16.4. Analiza uzoraka dobijenih sa TIM-2 modela	72
3.2.16.4.1. Statistička analiza uzoraka dobijenih sa TIM-2 modela.....	73
3.2.16.4.2. Analiza kratkolančanih masnih kiselina.....	73
3.2.17. Enzimaska sinteza FOS u javorovom sirupu	74
3.2.17.1. Određivanje fizičko-hemijskih karakteristika javorovog sirupa.....	74
3.2.17.2. Senzorna analiza	74
3.2.17.3. Ispitivanje prebiotske aktivnosti modifikovanog javorovog sirupa na pripadnike crevne mikrobiote.....	74
3.2.17.4. Određivanje sadržaja polifenola.....	74
3.2.17.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti	75
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	76
4.1. Selekcija komercijalnog enzimskog preparata	76
4.2. Enzimaska sinteza FOS sa slobodnim enzimom	77
4.2.1. Uticaj pH i temperature	78
4.2.2. Uticaj koncentracije enzima	80
4.2.3. Uticaj koncentracije supstrata.....	81
4.3. Enzimaska sinteza FOS sa imobilisanim enzimom.....	85
4.3.1. Imobilizacija FT na nanočestice silike	85
4.3.2. Selektivna imobilizacija FT na Purolite Lifetech™ nosače.....	91

4.3.2.1. Optimizacija imobilizacije FT na ECR8409F Lifetech™ nosač.....	91
4.3.2.2. Optimizacija imobilizacije FT na ECR8285F Lifetech™ nosač.....	96
4.3.3. Imobilizacija FT na Purolite® A109 nosač.....	101
4.3.3.1. Optimizacija selektivne imobilizacije FT na Purolite® A109 nosač.....	101
4.3.3.2. Primena imobilisanog preparata FT na nosač Purolite® A109 u šaržnom i pneumatskom reaktoru	104
4.3.4. Imobilizacija FT na modifikovane nosače Purolite® A109.....	107
4.3.4.1. Optimizacija selektivne imobilizacije FT na GA-aktivirane nosače Purolite® A109	107
4.3.4.1.1. GA - aktivirani nosač Purolite® A109 (monomerni oblik).....	108
4.3.4.1.2. GA - aktivirani nosač Purolite® A109 (dimerni oblik).....	110
4.3.4.2. Optimizacija selektivne imobilizacije FT na epoksi - aktiviran Purolite® A109 nosač	113
4.3.4.3. Sinteza FOS primenom imobilisane FT na modifikovane Purolite® A109 nosače	117
4.3.5. Primena imobilisanog preparata FT na epoksi-aktivirani nosač Purolite® A109 u šaržnom i pneumatskom reaktoru.....	118
4.3.6. Ispitivanje termičke stabilnosti imobilisanih preparata	120
4.3.7. Sumiranje rezultata imobilizacije FT i dalje perspektive	122
4.4. Prečišćavanje dobijene smeše FOS nanofiltracijom	125
4.4.1. Selekcija membrane za nanofiltraciju FOS	125
4.4.2. Uticaj temperature na proces prečišćavanja FOS	127
4.4.3. Uticaj protoka permeata na proces prečišćavanja FOS	128
4.4.4. Uticaj koncentracije napojne smeše na proces prečišćavanja FOS.....	130
4.4.5. Prebiotski potencijal prečišćene smeše	131
4.5. Procena prebiotskog potencijala prečišćene smeše u <i>in vitro</i> TIM-2 modelu.....	133
4.5.1. Alfa i beta diverzitet.....	133
4.5.2. Analiza mikrobnog sastava	136
4.5.3. Analiza kratkolančanih masnih kiselina.....	141
4.6. Simultana sinteza i prečišćavanje FOS u membranskom reaktoru.....	144
4.7. <i>In situ</i> primena fruktoziltransferaze za dobijanje javorovog sirupa obogaćenog FOS.....	147

4.7.1. Optimizacija modifikacije javorovog sirupa primenom slobodne FT	147
4.7.2. Modifikacija javorovog sirupa primenom imobilisanih preparata FT i procena operativne stabilnosti.....	149
4.7.3. Karakterizacija nemodifikovanog i modifikovanog javorovog sirupa	151
5. ZAKLJUČAK	156
LITERATURA	159

1. UVOD

Poslednjih decenija vlada sve veći interes i potražnja za hranom čijom se konzumacijom obezbeđuju ne samo osnovne hranljive materije neophodne za normalno funkcionisanje ljudskog organizma, već i dodatan pozitivan efekat na zdravlje [1]. Novorazvijeni proizvodi sa raznovrsnim sastavom moćnih bioaktivnih jedinjenja (prebiotici, omega-3 masne kiseline i dr.) ili živih mikroorganizama (probiotici) u odgovarajućoj koncentraciji poseduju posebna svojstva i deklarišu se kao funkcionalna hrana [2].

Prebioticima je zbog njihovog višestrukog značaja za gastrointestinalni trakt (u nastavku GIT), ali i za ceo organizam posvećena ogromna pažnja. Ova strukturno različita funkcionalna jedinjenja među kojima dominiraju komponente ugljeno-hidratne prirode obezbeđuju brojne prednosti po ljudsko zdravlje, a koriste se i kao funkcionalni zaslađivači pogodni i za dijabetičare [3]. Takođe, naučno je dokazano da mogu pozitivno uticati i na fizička svojstva samih proizvoda u kojima se inkorporiraju. Evidentne prednosti upotrebe prebiotika kao funkcionalnih sastojaka potpuno opravdavaju ogromno interesovanje proizvođača i potrošača.

Iako su do sada prijavljeni različiti prebiotici sa značajnim industrijskim potencijalom, u ovoj doktorskoj disertaciji će pažnja biti usmerena na frukto-oligosaharide (u nastavku FOS). Ovi potvrđeni prebiotici pored brojnih fizioloških prednosti za ljudski organizam, se smatraju i niskokaloričnim i nekariogenim komponentama čiji je stepen slasti neznatno niži u poređenju sa konvencionalnim šećerom - saharozom. Upravo iz tog razloga predstavljaju perspektivne konkurente konzumnog šećera, a ujedno pronalaze i primenu u proizvodima za dijabetičare. Mogu se primeniti kao adekvatna šećerna zamena u brojnim prehrambenim proizvodima (sok, džem, bombone i dr.) kreirajući na taj način proizvode manje kalorijske, a veće funkcionalne vrednosti zbog čega se i pristupa njihovoj proizvodnji u industrijskim razmerama [4, 5]. Međutim, povećano interesovanje za ovim prebioticima zahteva i razvijanje efikasnijih procesa proizvodnje. FOS se mogu proizvesti na razne načine, s tim da se smatra da je dobijanje ovih oligosaharida enzimskim putem, koji uključuje primenu saharoze i enzima fruktoziltransferaze (u nastavku FT), veoma isplativ i efikasan proces kojim se može postići masovna produkcija [6].

Prema tome, cilj ove doktorske disertacije jeste unapređenje i razvijanje novih postupaka dobijanja FOS iz saharoze primenom FT. U početnoj fazi istraživanja, najpre je ispitana primena slobodnog enzima za sintezu FOS korišćenjem različitih komercijalnih enzimskih preparata (Pectinex® Ultra SP-L, Viscozyme® L i Viscoflow™). Nakon selekcije najefikasnijeg enzimskog preparata, izvedena je detaljna optimizacija ključnih procesnih parametara (pH, temperatura, koncentracija supstrata i enzima kao i vreme reakcije) u cilju razvijanja što efikasnijeg tehnološkog postupka proizvodnje FOS.

Proces biotransformacije se može izvoditi i u kompleksnim supstratima prehrambene industrije, gde nakon završetka reakcije enzim ostaje u finalnom proizvodu bez mogućnosti ponovne upotrebe. Radi prevazilaženja ovog nedostatka, različitim imobilizacionim tehnikama koje uključuju fiksiranje enzima za različite nosače, može se dobiti enzimski preparat koji ne samo da se po izvođenju reakcije može višekратно upotrebiti, već i omogućiti realizaciju kontinualnih procesa proizvodnje FOS [7, 8]. S tim u vezi, naredna faza istraživanja bila je usmerena ka razvoju različitih strategija imobilizacije FT na različite nosače u rasponu od nano, mikro i makro dimenzija, radi dobijanja imobilisane FT povećane aktivnosti i stabilnosti. Prilikom izvođenja detaljne optimizacije procesa imobilizacije istraživanjem uticaja pH, koncentracije enzima i vremena izlaganja enzima nosaču, u ovoj doktorskoj disertaciji ispitana je i dodatna funkcija procesa imobilizacije - funkcija delimičnog prečišćavanja. Imajući na umu da primenjeni komercijalni preparati sadrže FT u vrlo malim koncentracijama, kao i da dominiraju pretežno hidrolitički enzimi (pektinaze, celulaze ili hemicelulaze), u ovom delu

istraživanja fokus je bio usmeren ka selektivnoj imobilizaciji željenog enzima (FT) iz kompleksnog preparata. Ovaj pristup ima za cilj dobijanje imobilisanog preparata pogodnog za konverziju širokog spektra voćnih supstrata bogatih saharozom bez neželjenih promena funkcionalnih svojstava usled delovanja hidrolitičke aktivnosti pektinaza.

Pored razvoja različitih strategija imobilizacije FT i detaljne optimizacije procesa kojim se mogu dodatno unaprediti performanse imobilisanog preparata, istraživanja su bila usmerena i ka potencijalnoj primeni imobilisane FT u različitim reaktorskim konfiguracijama radi produkcije smeše bogate FOS. Takođe, razvoj kontinualnih postupaka proizvodnje FOS u reaktorskim sistemima će omogućiti i intenzifikaciju procesa enzimske sinteze radi dalje perspektivne implementacije u industrijskim uslovima.

Imajući u vidu da postupkom enzimske sinteze, pored ciljanih prebiotika sastavni deo smeše čine i komponente koje ne poseduju prebiotski efekat (neproreagovala saharoza, glukoza i fruktoza), naredna faza istraživanja bila je usmerena ka prečišćavanju dobijene smeše membranskim separacionim tehnikama. U vezi sa tim, testirane su membrane za nanofiltraciju sa različitom distribucijom veličine pora, a ispitan i uticaj različitih radnih parametara (temperatura, protok i koncentracija napojne smeše) na celokupan proces prečišćavanja radi dobijanja finalnog proizvoda visokog stepena čistoće. Dobijanje proizvoda sa visokim udelom individualnih FOS dovodi ne samo do povećanja njegove tržišne vrednosti, već i do proširene mogućnosti primene. Takođe, istraživanja u okviru ove faze bila su usmerena i ka razvoju simultanih procesa enzimske sinteze i prečišćavanja korišćenjem membranskog reaktora čija bi uspešna realizacija dodatno povećala efikasnost procesa, a ujedno zadovoljila i veću tržišnu potražnju.

Kako je uključivanje prebiotika u ishranu pojedinaca od velike važnosti za promociju zdravlja [9] usled njihovog doprinosa u održavanju uravnotežene mikrobiote creva [10], u okviru ove doktorske disertacije, dalja istraživanja bila su usmerena ka testiranju visokoprečišćene smeše FOS u dinamičkom *in vitro* modelu debelog creva (TIM-2) radi detaljnijeg utvrđivanja prebiotskog potencijala primenom crevne mikrobiote zdravih donora. Iako su FOS potvrđeni prebiotici, istraživanja su bila fokusirana ka bližem definisanju crevnih mikroba koji fermentišu pomenute oligosaharide, kao i na utvrđivanju produkata fermentacije, s obzirom da su pomenute informacije pretežno nepoznate.

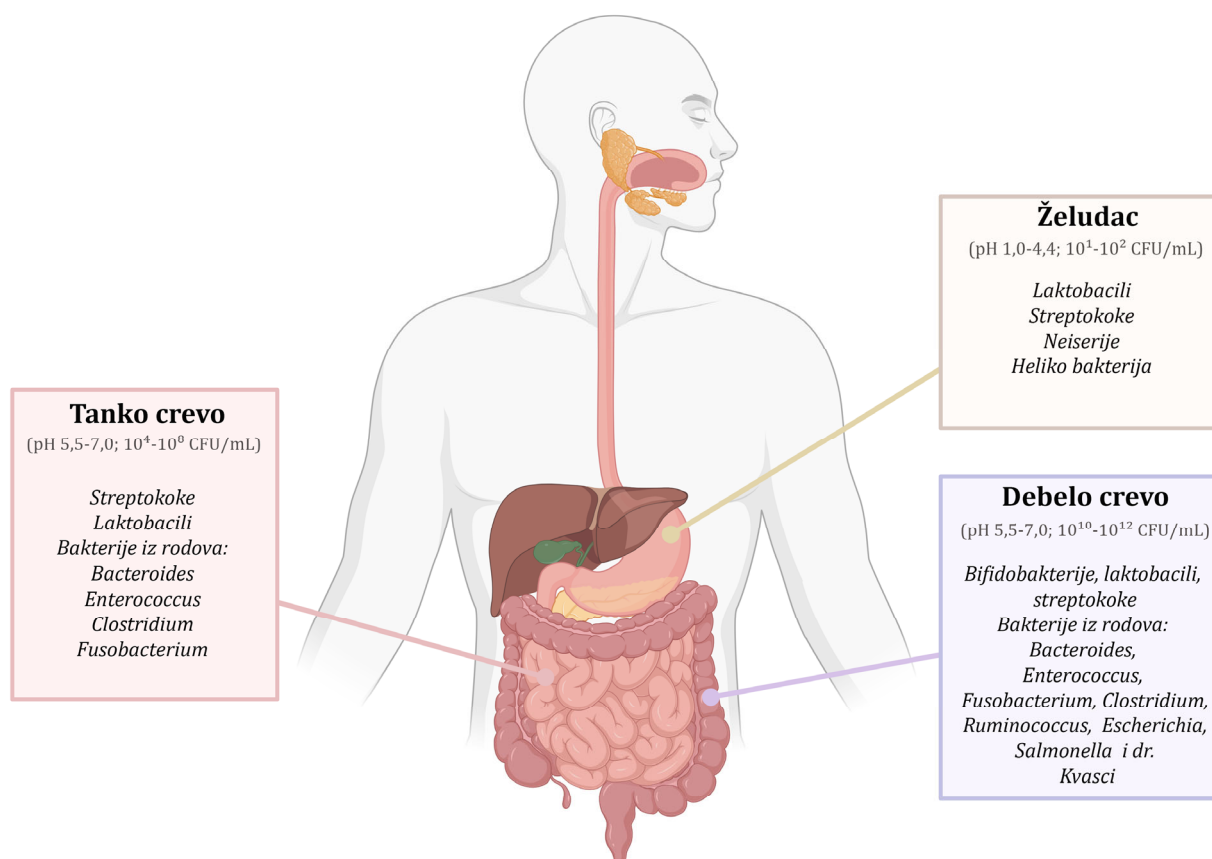
U poslednjoj fazi, pored dobijanja proizvoda visoke čistoće FOS koji može biti u formi sirupa ili praha u zavisnosti od svrhe upotrebe, istraživanja su bila fokusirana i na razvoju drugih funkcionalnih proizvoda bogatih FOS. U tu svrhu, zbog visoke koncentracije saharoze, javorov sirup je primenjen kao polazna matrica za dobijanje funkcionalnog proizvoda sa visokim sadržajem prebiotika (FOS), smanjenim sadržajem saharoze i originalnim sadržajem inicijalnih komponenti poput vitamina, minerala i polifenola. Stoga, kako je osnovni cilj razvoj efikasnog procesa sinteze FOS, najpre je izvedena *in situ* enzimska konverzija prisutne saharoze primenom slobodne FT, a potom radi potencijalnog poboljšanja efikasnosti procesa, ispitana je i primena imobilisane FT.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. Gastrointestinalna mikrobiota

2.1.1. Definicija i sastav crevne mikrobiote

Ljudsko telo predstavlja idealno područje za koezistiranje nevidljivog carstva mikroorganizama. Termin „mikrobiota“ se koristi za opisivanje svih prisutnih živih mikroorganizama (bakterija, gljiva, virusa) u nekom eko-sistemu [11]. Kod čoveka, oni naseljavaju različita područja u ljudskom telu poput creva, usne duplje, kože, pluća i urogenitalnog trakta, a za definisanje populacije određenog okruženja, pomenutom terminu uglavnom prethodi i lokacija, pa se stoga za bliže definisanje koriste pojmovi „crevna mikrobiota“, „oralna mikrobiota“ itd [11, 12]. Često se u naučnom diskursu termin „mikrobiota“ zamenjuje terminom „mikrobiom“ iako postoje značajne razlike između ova dva pojma. Mikrobiom je kompleksniji od mikrobiote, jer ne definiše samo mikroorganizme već i njihovu aktivnost. Naime, ovaj termin se odnosi na mikroorganizme, označavanje gena svih mikroorganizama, ali i na uslove životne sredine [11-13]. Zanimljivo je naglasiti da je prema navodima iz naučne literature ukupni genski sadržaj mikrobiote 150 puta veći od ljudskog genoma [14].



Slika 2.1. Raspodela prisutnih mikroorganizama po različitim segmentima GIT. Slika je kreirana u programu BioRender na osnovu podataka iz izvora [14-16]

Među pomenutim regijama koje naseljavaju različiti mikrobi, gastrointestinalni trakt (u nastavku GIT) predstavlja najkolonizovanije područje u kojem žive trilion mikroorganizama i smatra se esencijalnim za održavanje zdravlja svakog pojedinca [11]. Nekoliko bakterijskih tipova poput *Bacillota* (stari naziv *Firmicutes*), *Bacteroidota* (stari naziv *Bacteroidetes*),

Pseudomonadota (stari naziv *Proteobacteria*), *Actinomycetota* (stari naziv *Actinobacteria*), *Verrucomicrobiota* i *Fusobacteriota* (stari naziv *Fusobacteria*) predstavljaju dominantne stanovnike crevne mikrobiote od kojih tip *Bacillota* i *Bacteroidota* čine 90 % crevne populacije [11, 17].

Nedavne studije su saopštile da je na osnovu primenjenih molekularnih metoda za određivanje bakterijskog sastava ljudskog creva otkriveno više od 3000 bakterijskih vrsta [18]. Takođe, u ljudskoj crevnoj mikrobioti registrovano je i prisustvo gljiva (*Candida*, *Saccharomyces*, *Cladosporium* i *Malassezia*), virusa, faga i arheja [11]. Heterogeni sastav mikrobiote varira u zavisnosti od anatomske regije GIT (želudac, tanko i debelo crevo) zbog neujednačenih uslova sredine (pH, vreme zadržavanja hrane, dostupnost kiseonika, prisustvo kiselina itd.) (slika 2.1) [19]. Dugo se verovalo da je želudac zbog prisustva želudačnih kiselina i peristaltike nepogodan za razvoj bilo kakvih mikroorganizama, dok 1981. godine, jedan od najprestižnijih svetskih akademskih časopisa iz polja medicine „The Lancet“ nije objavio studije koje su izvestile o postojanju velikog broja rezistentnih sojeva streptokoka, neiserija i laktobacila [20]. Prvo je prijavljeno da je ljudski želudac naseljen mikrobima koji dolaze iz usne duplje ili unete hrane [14]. Izazovnije područje zbog izrazito niskog pH i kratkog vremena zadržavanja hrane (3-5 h) jeste tanko crevo koje zbog visoke dostupnosti kiseonika omogućava rast fakultativnih anaeroba [17, 19]. U poređenju sa tim, debelo crevo odlikuju blago kiseli i neutralni uslovi sredine, kao i duže vreme zadržavanja hrane. Iako ovu regiju karakteriše gusta naseljenost mikroba, usled odsustva kiseonika dominiraju pretežno anaerobne vrste [19]. Pored područja koja mikroorganizmi naseljavaju, na varijabilnost kompozicije mikrobiote utiču različiti faktori poput godina starosti, geografskog porekla, hrane, načina života, upotrebe lekova i dr [16, 21].

2.1.2. Disbalans crevne mikrobiote i strategije prevencije

Sastav normalne i zdrave mikrobiote creva još uvek nije eksplicitno definisan, ali ga svakako karakteriše značajno veći broj korisnih mikroorganizama (uglavnom laktobacili i bifidobakterije, kao i mikroorganizmi iz rodova *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* i *Saccharomyces*) u poređenju sa patogenim (uglavnom iz rodova *Clostridium*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia* i *Staphylococcus*) [22, 23]. Ovako dinamičan i složen ekosistem je esencijalan za zdravlje domaćina zbog brojnih uloga koje mikroorganizmi imaju uključujući varenje hrane, regulaciju imuniteta, zaštitu od patogena, proizvodnju vitamina i drugih metabolita [21, 24]. Međutim, isto tako u ovakvoj zajednici veoma lako može doći do promene u sastavu mikrobiote tako da korisne bakterije ne mogu uspešno da kontrolišu patogene što se odražava kao disbioza čime se ostvaruju negativne posledice po ljudsko zdravlje [25]. Do ovog stanja neujednačenosti tj. disbalansa može doći usled promena u načinu ishrane, higijenskih navika, primene antibiotika, stresa i dr. [26, 27] Naučno je potvrđeno da konzumacija hrane utiče na mikrobni diverzitet [28], kao i da je bogatiji sastav mikroba karakterističan za one koji konzumiraju raznovrsnu hranu bogatu vlaknima, hranljivim materijama sa uravnoteženim odnosom proteina, ugljenih hidrata i masti u poređenju sa onima koji se hrane pretežno brzom hranom [28, 29]. Takođe, primena antibiotika izrazito narušava balans crevne mikrobiote rezultirajući smanjenjem broja i raznovrsnosti mikroba, a vreme trajanja oporavka nakon njihovog delovanja zavisi od pojedinca [19]. Poremećaj u sastavu je usko povezan ne samo sa crevnim problemima poput nadimanja, bola u stomaku i dijareje, već i sa inflamatornim bolestima creva (ulcerozni kolitis i Kronova bolest), kardiovaskularnim bolestima, gojaznošću, dijabetesom, artritisom, astmom i dr. [26, 30, 31] Nedavne studije na ovom polju navode da je izmenjena mikrobiota creva u uskoj korelaciji i sa psihičkim stanjima poput anksioznosti i depresije [30, 32]. I dalje je upitno da li je promena crevne mikrobiote uzrok ili posledica raznih bolesti [26], ali je svakako sve izvesnije da je razvoj bolesti povezan sa crevnom mikrobiotom, kao i sa metaboličkim proizvodima i imunološkim odgovorom domaćina [30].

Do sada su primenjivane različite strategije radi prevencije ili lečenja bolesti povezanih sa disbiozom mikrobiote, a one uključuju primenu probiotika, prebiotika ili transplantaciju fekalne mikrobiote [33].

Dostupne kliničke studije sugerišu da je transplantacija fekalne mikrobiote kojom se direktno obezbeđuje prenošenje ekosistema iz donora primaocu radi promene sastava crevne mikrobiote, do sada veoma uspešno upotrebljena za lečenje upornih infekcija izazvanih patogenom vrstom *Clostridium difficile* [34], dok su istraživanja o dodatnim upotrebama ove metode u toku. Potencijalnim terapijskim tretmanima u cilju regulacije disbalansa, a posledično i omogućavanja normalnog funkcionisanja crevnog ekosistema, smatra se upotreba pro- i prebiotika o čemu i svedoči određen broj dostupnih studija.

Na osnovu revidirane definicije od strane međunarodnog naučnog udruženja za probiotike i prebiotike (*eng. International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, ISSAP*), probiotici su definisani kao „živi mikroorganizmi koji primenjeni u odgovarajućim količinama, pružaju zdravstvenu korist domaćinu“ [35]. Naime, oni doprinose obnavljanju mikrobiote creva nakon tretmana antibioticima, utiču na supresiju rasta patogenih vrsta, omogućavaju produkciju vitamina B grupe, povećavaju delotvornost imunog sistema domaćina i dr. Sastavni su deo farmaceutskih kao i pojedinih prehrambenih proizvoda [22]. Kao alternativa probioticima ili u kombinaciji sa njima, mogu se koristiti prebiotici. Prebiotici su definisani kao „supstrati koje selektivno koriste mikroorganizmi domaćina u njegovu zdravstvenu korist“ [36]. Ove komponente obezbeđuju selektivan uticaj na rast različitih autohtonih crevnih mikroba, čime se zaobilazi potreba za nadmetanjem među mikroorganizmima oko izvora energije. U poređenju sa probioticima, prebiotici mogu biti sastavni deo širokog asortimana prehrambenih proizvoda, a karakteriše ih i dugoročna stabilnost, otpornost na procese prerade kao i pozitivan uticaj na organoleptička svojstva proizvoda. Takođe, odlikuju ih i druge povoljne osobine koje se ostvaruju njihovom konzumacijom, uključujući otpornost na kiseline, žučne soli i enzime u organizmu, što ih čini dodatno pogodnim za primenu u ovim proizvodima [22]. Ova jedinjenja su nekariogena i niskokalorična pa ih mogu koristiti i osetljive grupe potrošača.

Imajući u vidu sve pozitivne efekte korišćenja prebiotika, oni poslednjih godina predstavljaju veoma atraktivnu oblast istraživanja zbog svoje značajne uloge u debelom crevu, ali i celokupnom ljudskom organizmu. Stoga, u okviru ove doktorske disertacije, čiji je jedan od osnovnih ciljeva razvijanje različitih načina proizvodnje prebiotika, ovim bioaktivnim komponentama će u nastavku biti posvećeno posebno poglavlje.

2.2. Prebiotici

2.2.1. Evolucija promene definicije prebiotika

Saznanje da određeni hranljivi sastojci mogu da modifikuju crevnu mikrobiotu je postojalo mnogo pre nego što su predložene definicije za takve hranljive materije [37]. Još 1950-ih godina, Giorgi i saradnici su ustanovili da komponenta ljudskog mleka, N-acetil-glukozamin, pospešuje rast bifidobakterija i deklarirali je kao „bifidogeni faktor“. Tokom 1970-ih godina, japanski istraživači su vršili brojna ispitivanja koja su podrazumevala upotrebu određenih oligosaharida i takođe izvestili da im se može pripisati funkcija bifidogenog faktora [38]. Pomenuta istraživanja su otvorila nov pristup u daljem ispitivanju sastava i funkcije crevne mikrobiote i uticaja različitih jedinjenja na crevnu mikrobiotu.

Termin „prebiotik“ je prvi put uveden 1995. godine od strane Gibsona i Roberfroida koji su u svojoj naučnoj publikaciji prebiotike definisali kao "nesvarljive sastojke koji selektivno stimulišu rast i/ili aktivnosti jedne ili ograničenog broja bakterija u debelom crevu, poboljšavajući na taj način zdravlje domaćina" [39].

Međunarodno naučno udruženje za prebiotike i probiotike (ISAPP) je 2010. godine revidiralo definiciju i prebiotike definisalo kao "selektivno fermentisane sastojke koji dovode do određenih promena u sastavu i/ili aktivnosti gastrointestinalne mikrobiote, pozitivno utičući na zdravlje domaćina". Ovom definicijom su zanemarena ograničenja u broju bakterija i izvršena proširenja njihovog mesta delovanja - sa debelog creva na celi GIT [39].

Međutim, termin "prebiotik" se dalje revidirao kako bi odražavao naučne promene koje produbljuju razumevanje i percepciju o važnosti mikrobiote i uticaju ishrane na zdravlje domaćina [40]. Kako se koncept prebiotika razvijao tako se razvijala i njihova primena i na vanintestinalnim mestima poput kože, vaginalnog trakta, usne duplje, pluća i dr. [36]

U poslednjoj deceniji otkriveno je da prebiotici mogu uticati i na potpuno različite i neočekivane članove mikrobiote. Utvrđeno je da neki od organizama u crevima, među kojima su *Faecalibacterium prausnitzii* i *Akkermansia muciniphila*, reaguju na specifične prebiotike. U skladu sa tim, Bindels i sar. su 2015. godine predložili da prebiotik treba definisati kao "nesvarljivo jedinjenje koje svojim metabolisanjem od strane mikroorganizama u crevima modulira sastav i/ili aktivnost crevne mikrobiote pružajući povoljan fiziološki efekat na domaćina". Predloženom definicijom se uklanja zahtev za selektivnost i specifičnost i ograničava interakcija prebiotika sa crevnom mikrobiotom isključujući vanintestinalna mesta [36]. Naglašava se funkcionalni efekat prebiotika na mikrobiotu otvarajući put ka istraživanju onih članova mikrobiote koji do tada nisu proučavani [39].

Prema stavovima brojnih autora da predstavljeni prebiotički koncept zahteva dodatna pojašnjenja, potreba za definicijom konsenzusa je bila evidentna. Stoga, 2016. godine, na panel diskusiji je grupa stručnih lica koja je ISAPP sazvaio, razvila trenutnu naučnu definiciju prema kojoj je prebiotik "*supstrat koji selektivno koriste mikroorganizmi domaćina u njegovu zdravstvenu korist*". Ovako predstavljen koncept uključuje komponentu, mehanizam i fiziološki efekat [36] bez ograničenja o mestu interakcije. Usled velikog interesovanja nauke i postojanja novih istraživanja, i trenutna naučna definicija je podložna promenama, pa tako pojedine istraživačke grupe navode da prebiotici ne moraju biti samo nedigestibilni, već nedigestibilni ili delimično digestibilni [41].

2.2.2. Klasifikacija prebiotika

Najnovija definicija prebiotika otvara brojne mogućnosti, jer isključuje ograničenje o mestu interakcije supstrata i mikroorganizma. Međutim i dalje je usmerena velika pažnja ka najkolonizovanijem i najistraženijem području tj. GIT kao aktivnom mestu delovanja prebiotika, ne samo zbog brojnih zdravstvenih benefita koji se ovim putem ostvaruju, već i zbog ogromnog interesovanja prehrambene i farmaceutske industrije.

Prema tome, da bi neka komponenta bila klasifikovana kao prebiotik čije je aktivno mesto delovanja GIT, potrebno je da ispunjava nekoliko osnovnih kriterijuma koji moraju biti potvrđeni *in vitro* i *in vivo* testovima [22, 42]:

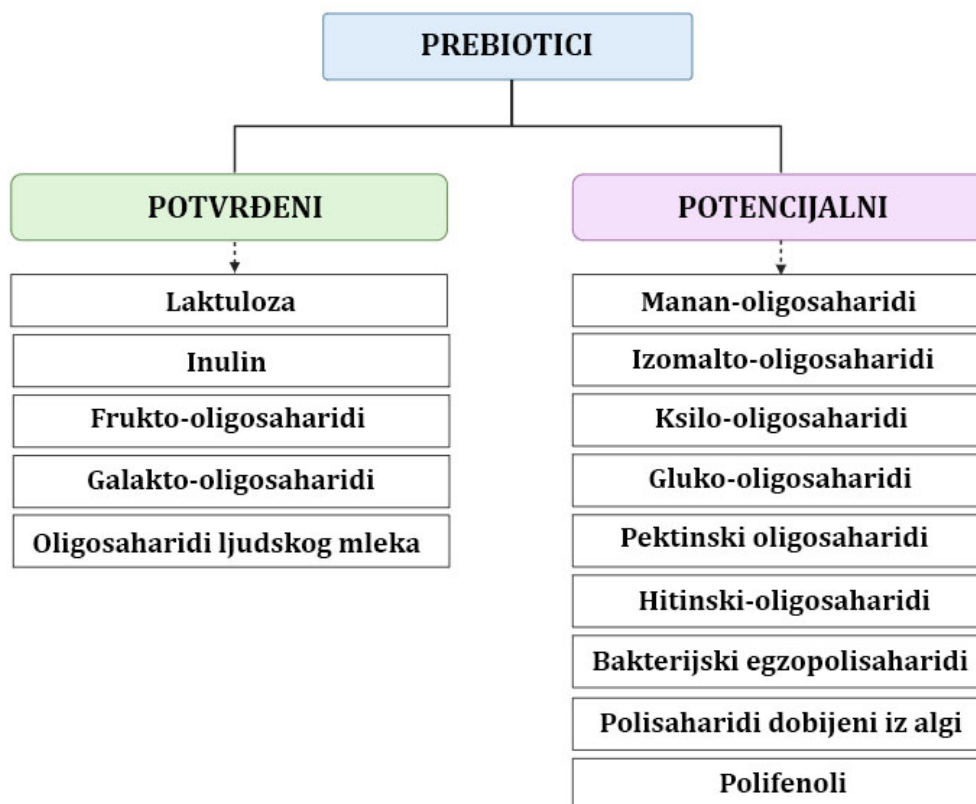
- 1) **Otpornost na digestivne procese u gornjem delu GIT**
- 2) **Fermentacija od strane intestinalne mikrobiote**
- 3) **Blagotvorno dejstvo na zdravlje domaćina**
- 4) **Selektivna stimulacija rasta intestinalnih mikroba**
- 5) **Stabilnost u različitim uslovima obrade hrane**

Prema prethodnim kriterijumima, prebiotici predstavljaju supstance koje su u stanju da izdrže probavne procese u gornjim segmentima GIT tj. rezistentne su na kiselost želuca, hidrolizu enzimima i na apsorpciju u tankom crevu, pa stoga nepromenjene ili delimično promenjene dolaze do debelog creva [42]. U debelom crevu ih selektivno fermentišu prisutni korisni mikrobi obezbeđujući niz pozitivnih efekata koji promovišu zdravlje pojedinca (produkcija kratkolančanih masnih kiselina (*eng. Short-Chain Fatty Acids*, SCFA), smanjenje pH, unapređenje imunog sistema i dr.). U direktnoj korelaciji sa zdravstvenim ishodom je još jedan važan kriterijum koji se odnosi na sposobnost prebiotika da selektivno podrži rast korisnih intestinalnih mikroorganizama u odnosu na druge prisutne organizme. Takođe, da bi određene komponente (prebiotici) bile upotrebljene kao funkcionalni sastojci hrane, moraju pokazati hemijsku stabilnost na različite tretmane obrade (toplota, nizak pH, uslovi Majardove reakcije). Literaturni podaci navode na saznanje da ukoliko i dođe do nekih hemijskih promena nakon uslova obrade, funkcionalna aktivnost prebiotika može ostati ista ili čak i poboljšana [22, 42]. Pomenuti kriterijumi pružaju osnovu za svrstavanje brojnih komponenti u prebiotike, ali i za adekvatan izbor radi njihove dalje potencijalne primene.

Kako brojna jedinjenja ispunjavaju prethodno navedene kriterijume, većina identifikovanih prebiotika pripada grupi ugljenih hidrata [42]. Neophodno je naglasiti da se ne smatraju svi ugljeni hidrati prebioticima, jer su neki od njih podložni digestiji u gornjim segmentima intestinalnog trakta, po čemu se i razlikuje njihov metabolički put u organizmu [43]. Naime, hrana koja je bogata ugljenim hidratima koji podležu digestiji (skrob, saharoza i dr.), dospeva do tankog creva gde pomenute komponente učestvuju u procesu varenja i apsorpcije delovanjem digestibilnih enzima koji ih prevode u monosaharide. Dobijeni monosaharidi se razgrađuju i izlučuju u vidu ugljen-dioksida izdisajem ili putem urina. Sa druge strane, postoje i oni ugljeni hidrati koji dospevaju do debelog creva bez prethodne razgradnje i tek u debelom crevu ulaze u proces fermentacije i apsorpcije. U ovom procesu, korisni crevni mikroorganizmi, ih koriste za rast, a kao proizvod metabolizma oslobađaju različite produkte (SCFA, gasove, alkohole itd) [43]. Upravo je ova razlika u metaboličkom putu ugljenih hidrata od suštinske važnosti za razumevanje pojma nedigestibilnosti, pa su u skladu sa tim vršena brojna ispitivanja i testirana različita jedinjenja kako bi se utvrdila njihova pripadnost grupi prebiotika.

Razlikuju se dve grupe prebiotika – potvrđeni i potencijalni (slika 2.2). One komponente koje ispunjavaju definisane kriterijume o čemu svedoče dostupne *in vivo* i *in vitro* studije, smatraju se potvrđenim prebioticima. U ovu grupu ubrajaju se laktuloza, inulin, frukto-oligosaharidi (FOS), galakto-oligosaharidi (GOS) i oligosaharidi ljudskog mleka (HMO) [22, 44]. Međutim, pored potvrđenih prebiotika postoje i prebiotici koji su još uvek u fazi istraživanja. Stoga, potencijalnim prebioticima smatraju se manan-oligosaharidi (MOS), izomalto-oligosaharidi (IMO), ksilo-oligosaharidi (XOS), gluko-oligosaharidi, [22] pektinski oligosaharidi (POS) [45], hitinski-oligosaharidi (COS) [46], bakterijski egzopolisaharidi (EPS), polisaharidi dobijeni iz algi i šećernih alkohola, [44] kao i polifenoli [47]. Iako postoje određeni podaci iz *in vitro* studija i ispitivanja na životinjama koji navode na prebiotski efekat ovih supstanci, neophodno je sprovesti dalja istraživanja zbog nedostatka objavljenih kliničkih podataka iz ispitivanja na ljudima.

Budući da svi ugljeno-hidratni prebiotici imaju nisku kalorijsku vrednost [48] postoji rastuća potražnja potrošača i industrije za ovim niskokaloričnim šećernim alternativama. Upravo zbog tih svojstava među posebno značajnim prebioticima izdvajaju se FOS i predstavljaju predmet ove doktorske disertacije. Kako predstavljaju veoma atraktivnu oblast istraživanja, sva pažnja je usmerena ka razvijanju novih postupaka sinteze, a potom i prečišćavanja radi njihove potencijalne primene u prehrambenim i farmaceutskim proizvodima kao i hrani za životinje.



Slika 2.2. Klasifikacija prebiotika

2.2.3. Uloga prebiotika u očuvanju zdravlja

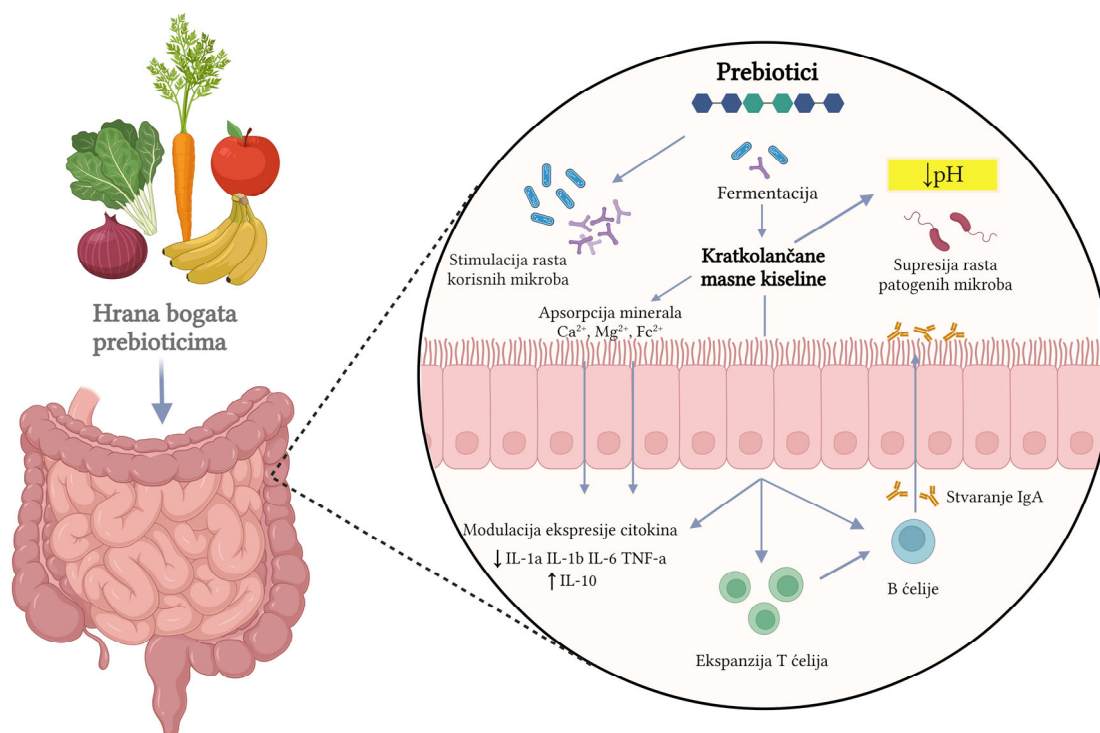
Unos prebiotika dovodi do fermentacije u debelom crevu koja rezultira brojnim korisnim efektima, uključujući [40] (slika 2.3):

- Povećanje broja bifidobakterija i laktobacila
- Smanjenje populacije patogenih mikroba
- Smanjenje negativnih efekata usled fermentacije proteina
- Povećanje apsorpcije minerala
- Poboljšanje rada imunog sistema
- Smanjenje rizika od alergija

Uticaj na crevne mikrobe

Kao što je pomenuto u prethodnim poglavljima, debelo crevo kao najkolonizovanije područje sadrži širok spektar mikroorganizama koji, kada su u međusobnoj ravnoteži, mogu uticati na očuvanje zdravlja domaćina kroz jačanje imunog sistema, inhibicije rasta patogenih mikroorganizama, poboljšavanje varenja, apsorpcije hranljivih materija i dr. [26] Pozitivan uticaj na zdravlje uglavnom ostvaruju mikroorganizmi poput laktobacila i bifidobakterija koji se smatraju „korisnim“ mikroorganizmima. Narušavanje ravnoteže može dovesti do povećanja broja patogenih vrsta u organizmu što može izazvati dijareju, ozbiljne infekcije, oštećenje jetre, poremećaje u funkciji creva, pa čak i ozbiljne bolesti [49]. Prebiotici predstavljaju hranu korisnim mikrobima čime podstiču njihovo umnožavanje. Mikrobi ih metabolišu preko enzima koje proizvode, [11] a kao proizvod njihovog metabolizma nastaju SCFA među kojima su najzastupljenije sirćetna, propionska i buterna kiselina, alkoholi (etanol, propanol, 2,3- butandiol) i gasovi (vodonik, ugljen-dioksid) [50]. Među pomenutim metabolitima, SCFA

se smatraju najvažnijim jer učestvuju u održavanju crevne homeostaze i pokazuju različite biološke zaštitne efekte na domaćina (antiinflamatorni, antikancerogeni, anti-gojazni, imunoregulatorni i dr.) [51, 52].



Slika 2.3. Mehanizam delovanja prebiotika u debelom crevu. Slika je kreirana u programu BioRender na osnovu podataka iz izvora [53]

Među njima se posebno ističe buterna kiselina, za koji je naučno potvrđeno da jača funkciju crevne barijere, predstavlja primarni izvor energije epitelnih ćelija creva, obezbeđuje antiinflamatorno dejstvo, ali i druge pozitivne efekte [51]. Kao rezultat produkcije SCFA, dolazi do snižavanja pH debelog creva ispod pragova vijabilnosti patogenih vrsta i onemogućavanja njihovog opstanka [40]. Važno je istaći da u zavisnosti od primenjenih prebiotika, dolazi do različitih mikrobni promena u debelom crevu, a posledično i produkcije različitih SCFA [33, 54]. Stoga, efekat prebiotika na mikrobnu populaciju, a ujedno i na SCFA svakako zahteva detaljnija ispitivanja radi njihove potencijalne primene u brojnim prehrambenim i farmaceutskim proizvodima u cilju poboljšanja zdravstvenih ishoda pojedinaca.

Uticaj na efekat fermentacije proteina

Konzumacijom proteina u debelom crevu dolazi do proteolize od strane intestinalnih mikroorganizama. Kao proizvod mikrobnog razlaganja nastaju SCFA i gasovi, ali i toksični metaboliti poput amonijaka, amina, sulfida, fenola, *p*-krezola, indola i razgranatih masnih kiselina [40, 55]. Prema dostupnim *in vivo* studijama i studijama na pacovima, amonijak u određenoj dozi može negativno uticati na funkciju crevne barijere i samih kolonocita, a konkretno kod ispitivanja na pacovima se pokazao i kao kancerogen. Toksičnim za kolonocite se smatra i vodonik sulfid koji se dobija iz aminokiselina koje sadrže sumpor, za koji postoje navodi da može oštetiti DNK, ali i blokirati korišćenje butirata. Fenol, *p*-krezol i indol se takođe smatraju potencijalnim kancerogenim supstancama koji ostvaruju nepovoljan uticaj na funkciju crevne barijere [55]. Pomenuti nepoželjni efekti se mogu minimizirati ishranom

suplementiranom prebioticima. U *in vitro* studiji koju je grupa naučnika provela i koristila izmet vegetarijanaca i mesojeda uz dodatak različitih proteina i sa i bez primene inulina obogaćenog oligofruktozom, došla je do saznanja da je nivo amonijaka značajno smanjen prebiotskim tretmanom [55]. Takođe, i u studiji koju su sproveli Balong (Ballongue) i sar. prijavljeno je da je ishrana uz primenu laktuloze dovela do smanjenja sadržaja fenola, indola, *p*-krezola i skatola [56]. Dakle, naučne studije navode da konzumiranje prebiotika favorizuje fermentaciju ugljenih hidrata što povećava koncentraciju SCFA i snižava pH, čime se stvara nepovoljno okruženje za efikasnu fermentaciju proteina [40].

Uticaj na apsorpciju minerala

Minerali poput kalcijuma, magnezijuma, gvožđa i cinka su esencijalni za različite fiziološke procese u organizmu i njihov nedostatak može rezultirati brojnim neželjenim pojavama [57]. Na primer, nedostatak jona kalcijuma, može dovesti do pojave osteoporoze tj. smanjenja gustine kostiju [58]. Do apsorpcije minerala obično dolazi u tankom crevu, izuzev situacije kada se unosi hrana koja sadrži prebiotike. Prebiotici se vezuju za minerale i na taj način smanjuju njihovu apsorpciju u tankom crevu, pri čemu dolaze do debelog creva gde njihova bioraspoloživost raste [59].

Iako nije definisan mehanizam delovanja prebiotika na zdravlje kostiju, trenutno je široko prihvaćena teorija da zapravo produkti fermentacije prebiotika doprinose stvaranju zdrave koštane strukture [58]. Mikrobnom fermentacijom, prebiotici se transformišu do SCFA, čime se snižava pH u crevima i onemogućava stvaranje kompleksa jona kalcijuma sa negativno naelektrisanim metabolitima poput oksalata i fitata, već prelaze u rastvorljivije oblike koji se jednostavnije pasivno difunduju kroz epitel creva. Na ovaj način se ostvaruje veća dostupnost jona kalcijuma i omogućava naknadna mineralizacija kostiju [58].

Uticaj na imuni sistem

Brojne ćelije (T ćelije, B ćelije i dr.) koje se nalaze u GIT domaćina su od velike važnosti za imuni sistem i signalizaciju u organizmu. Upravo na njih utiču prebiotici i metaboliti koji nastaju njihovom fermentacijom. Iako su tačni mehanizmi njihovih uticaja na imuni sistem nepoznati, pretpostavlja se da najveći uticaj imaju SCFA [40]. Smatra se da je buterna kiselina jedan od najvažnijih metabolita debelog creva zbog njenih protivupalnih svojstava. U naučnoj literaturi se navodi da podstiče širenje regulatornih T ćelija i preko B ćelija učestvuje u indukciji imunoglobulina A (IgA) koji učestvuje u zaštiti GIT od brojnih infekcija [53].

Nekoliko studija je razmatralo i prebiotski efekat na ekspresiju citokina. Vulević i sar. su ispitali volontere dajući im GOS i utvrdili da je povećana proizvodnja protivupalnog citokina (IL-10) dok je smanjena proizvodnja citokina koji izazivaju upalu (interleukini 1 i 6 (IL-1 i IL-6) i faktor nekroze tumora-alfa (TNF-alfa)) [60]. Shodno tome, Dehan (Dehghan) i sar. su utvrdili da inulin obogaćen oligofruktozom u poređenju sa maltodekstrinom značajno smanjuje nivo IL-6, TNF-alfa i nivo lipopolisaharida (LPS) koji predstavlja molekul iz omotača Gram-negativnih bakterija i učestvuje u razvoju upalnih metaboličkih poremećaja i stanja [40, 61].

Uticaj na pojavu alergije

Svetska zdravstvena organizacija (SZO) navodi da se alergijske bolesti (kožne, respiratorne i alergije na hranu) koje danas pogađaju 30% svetskog stanovništva smatraju četvrtom globalnom bolešću u svetu. Do nastanka alergije dolazi usled disfunkcije tri glavna sistema - mikrobiote, epitelne barijere i imunog sistema, koji obezbeđuju zaštitnu ulogu domaćina [62]. Smanjenje nivoa bifidobakterija i laktobacila povezano je sa razvojem alergijskih bolesti u prvih pet godina života. Postoje i podaci da je dodatak prebiotske formule FOS/GOS, pokazao potencijal u prevenciji alergijskih reakcija, posebno protiv razvoja ekcema i alergijskog

konjunktivitisa [40]. Međutim, i pored intenzivnih istraživanja, još uvek nije definisana potpuno efikasna strategija prevencije alergije, ali se svakako smatra da je veoma važna uloga prebiotika za sprečavanje ove bolesti zbog njihove sposobnosti da direktno ili indirektno modulišu pomenute sisteme [40].

Pored brojnih ispitivanja na životinjama i ljudima, čiji je osnovni cilj bio razjasniti mehanizme delovanja prebiotika, i dalje nije potpuno utvrđen mehanizam delovanja i dugoročan efekat na zdravlje domaćina, te je stoga neophodno sprovesti dalja istraživanja [53].

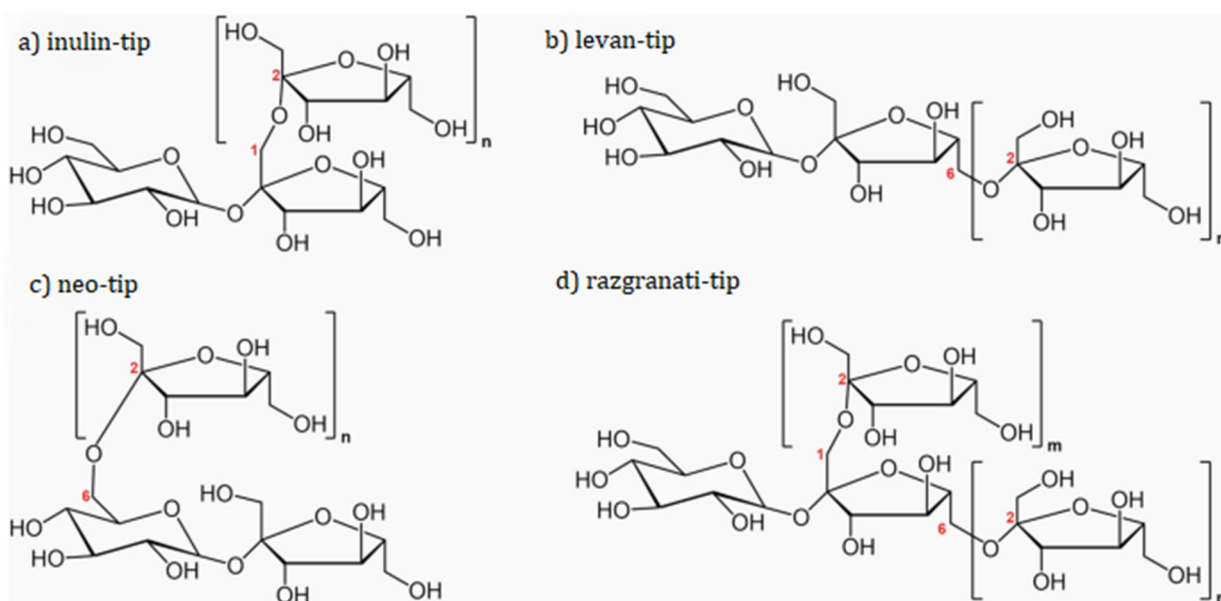
2.3. Frukto-oligosaharidi (FOS)

2.3.1. Hemijska struktura

Frukto-oligosaharidi (FOS) ili oligofruktani predstavljaju ugljene hidrate koji se sastoje od jedne terminalne glukoze ili fruktozne jedinice i preostalih fruktoznih jedinica, sa maksimalnim stepenom polimerizacije (*eng. Degree of Polymerization, DP*) 10 [63, 64].

Prema stepenu polimerizacije FOS mogu se razlikovati na oligofruktozu i kratkolančane FOS. Oligofruktoza se dobija hidrolizom inulina i predstavlja frakciju fruktoznih oligosaharida sa brojem monosaharidnih jedinica od 2-10. Smeša dobijena na ovaj način sadrži fruktozne lance različitih dužina sa terminalnim jedinicama glukoze ili fruktoze [63]. Sa druge strane, kratkolančani FOS nastaju iz saharoze reakcijom transfruktozilacije i predstavljaju smešu fruktoznih lanaca sa terminalnim jedinicama glukoze čiji je stepen polimerizacije od 3-5 [65].

U zavisnosti od prirode prisutnih veza u strukturi FOS dobijenih iz saharoze, mogu se klasifikovati četiri različita tipa oligosaharida. Kada su jedinice fruktoze međusobno povezane β -(2,1)-glikozidnom vezom formira se inulinski tip FOS i nastaju 1-kestoza, nistoza i 1- fruktofuranozil-nistoza (slika 2.4). Uspostavljanjem β -(2,6)-glikozidne veze između jedinica fruktoze formira se levanski tip, pri čemu se izdvajaju 6-kestoza, 6-nistoza i 6-fruktofuranozil-nistoza. U slučaju formiranja β -(2,6)-glikozidne veze između jedinice glukoze i fruktoze nastaju neo-kestoza, neo-nistoza i neo-fruktofuranozil-nistoza koji predstavljaju neo-tip. Razgranati tip FOS karakteriše prisustvo β -(2,1) i β -(2,6)-glikozidne veze, pa tako, na primer, dodavanjem fruktozne jedinice u položaju 6, na unutrašnjoj fruktoznoj jedinici molekula 1-kestoze nastaje razgranati tetrasaharid bifurkoza [64, 66, 67].



Slika 2.4. Mogući tipovi FOS. Preuzeto i prilagođeno iz [64].

2.3.2. Prirodni izvori FOS

FOS su sastavni deo velikog broja biljnih vrsta poput pšenice, banane, paradajza, crnog i belog luka, artičoke, špargle, cikoriје i drugih, a mogu se pronaći i u medu [63, 68]. Međutim, pomenuti prirodni izvori koji se najčešće konzumiraju sadrže veoma niske koncentracije FOS nižeg stepena polimerizacije.

Jovanović-Malinovska i sar. su utvrdili sadržaj FOS u pojedinim namirnicama (tabela 2.1.) i dobijene vrednosti uporedili sa podacima iz već postojećih studija. Poređenjem ovih podataka uočena su određena odstupanja. Naime, Kambel i sar. su naveli podatak da je sadržaj FOS u crnom luku iznosio 0,39 g u 100 g, dok su Muir i sar. dobili vrednost od 0,92 g. Primećena su neslaganja i u vrednostima za beli i mladi luk. Objašnjenje za ovakvu neusaglašenost u vrednostima može biti posledica činjenice da sadržaj FOS u prirodnim izvorima zavisi od brojnih faktora koji uključuju zrelost ploda, sezonske uslove (klima, temperatura), vreme skladištenja, postupak ekstrakcije kao i analitičke metode za određivanje oligosaharida [69].

Tabela 2.1. Sadržaj FOS u prirodnim izvorima [69, 70]

	Sadržaj FOS (g/100 g svežeg uzorka)	Stepen polimerizacije, DP
Koren cikoriје	0,39	<5
Jerusalimska artičoka	0,84	<5
Zelena artičoka	1,80	>5
Beli luk	1,20	<5
Crni luk	2,01	<5
Mladi luk	3,32	<5
Banana	0,70	<5
Nektarina	0,89	<5

U studiji koju su sprovedi Loklajn (Lochlainn) i sar. postoje navodi da doziranje prebiotika (FOS) u količini od 7,5 g/dan može izazvati određene promene crevne mikrobiote [71]. Imajući na umu da se konzumiranje ovih prebiotika do 20 g/dan smatra bezbednim, prema podacima iz tabele 2.1, na primer u slučaju banane (prosečna masa jedne banane oko 120 g), trebalo bi uneti više od 8 banana dnevno kako bi se pokrila predviđena doza. S tim u vezi, iako FOS postoje u prirodnim izvorima i mogu se dobiti ekstrakcijom, zbog niskog sadržaja u voću i povrću, teži se ka njihovom industrijskom dobijanju i obogaćivanju prehrambenih proizvoda ovim prebioticima.

2.3.3. Načini dobijanja FOS

Uzimajući u obzir prethodna razmatranja, FOS se mogu dobiti ekstrakcijom iz prirodnih izvora, sa jedne strane, ali i hemijskim i enzimskim postupcima dobijanja, sa druge.

2.3.3.1. Ekstrakcija iz prirodnih izvora

Ekstrakcija se uspešno primenjuje za dobijanje FOS dugih lanaca primenom cikoriје (*Cichorium intybus*), jerusalimske artičoke (*Helianthus tuberosus*) i agave (*Agave vera cruz*, *Agave americana*, *Agave tequilana*) koje se smatraju dobrim izvorom inulina [64, 72]. Termin „inulin“ se odnosi na smešu fruktoznih polimera različitih stepena polimerizacije, a oligofruktoza se smatra njegovom podgrupom [73]. Primenom ekstrakcije mogu se ekstrahovati FOS dugih lanaca kao sastavni deo inulina. Proces ekstrakcije zavisi od faktora koji uključuju temperaturu, vreme i odnos rastvarača i čvrste materije, ali i od fizičkih svojstava inulina. Ovaj ugljeni hidrat

je nerastvoran u vodi na 25 °C, a sa porastom temperature njegova rastvorljivost raste. Prema tome, proces izolacije iz različitih izvora uglavnom podrazumeva upotrebu tople vode kao rastvarača [64]. Upotrebom cikoriije, često može doći do delovanja prisutnih enzima inulinaza (fruktan 1-egzohidrolaza, EC 3.2.1.153) čije dejstvo dovodi do hidrolize prisutnog inulina. Prema literaturnim podacima, ekstrakcija se obično izvodi na visokim temperaturama (uglavnom 80 °C), uz održavanje pH iznad 6,0 kako bi se minimizirala degradacija i onemogućili pogodni uslovi za hidrolizu [74]. Nativni inulin izolovan iz cikoriije ima DP od 2-60, pri čemu je najveći broj onih oligosaharida sa stepenom polimerizacije od 10-12, iz jerusalimske artičoke DP od 2-40, sa prosečnim DP od 6, a iz agave ima DP od 3-30 [64, 72, 75, 76]. Takođe, primenom cikoriije se dobija smeša oligosaharida inulinskog tipa, dok se iz agave dobijaju FOS različite molekulske strukture, pored inulinskog tipa, nastaju razgranati i neo-tip FOS [64]. Dobijeni nativni inulin se dalje može hidrolizovati primenom enzima radi produkcije FOS kratkih lanaca. Imajući u vidu da su inicijalno kratkolančani FOS u malim količinama prisutni u prirodnim izvorima, ekstrakcija ovih komponenti iz biljnih delova se ne smatra ekonomski održivim postupkom zbog niskih prinosa, visokih troškova kao i sezonskog ograničenja [77].

2.3.3.2. Hemijski katalizovano dobijanje FOS

U slučaju dobijanja FOS, hemijski postupak se odnosi na tretiranje inulina mineralnim kiselinama radi hidrolize na molekule niže molekulske mase. Ovaj postupak se najčešće primenjuje za tretiranje inulina iz agave, jer njegova kompleksna struktura predstavlja limitirajući faktor za delovanje komercijalnih hidrolitičkih enzima (endo-inulinaza, EC 3.2.1.7) [38]. Grupa naučnika je primenila hlorovodoničnu kiselinu i katjonske jonoizmenjivačke smole za dobijanje FOS [78]. Reakcije ovog tipa treba strogo kontrolisati kako bi se sprečila totalna hidroliza, do prostih šećera [38]. Slično, Fontana i sar. su prijavili da se upotrebom 10 % limunske i fosforne kiseline, koje poseduju GRAS (*eng. Generally Recognized As Safe*) status, može parcijalno hidrolizovati inulin i dobiti smeša FOS. Smeša dobijena ovim tretmanom može biti pogodna za inkorporiranje u prehrambene proizvode, za razliku od proizvoda dobijenog konvencionalnim tretmanima sa sumpornom ili hlorovodoničnom kiselinom [79]. Međutim, slično kao i kod ekstrakcije, hemijsko dobijanje FOS ne predstavlja pogodnu i ekonomičnu alternativu, ne samo zbog niskih prinosa već i zbog upotrebe hemikalija (od kojih su neke i visoko toksične) kojima nedostaje specifičnost [5, 80].

2.3.3.3. Enzimski katalizovano dobijanje FOS

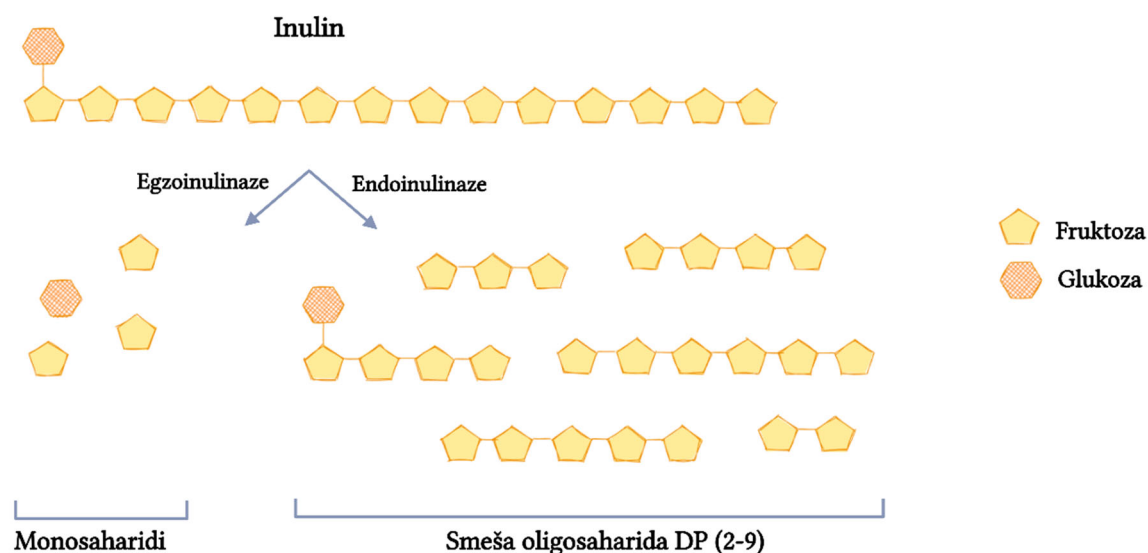
Najčešće se preferira dobijanje FOS enzimskim postupkom koji predstavlja veoma isplativ i vremenski efikasan proces [66] zbog visoke specifičnosti enzima, netoksičnosti, biokompatibilnosti i rada pri umerenim reakcionim uslovima (iziskuje umerenu potrošnju energije i ne zahteva skupu opremu otpornu na kiseline) bez generisanja visokih količina otpadnih materijala [81, 82]. Pored toga, enzimskim postupkom nastaje i mnogo manje zagađujućeg otpada kao i nusproizvoda u poređenju sa konvencionalnim hemijskim procesima [80].

Enzimskim putem FOS mogu biti dobijeni na dva načina:

- Hidrolizom nativnog inulina
- Sintezom iz saharoze reakcijom transfruktozilacije

Delovanjem različitih enzima može doći do hidrolize inulina i produkcije FOS (slika 2.5.). Razlikuju se endoinulinaze (EC 3.2.1.7) i egzoinulinaze (EC 3.2.1.80). Dejstvom endoinulinaza, dolazi do nasumičnog raskidanja β -(2,1)-glikozidne veze što rezultira nastankom smeše FOS sa različitim stepenom polimerizacije među kojima se kao glavni proizvodi izdvajaju tri-, tetra- i penta-oligosaharidi (slika 2.6.) koji ne sadrže jedinicu glukoze u svojoj strukturi [64]. Pored

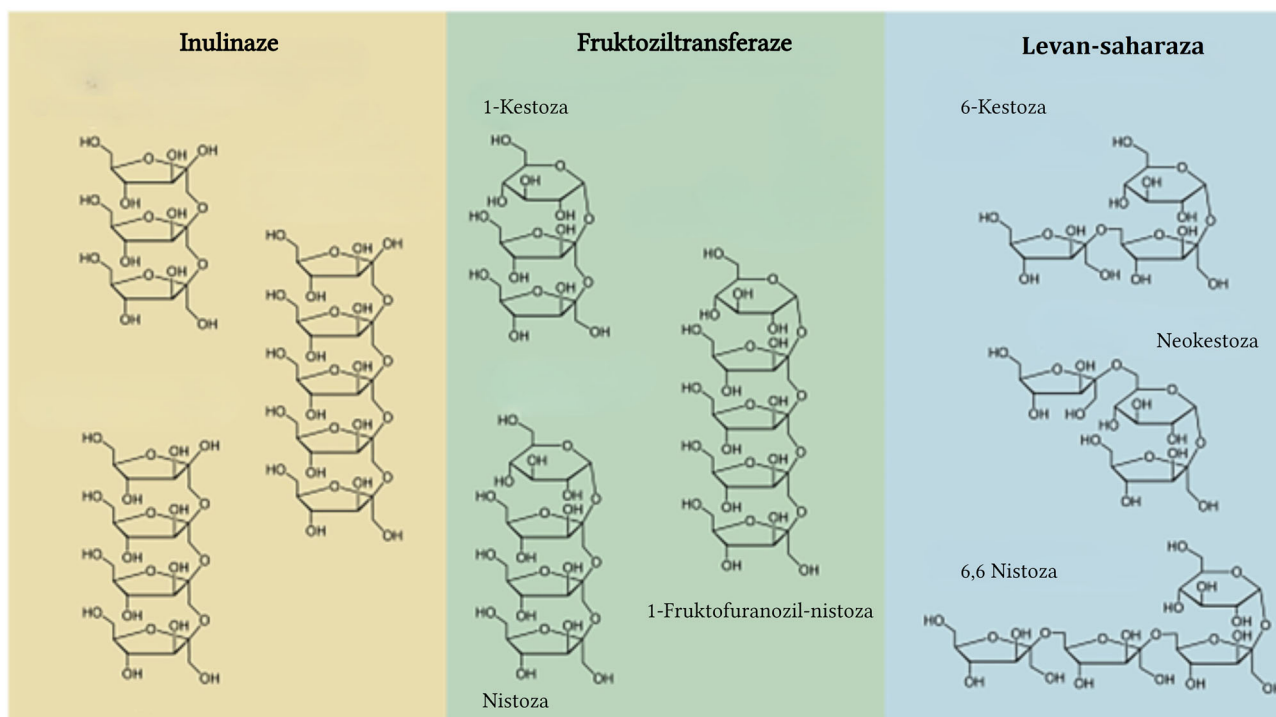
endoinulinaza, postoje i egzoinulinaze čija je osnovna razlika u načinu delovanja. Egzoinulinaze raskidaju uzastopno β -(2,1)-glikozidnu vezu polazeći od neredukujućeg kraja inulina oslobađajući terminalnu fruktoznu i glukoznu jedinicu zbog čega se koriste za dobijanje visokofruktoznih sirupa [38, 83]. Stoga, delovanjem pomenutih enzima nastaje smeša dužih lanaca oligosaharida sa terminalnim jedinicama glukoze ali i fruktoze, a dolazi i do oslobađanja fruktoze, glukoze kao i saharoze [38].



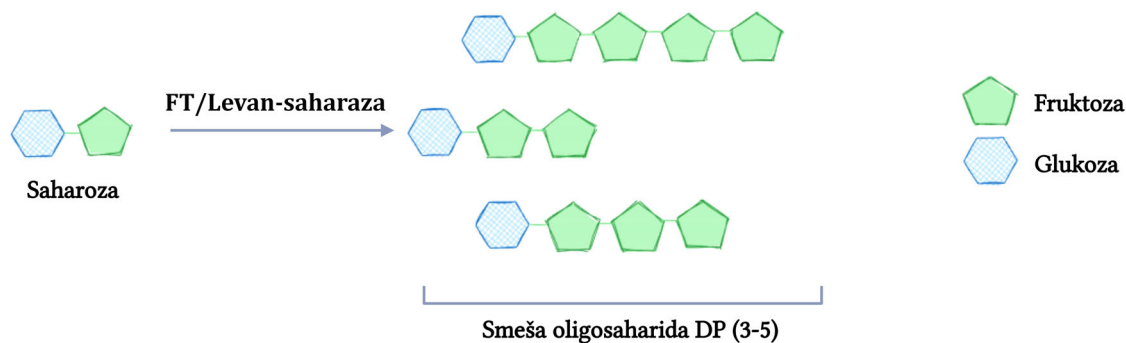
Slika 2.5. Grafički prikaz sastava smeše FOS dobijene hidrolizom inulina dejstvom inulinaza

Razlika u načinu delovanja proističe od porekla enzima. Inulinaze dobijene iz gljiva, najčešće deluju sa kraja molekula (egzoinulinaze), međutim postoje neki gljivični sojevi iz roda *Aspergillus*, *Penicillium* i *Kluyveromyces* koji mogu proizvesti i endoinulinaze. Pored gljiva, endoinulinaze mogu proizvoditi i bakterije iz roda *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* i *Streptomyces* [83, 84]. Takođe, izvor enzima diktira i količinu i tip proizvoda. S tim u vezi, primena endoinulinaza iz *Xanthomonas oryzae* No. 5 rezultira produkcijom FOS sa DP većim od 5, dok *Pseudomonas sp.* No. 65 daje uglavnom proizvode sa DP 2 i 3 [38].

Pored kontrolisane hidrolize inulina, FOS se mogu dobiti i iz saharoze upotrebom enzima sa transfruktozilacionom aktivnošću. Prvim procesom nastaju oligosaharidi većih molarnih masa, dok drugim nastaju oligosaharidi čije su molarne mase znatno niže [83]. Naime, iz saharoze primenom enzima FT ili ređe levan-saharaza, mogu se dobiti kratkolančani FOS različitog tipa (slika 2.7.).



Slika 2.6. Glavni proizvodi dobijeni dejstvom inulinaze, FT i levan-saharaza. Preuzeto i prilagođeno iz [64]



Slika 2.7. Grafički prikaz sastava smeše FOS upotrebom saharoze i enzima sa transfruktozilacionom aktivnošću

Upotreba FT rezultira produkcijom FOS inulinskog tipa, dok primena LC dovodi do produkcije FOS inulinskog, neo- i levanskog tipa, kao i levana. Glavni proizvodi korišćenjem FT su 1-kestoza koja nastaje dodavanjem molekula fruktoze već postojećem molekulu saharoze, zatim nistoza (nastaje daljim dodavanjem molekula fruktoze prethodno formiranoj 1-kestozi), a daljim odvijanjem reakcije i 1-fruktofuranozil-nistoza (slika 2.6) [3]. Važno je istaći da u slučaju levan-saharaze, sastav dobijene smeše zavisi od mikrobnog izvora, ali i uslova reakcije. Naime, LC iz *Bacillus megaterium* i *Bacillus subtilis* katalizuju sintezu levana, dok *Gluconacetobacter diazotrophicus* i *Zymomonas mobilis* pretežno sintetišu FOS [85]. U ovom slučaju uglavnom nastaju FOS sa β -(2,6)-glikozidnom vezom poput 6-kestoze (levanski tip), ali i drugi FOS (slika 2.6) [64].

Imajući u vidu činjenicu da saharoza predstavlja jeftiniji supstrat u poređenju sa inulinom i da izraženiji prebiotski efekat poseduju FOS nižeg stepena polimerizacije [38], smatra se da je

enzimska sinteza upotrebom saharoze od velike važnosti zbog čega je i predmet ove doktorske disertacije. U vezi toga, u narednim poglavljima će opsežnije biti obrađena sinteza FOS iz saharoze primenom FT u cilju produkcije kratkolančanih FOS inulinskog tipa.

2.3.4. Fizička svojstva i primena FOS

▪ Rastvorljivost

FOS predstavljaju jedinjenja koja su veoma rastvorljiva u vodi, za razliku od inulina (koji zbog dužih lanaca) u vodi ili mleku podleže formiranju mikrokristala. Mikrokristali dovode do formiranja glatke i kremaste strukture proizvoda, ali stvaraju i osećaj masnoće u ustima [63, 86].

▪ Aktivnost vode

Pomenuti oligosaharidi imaju nisku aktivnost vode što ih čini pogodnim za upotrebu u prehrambenim proizvodima, jer mogu uticati na produženje roka trajanja. Grupa naučnika je prijavila da je inkorporiranje FOS u keksiće rezultiralo nižom aktivnošću vode i osiguralo veću mikrobiološku stabilnost [87].

Pomenuti oligosaharidi imaju nisku aktivnost vode što ih svrstava među pogodnikandidatima za primenu u prehrambenim proizvodima produžavajući njihov rok trajanja. se smatraju i visoko higroskopskim molekulima, pa je njihov kapacitet zadržavanja vode značajniji u odnosu na onaj koji poseduje saharoza. Ovo svojstvo je od izuzetnog značaja, jer mogu sprečiti sušenje proizvoda obezbeđujući vlažnost, a njihova primena u smrznutim desertima može dovesti i do smanjenja tačke mržnjenja.

▪ Viskoznost

Zbog veće molarne mase, u poređenju sa saharozom, rastvori FOS u istoj koncentraciji su viskozni i dovode do boljeg i punijeg ukusa u ustima [63].

▪ pH i temperaturna stabilnost

Veoma su stabilni u standardnom pH opsegu (4,0-7,0), dok u uslovima niskog pH i visoke temperature, dolazi do narušavanja stabilnosti i delimičnog raskidanja β -(2-1)-glikozidne veze [3]. U odnosu na saharozu, pokazuju veću termičku stabilnost, a potvrđeno je da i na niskim temperaturama (temperaturama skladištenja), ostaju stabilni [63].

▪ Slast

Poseduju nizak intenzitet slasti (30-50% slatkoće konzumnog šećera) [88], pri čemu njihova slatkoća varira u zavisnosti od stepena polimerizacije. U literaturi postoje podaci da se slatkoća smanjuje sa povećanjem dužine lanaca oligosaharida [3]. Iako su umereno slatki, FOS predstavljaju supstance koje imaju i nizak energetska sadržaj (1,5 kcal/g) [63], jer nisu svarljivi od strane digestibilnih enzima prisutnih u organizmu ljudi koji su uglavnom specifični za α -glikozidne veze. Zbog manje slatkoće i niske kaloričnosti sasvim opravdano pronalaze primenu u različitim formulacijama prehrambenih proizvoda poput mlečnih deserata, jogurta, peciva, sladoleda i dr. u cilju dobijanja funkcionalnih proizvoda prilagođenih i osobama kod kojih je upotreba konzumnog šećera ograničena (npr. osobe koje su na dijeti ili boluju od dijabetesa) [63].

▪ Nekariogenost

Još jedna od značajnih prednosti FOS jeste da predstavljaju nekariogene supstance. U poređenju sa saharozom i skrobom, FOS ne predstavljaju izvor hrane bakterijama usne duplje, pogotovo

izrazito kariogenim bakterijama kao što su *Streptococcus mutans* i *Lactobacillus acidophilus* pri čemu onemogućavaju formiranje β -nerastvornih glukana koji služe kao matrica za formiranje plaka koji dovodi do pojave karijesa [89].

Zbog svojih fizičkih karakteristika FOS sasvim opravdano pronalaze primenu u mnogim oblastima, jer se smatraju idealnim sastojcima koji smanjuju kalorijsku, a povećavaju funkcionalnu vrednost proizvoda, ne utičući drastično na ukus. FOS se mogu inkorporirati u formulacije mlečnog sladoleda i deserata kojima na etiketi stoji izraz „nizak sadržaj šećera“ ili „smanjena kalorijska vrednost“. Mogu se primeniti i u formulacijama namenjenim dijabetičarima, u jogurtima koji promovisu sinbiotski efekat, u kolačima, žitaricama, sokovima [90]. Takođe, primenjuju se i kao šećerna zamena u pekarskoj industriji, konkretno u pecivima i hlebu utičući i na zadržavanje vlage u proizvodu što rezultira dodatnom mekoćom [91]. Njihova nekariogenost ih čini pogodnim za upotrebu u proizvodima oralne higijene (paste za zube, tečnosti za ispiranje i dr.), žvakaćih guma, konditorskih proizvoda i pićima [63]. Međutim, mogu biti primenjeni i u hrani namenjenoj životinjama [92]. Danas se širom sveta mnogi proizvođači bave proizvodnjom FOS različitog stepena polimerizacije (sumirano u tabeli 2.2) koji u formi praha ili sirupa mogu biti implementirani u različite proizvode.

Tabela 2.2. Prikaz glavnih proizvođača komercijalnih smeša FOS [64, 93, 94]

FOS kratkih lanaca			FOS dugih lanaca		
Naziv proizvoda	Proizvođač	Čistoća	Naziv proizvoda	Proizvođač	Čistoća
NutraFlora®	GTC Nutrition, SAD	95 %	Orafti®P95	BENE0-Orafti, Belgija	95 %
Raftilose	Orafti Group, Belgija	95 %	Fibrulose™ LCF	Cosucra, Belgija	~90 %
FortiFeed	GTC Nutrition, SAD	95 %	Actilight®	Beghin Meiji, SAD	95 %
Meiologo	Meiji Seika Kaisha, Japan	97 %	Orafti®Synergy1	BENE0-Orafti, Belgija	99,5 %

Biljni i mlečni proizvodi se smatraju potencijalno interesantnim matricama za primenu probiotika i prebiotika, a sve češće se u ovakvim proizvodima sreće i njihova kombinovana upotreba u cilju ostvarivanja njihovog sinbiotskog efekta. Shodno tome, u jednoj studiji je razmatran sojin jogurt dobijen fermentacijom probiotskih bakterija u koji je dodata i određena količina FOS kako bi se ispitaio njihov uticaj na sadržaj probiotika, kao i na karakteristike proizvoda. Primećeno je da su FOS održavali prisutne bakterije na visokom nivou čak do 28. dana skladištenja. Jogurt dopunjen prebiotikom pokazao je veću viskoznost i kohezivnost u odnosu na proizvod bez dodatka, pri čemu su autori zaključili da su FOS sastojci koji stvaraju proizvod povoljnih karakteristika [90]. Sa druge strane, određena grupa naučnika je ispitivala dodavanje FOS i probiotika u čokoladni kremasti desert. Na osnovu testa prihvatljivosti proizvoda od strane potrošača došli su do veoma pozitivnih rezultata, a primetili su da su FOS povoljno uticali i na preživljavanje probiotika [95]. U skladu sa tim, za stvaranje sinbiotskih proizvoda od velike važnosti je identifikacija različitih kombinacija probiotika i prebiotika koje bi se mogle potencijalno primeniti u hrani mlečnog, ali i drugog porekla.

Poslednjih godina je ogromna pažnja usmerena ka razmatranju novih proizvoda u kojima se mogu primeniti FOS. Naime, u jednom istraživanju kao supstrat korišćena je kuvana šunka u kojoj su inkorporirani FOS umesto glukoze koja je inače sastavna komponenta. Rezultati su

pokazali da implementacija FOS nije uticala na promenu fizičkog izgleda proizvoda, a svakako je doprinela razvoju proizvoda dodate vrednosti [95]. Međutim, unapređen efekat u pogledu promene inicijalnih svojstava (boja, tekstura i izgled) je primećen supstitucijom saharoze bioaktivnim oligosaharidima u keks. Proizvod dobijen na ovaj način bi se mogao okarakterisati kao dijetalni usled unapređenih nutritivnih svojstava [87]. Takođe, prema objavljenoj naučnoj studiji prijavljeno je da i dodatak FOS-sukraloze i maltitola u kombinaciji može uspešno da zameni saharozu i dovede do produkcije funkcionalnih keksa koji mogu doprineti zdravlju potrošača [96].

Kao odlične matrice za dobijanje proizvoda sa dodatnom vrednošću pokazale su se i voćne formulacije. Naime, u okviru saradnje sa domaćom kompanijom Desing, voćne formulacije (limun, šljiva, kajsija, smokva i dr.) koje proizvodi ova kompanija za potrebe pekarske industrije obogaćene su dodatkom FOS kao šećerna zamena. Karakteristike proizvoda kao što su termička stabilnost, sadržaj suve materije, pH i dr. ispitane su u Desing Taste centru, dok je na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju sprovedena senzorna analiza. Rezultati senzorne analize navode na zaključak da su dobijene voćne formulacije veoma pogodne za upotrebu [97].

Nesumnjivo je da postoji inovativni trend u primeni FOS u različitim vrstama proizvoda kako bi se deklarirali kao funkcionalni i široko primenili. Međutim, važno je naglasiti da proizvodi koji sadrže prebiotike moraju pozitivno odgovoriti na tehnološke i senzorne karakteristike, ali i ostati stabilni u odgovarajućim uslovima tokom prerade i skladištenja kako bi bili sastavni deo ponude koje prehrambena industrija nudi [98].

2.4. *In vitro* modeli gastrointestinalnog trakta za istraživanje prebiotika

Prepoznato je da prebiotici moduliraju crevnu mikrobiotu u pravcu unapređenja zdravlja [99]. U vezi sa tim, radi boljeg razumevanja i proučavanja njihovog uticaja na GIT sa akcentom na crevnu mikrobiotu pristupa se primeni *in vitro* i *in vivo* modela. *In vivo* modeli GIT uključuju studije na životinjama i ljudima, za razliku od *in vitro* modela koji predstavljaju sisteme koji oponašaju GIT zbog čega su u poslednje vreme i sve češći izbor naučne zajednice kao pouzdan vid trijaže pre izvođenja kliničkih studija [100].

Neosporno je da ***in vivo* modeli** koji uključuju istraživanja na životinjama (najčešće pacovi, miševi i prasad) i kliničke studije na ljudima, pružaju najtačnije informacije o interakcijama bioaktivnih molekula i mikroba u kontekstu zdravlja, zbog mogućnosti sagledavanja svih aspekata kompleksnog sistema kao što je GIT [99, 101]. Međutim, ova istraživanja su skupa, dugotrajna i komplikovana za realizaciju. Postojanje etičkih ograničenja, komplikovana kontrola ishrane ljudi i životinja, kao i drugi faktori, značajno limitiraju primenu ovih modela [101, 102]. Takođe, imajući u vidu da se životinjska mikrobiota razlikuje od ljudske, nalazi dobijeni sa životinjskih modela se ne mogu smatrati potpuno reprezentativnim za donošenje zaključaka koji će važiti i kod ljudi [99]. Prema tome, kao alternativa navedenim *in vivo* modelima, za istraživanje interakcija pro-, prebiotika, lekova, hrane, toksičnih supstanci i dr. sa mikrobiotom creva, primenjuju se *in vitro* modeli [100].

***In vitro* modeli** predstavljaju veoma pouzdane sisteme koje karakteriše odsustvo etičkog ograničenja, kraće trajanje procesa, niža cena kao i bolja ponovljivost [102]. Mogu oponašati različite regione GIT, a u slučaju simulacije procesa koji se odvijaju u debelom crevu, podrazumevaju primenu fekalnih uzoraka radi kultivacije mikrobiote u simuliranim i strogo definisanim fiziološkim uslovima [99]. Primenom ovih modela omogućeno je lako prikupljanje uzoraka kao i jednostavna manipulacija kontrolnih parametara. Manjkavost je što ovim modelima nedostaju imune i epitelne ćelije koje su od značaja za detaljnije razmevanje interakcija između mikroba i domaćina. Pomenuta ograničenja u potpunosti odražavaju složenost GIT, te stoga svakako ostaje prostora za unapređenje postojećih modela kako bi u budućnosti odgovorili na sva pitanja o digestiji i fermentaciji različitih komponenti i što bolje predvideli ishod kliničkih istraživanja. Prema složenosti, *in vitro* modeli se mogu podeliti na statičke i dinamičke modele GIT [103].

2.4.1. Statički modeli

Statički modeli se smatraju jednostavnim modelima [104] čija primena omogućava simulaciju procesa varenja u svakom od regiona GIT (usna duplja, želudac i creva), ali i procenu modulacije crevne mikrobiote, što ih čini pogodnim za preliminarna ispitivanja različitih bioaktivnih komponenti kao i za uspostavljanje polaznih hipoteza [103, 104]. U pogledu procene digestivne moći, zbog nedostatka standardizovanog protokola, u naučnoj literaturi su postojali neuporedivi podaci iz različitih studija. Upravo je to bio osnov za formiranje međunarodne mreže stručnjaka iz različitih zemalja i oblasti pod nazivom INFOGEST. Kao produkt njihovog rada, proistekao je INFOGEST protokol koji je i revidiran kako bi eksperimentalni parametri bili približniji sa fiziološkim *in vivo* uslovima [104]. Pomenuti protokol procene svarljivosti predviđa tačno definisane uslove u pogledu temperature, pH, vremena inkubacije, sastava minerala i žučnih soli za svaku od faza varenja koje uključuju i dodatak enzima [101].

I pored pomenutih prednosti, postoje i izraženi nedostaci zbog nemogućnosti za potpunim oponašanjem dinamike procesa varenja. Naime, u fazi koja simulira varenje u želucu, pH se održava konstantnim iako u realnim sistemima dolazi do fluktuacije usled punjenja i pražnjenja

želuca. Takođe, pojedini naučnici ističu da ovi modeli nisu idealni za ispitivanje svarljivosti ugljenih hidrata usled nedostatka hidrolitičkih enzima prisutnih u zidu creva [105]. Prema tome, pomenute slabosti čine metodu nedovoljno pouzdanom za detaljnu analizu digestibilnosti ugljenih hidrata [103]. Neki od ovih nedostataka se mogu prevazići korišćenjem ekstrakta tankog creva pacova koji sadrži smešu različitih hidrolitičkih enzima (izomaltaza, β -galaktozidaza, maltaza i trehalaza) imajući u vidu da se on smatra pogodnim zbog komercijalne dostupnosti, ali i naučnih dokaza da poseduje sličnu hidrolitičku aktivnost kao enzimi četkastog oboda tankog creva ljudi [106]. Pored ispitivanja digestibilnosti, pogodnim statičkim pristupom za testiranje različitih supstrata, pre svega na modulaciju mikrobne populacije, smatra se šaržna fermentacija. Ovaj statički model najčešće podrazumeva primenu anaerobnih boca inokuliranih fekalnim materijama ili čistim kulturama u kojima se dodaje supstrat za testiranje [99]. Iskorišćenje supstrata i nagomilavanje toksičnih metabolita koji mogu uticati na prisutnu mikrobiotu, diktira vreme trajanja procesa [107]. Ovi modeli se smatraju pogodnim za preliminarna ispitivanja modulacije crevne mikrobiote zbog svoje jednostavnosti i kratkog vremena simulacije procesa, ali poseduju i ograničene sličnosti sa *in vivo* uslovima.

2.4.2. Dinamički modeli

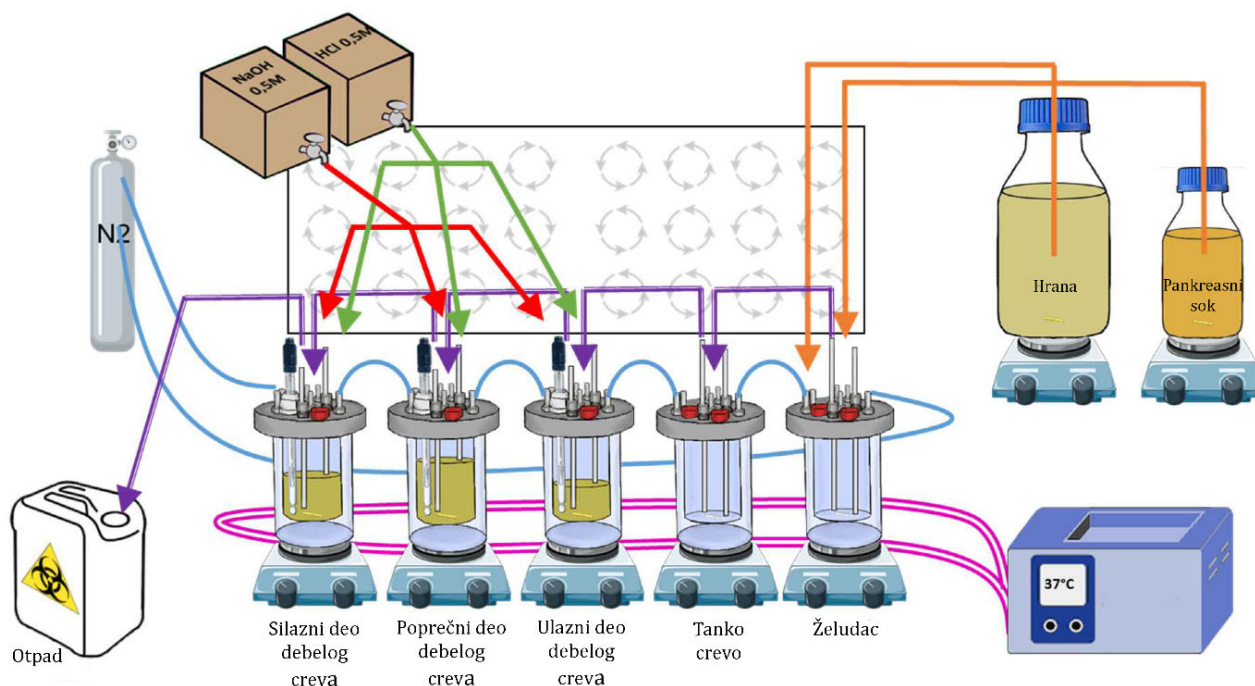
Imajući u vidu slabosti statičkih sistema, a i činjenicu da idealan *in vitro* model treba precizno da simulira hemijske, mehaničke i enzimske procese, da bude jeftin i jednostavan za rukovanje, sve je češća primena dinamičkih modela [108]. Dinamički modeli predstavljaju složene sisteme različitih konfiguracija i omogućavaju duže, a samim tim realnije, izlaganje aktivnog sastojka crevnim mikrobima. U poređenju sa statičnim modelima, ovi modeli pokazuju veću sličnost sa *in vivo* uslovima [107]. U dinamičke modele ubrajaju se Reading model, SHIME, SIMGI, TIM i drugi.

• Reading model

Među prvim modelima prijavljen je Reading model od strane Reading univerziteta u Engleskoj, koji simulira procese u debelom crevu [107]. Zbog saznanja da se debelo crevo sastoji od tri regiona, ovaj veoma jednostavan model je predstavljen kao trostepeni sistem koji čine serijski povezani sudovi u kojima je definisan pH, uspostavljena temperatura (37 °C) kao i anaerobni uslovi kontinualnim uvođenjem azota [99]. Konstruisan je tako da se sterilna podloga za kulturu preko jedne peristaltičke pumpe unosi u prvi sud, a destilovana voda ili mucin preko druge, odakle se sekvencijalno popunjavaju i ostali sudovi [109]. Svaka faza je inokulisana fekalnom suspenzijom. Ovaj model se smatra pristupačnim i jednostavnim za rukovanje, a omogućava dobijanje izlaznih podataka o sastavu mikrobiote i produkciji SCFA [107].

• SHIME model

SHIME (*eng. Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem*) predstavlja simulator celog GIT koji je patentiran od strane kompanije ProDigest i Univerziteta u Gentu [107]. Ovaj kompjuterski kontrolisan sistem se sastoji od pet bioreaktora koji simuliraju procese varenja u želucu, tankom i debelom crevu (ulazni, poprečni i silazni deo) [110]. Bioreaktori su u vidu staklenih posuda u kojima je omogućeno neprekidno mešanje, temperatura od 37 °C kao i anaerobni uslovi upotrebom azota (slika 2.8.). U početni bioreaktor koji simulira želudac se tri puta dnevno iz posebnih sudova unose hrana i pankreasni sok (mešavina soli) kako bi se oponašao unos hrane, ali i varenje [107, 110].



Slika 2.8. Šematski prikaz SHIME modela. Preuzeto i prilagođeno iz [110]

Izvor mikroorganizama u bioreaktorima koji predstavljaju debelo crevo je obezbeđen unosom ljudskog fekalnog materijala nakon čega je neophodan određen period (najčešće 14-21 dan) za stabilizaciju mikrobiote kako bi došlo do uspostavljanja ravnoteže između fekalnih mikroba [99, 107]. U svakom sudu je održavan određen nivo pH odražavajući u što većoj meri *in vivo* uslove. Opisana konfiguracija svrstava ovaj sistem među najkompletnije dostupne modele za proučavanje efekta različitih komponenti na crevnu mikrobiotu. Ovaj model omogućava dobijanje informacija o različitom profilu mikrobiote, proizvodnji SCFA, koje su od značaja za što bolje sagledavanje uticaja aktivnih sastojaka na crevne mikrobe [110]. SHIME poseduje i mogućnost proširenja dodavanjem mukoznog dela koji bi simulirao mikrookruženje zida crevnog sistema. U takvom obliku poznat je kao M-SHIME®.

• SIMGI model

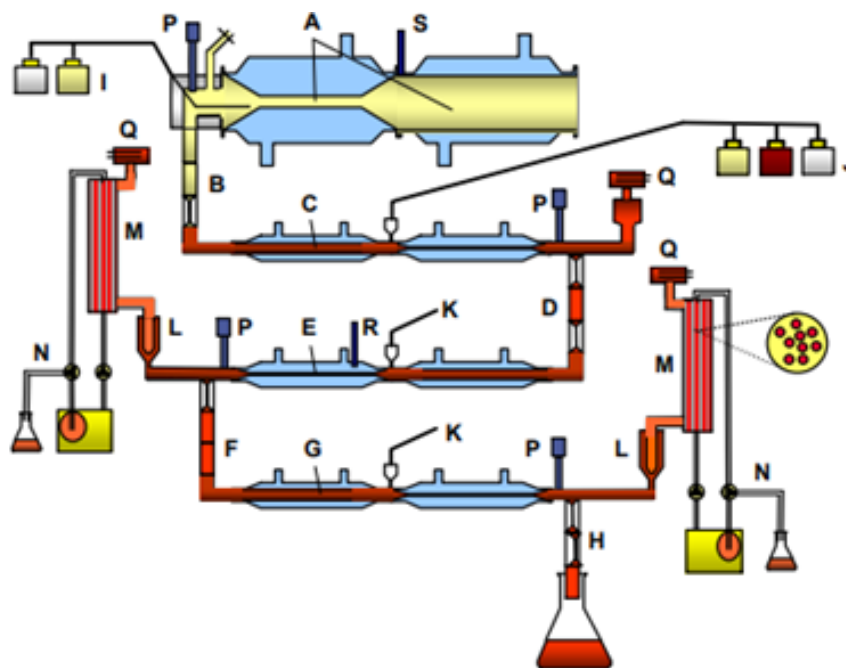
SIMGI (*eng. SIMulator Gastro-Intestinal*) model je razvijen na Institutu za nauku o hrani (CIAL) u Madridu. Takođe predstavlja automatizovan sistem koji simulira ceo GIT i koji se poput SHIME modela sastoji od pet reaktora od kojih svaki predstavlja određen region (želudac, tanko crevo i tri glavna dela debelog creva) [107]. Reaktori su međusobno povezani peristaltičkim pumpama, a preko određenog softverskog programa prisupa se njihovoj manipulaciji. Ovaj sistem omogućava simulaciju peristaltike želuca tako što se jedinica koja predstavlja ovaj deo sastoji od dva metakrilatna modula koja su odvojena omotačem u koji se upumpava voda omogućavajući mešanje sadržaja želuca. Promenom pritiska vode omogućena je simulacija peristaltičkih pokreta. Jedinica želuca poseduje i različite priključke za unos hrane i želudačnog soka [107]. Preostali delovi ovog modela su predstavljeni u vidu staklenih reaktorskih sudova u kojima se obezbeđuje adekvatna temperatura i održava pH dodavanjem 0,5M NaOH i 0,5M HCl, a poseduju i elemente preko kojih je omogućeno uzorkovanje svake faze. Sudovi koji predstavljaju debelo crevo se inokuliraju fekalnom mikrobiotom, za čiju je stabilizaciju neophodno 14 dana nakon čega se stvara pogodno mikrobno okruženje za izvođenje eksperimenata [111]. Pored toga što ovaj sistem omogućava digitalno praćenje i preciznu kontrolu radnih parametara koji se mogu podesiti u smeru ekvivalentnosti fiziološkim uslovima, prednost ovog sistema se ogleda i kroz realizaciju peristaltičkih pokreta i kontrolisanog pražnjenja želuca i tankog creva [111].

• TIM modeli

TIM predstavlja patentirane kompjuterski kontrolisane *in vitro* modele razvijene u Holandiji. Razlikuju se TIM-1 i TIM-2 model, pri čemu prvi simulira procese od želuca do tankog creva, a drugi se odnosi na debelo crevo. Njihovom kombinacijom pokriven je celi GIT.

TIM-1 model

Za procenu svarljivosti i biodostupnosti bioaktivnih komponenti među kojima se ubrajaju i prebiotici pristupa se primeni dinamičkog TIM-1 modela.

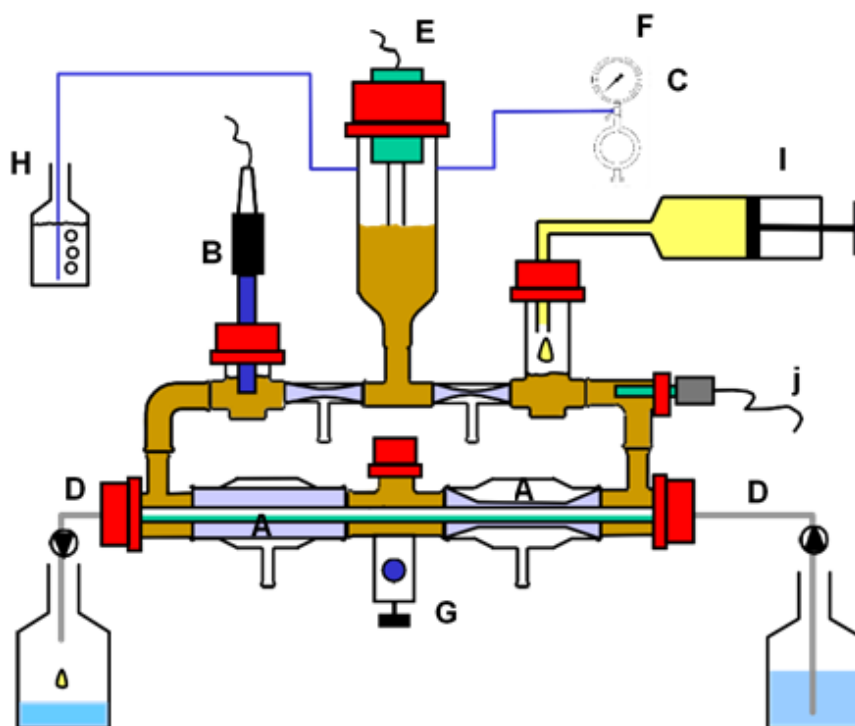


Slika 2.9. Šematski prikaz TIM-1 modela sa svim sastavnim delovima (A-segment želuca, B-mišićni ventil, C-segment dvanaestopalačnog creva, D-peristaltički ventil, E-segment centralnog dela tankog creva, F-peristaltički ventil, G-segment završnog dela tankog creva, H-ventil, I-prihvatni sud za želudačnu tečnost i J-prihvatni sud za dvanaestopalačno crevo, K-lučenje bikarbonata, L-filter, M-sistem za filtraciju, N-filtrat, P-pH elektrode, Q-senzor nivoa, R-temperaturni senzor, S-senzor pritiska). Preuzeto i prilagođeno iz [112].

Iako simulira želudac i tanko crevo, ovaj model podrazumeva prisustvo četiri segmenta jer su delovi tankog creva (dvanaestopalačno crevo, jejunum i ileum) dizajnirani u posebne odeljke (slika 2.9) [112]. Na ovaj način omogućena je precizna kontrola procesnih parametara (fiziološke temperature i pH) u svakom segmentu. Kako TIM-1 obezbeđuje i peristaltičko mešanje naizmeničnim pritiskom na fleksibilne zidove, ali i prisustvo membrana preko kojih je omogućena dijaliza, sasvim je izvesno da je proces simulacije varenja moguće izvesti veoma približno *in vivo* uslovima.

TIM-2 model

S obzirom na to da TIM-2 model simulira debelo crevo, smatra se pogodnim za dobijanje korisnih informacija i dublje razumevanje interakcija prebiotika sa crevnom mikrobiotom. Projektovan je tako da sadrži četiri nezavisna radna segmenta koji se mogu pokrenuti paralelno (sastavni delovi jedne jedinice su označeni na slici 2.10). Imajući u vidu da svaki segment može sadržati isti fekalni inokulum, omogućeno je i simultano ispitivanje različitih aktivnih sastojaka čiji krajnji rezultati mogu biti poredivi [113].



Slika 2.10. Šematski prikaz individualne jedinice TIM-2 modela sa sastavnim delovima (A-peristaltički odeljci, B-pH elektroda, C-alkalna pumpa, D-cirkulacija dijalizata sa membranom, E-senzor nivoa tečnosti, F-ulaz za gas, G-deo za uzorkovanje, H-izlaz gasa, I-špric za hranu i J-temperaturni senzor). Preuzeto i prilagođeno iz [114].

Ovaj sistem takođe ilustruje simulaciju crevne peristaltike obezbeđujući uniformno mešanje. Ono što TIM-2 model izdvaja od prethodno pomenutih i ujedno još više približava ljudskim sistemima, jeste postojanje membrane za dijalizu koja ilustruje odvođenje određenih metabolita u organizam čime je sprečena akumulacija toksičnih materija, a ujedno i inhibicija mikrobne aktivnosti [113]. Pomoću temperaturnih i pH sonde omogućeno je dobijanje informacija o ovim radnim parametrima, dok se rastvorom NaOH održava određen nivo pH (5,8). Promena radnih parametara se prati preko kompjutera, pomoću posebno dizajniranog softvera. U svakoj od radnih jedinica, za izvođenje eksperimenata neophodno je uvođenje posebno pripremljenog medijuma – SIEM (*eng. Standard Ileal Efflux Medium*) koji predstavlja smešu ugljenih hidrata, proteina, žučnih soli, vitamina i minerala, kao i uvođenje suspenzije ljudske crevne mikrobiote [107]. Naime, za stabilizaciju i adaptaciju unete mikrobiote, neophodno je 16 h nakon čega se pristupa fazi izgladnjivanja u trajanju od 2h, a potom sledi unos testiranih jedinjenja čiji eksperimentalni period traje 72 h [107]. Literaturni navodi da su dobijeni eksperimentalni podaci iz TIM-2 modela veoma slični sa rezultatima kliničkih ispitivanja [115] dodatno doprinose značaju ovog modela u pogledu unapređenja znanja o interakciji komponenata hrane i ulozi crevnih mikroba.

2.4.3. *In vitro* modeli u analizi svarljivosti i prebiotske aktivnosti FOS

Do sada su ispitani različiti statički i dinamički *in vitro* modeli radi dobijanja informacija o svarljivosti potvrđenih i/ili potencijalnih prebiotika, ali i o razjašnjenju njihovog uticaja na pripadnike crevne mikrobiote. Pregled primene FOS dobijenih iz različitih izvora, prikazan je u tabeli 2.3. U dostupnim naučnim publikacijama koje su imale za cilj procenu efekta ovih potvrđenih prebiotika na crevne mikrobe primenjeni su dinamički modeli SHIME i TIM-2. U slučaju primene TIM-2 modela postoje podaci o testiranju smeše FOS i inulina [116], ali ne i o uticaju kratkolančanih FOS. Stoga, rezultati dobijeni testiranjem prečišćene smeše FOS, u čiji

sastav ulaze kestoza, nistoza i 1-fruktofuranozil nistoza, korišćenjem TIM-2 modela će biti prikazani i razmatrani u okviru ove doktorske disertacije.

Tabela 2.3. Pregled dostupne literature o primeni FOS iz različitih izvora u in vitro modelima GIT

Tip procesa	Izvor FOS	Primenjeni tip modela	Naziv modela	Ishod	Ref.
Svarljivost	FOS (smeša kestoze i nistoze)	Statički	Ekstrakt iz tankog creva pacova	Visoka otpornost na varenje	[117]
	FOS iz <i>Aspergillus ibericus</i> , FOS iz <i>Aureobasidium pullulans</i> Raftilose® P95	Statički	INFOGEST	Visoka otpornost (>93%) na varenje	[118]
	FOS iz <i>Penicillium citreonigrum</i>	Statički	INFOGEST	Visoka otpornost (>90%) na varenje	[119]
Fermentacija	FOS iz saharoze	Dinamički	SHIME	Značajno povećanje laktobacila	[120]
	Komercijalna smeša FOS	Dinamički	SHIME	Značajno povećanje laktobacila i bifidobakterija	[121]
	FOS iz cikoriije (smeša FOS i inulina)	Dinamički	TIM-2	Značajna produkcija SCFA	[116]

2.5. Enzimska sinteza FOS

2.5.1. Izvor enzima

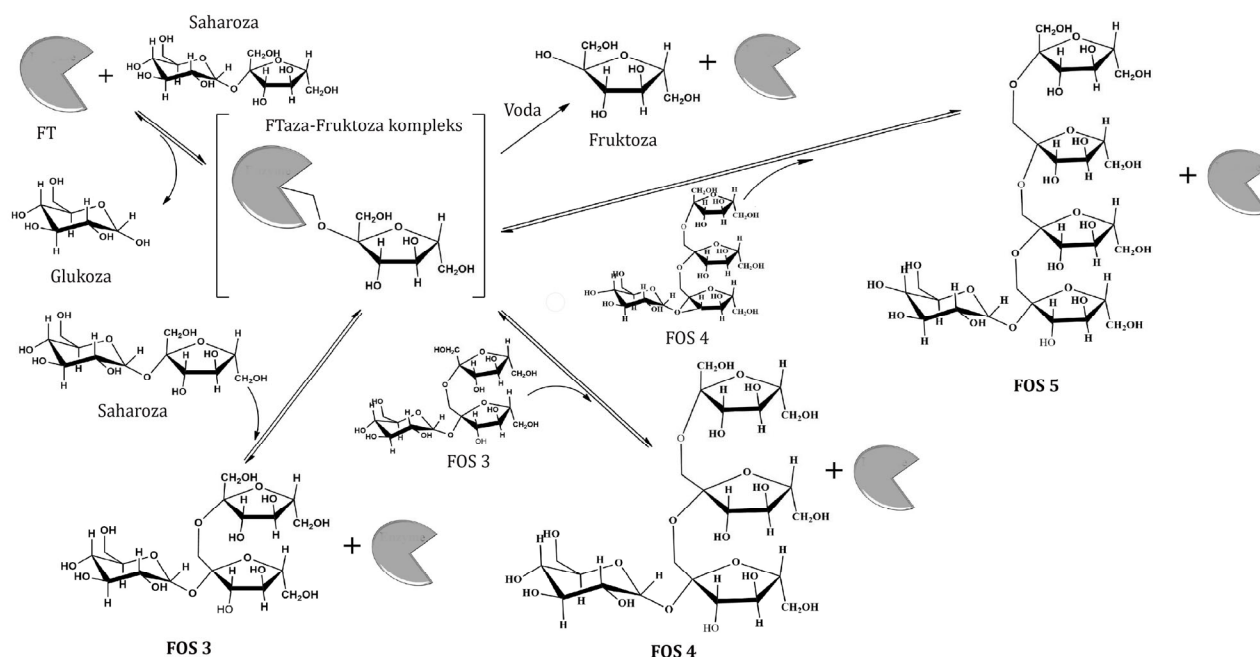
Uspešnost izvođenja sinteze FOS zavisi od izvora iz kojeg se može dobiti enzim jer direktno utiče na prinos željenog proizvoda. Enzimi koji se koriste za proizvodnju FOS mogu se naći u biljkama, gljivama i bakterijama [38]. Pre oko četiri decenije, Hidaka i sar. su prijavili enzim sa izraženom transfruktozilacionom aktivnošću upotrebom celih ćelija gljive *A. niger* ATCC 20611 i dobili maksimalan prinos FOS od 55-60 %, nakon čega je enzim upotrebljen i za industrijsku proizvodnju [122]. Nakon toga, Čen (Chen) je sa sar. proizveo FOS korišćenjem ćelija *A. japonicus*-a [123], dok su Antošova i sar. prijavili proces proizvodnje FOS korišćenjem enzima iz *A. pullulans* CCY 27-1-94 [124]. Vega-Paulino i Zuniga-Hansen su ispitivali komercijalne enzimске preparate sa globalnog tržišta i ustanovili da FT iz preparata Viscozyme L (*A. aculeatus*), Pectinex Smash (*A. aculeatus/A. oryzae*) i Rohapect CM (*Trichoderma reesei*) imaju odgovarajući odnos transfruktozilacione i hidrolitičke aktivnosti kao i da su pogodne za dalju primenu [125]. Izvesno je da je za potrebe dobijanja FOS isplativije koristiti već postojeće komercijalne industrijske preparate u poređenju sa primenom čistih enzima čije dobijanje predstavlja zahtevan postupak koji uključuje produkciju, izolaciju i prečišćavanje, a ujedno rezultira i većom cenom krajnjeg proizvoda.

2.5.2. Mehanizam odvijanja reakcije

Dobijanje FOS procesom enzimске sinteze polazeći od saharoze podrazumeva primenu enzima β -D-fruktoziltransferaze (FT, EC 2.4.1.9) ili β -fruktofuranozidaze (FF, EC 3.2.1.26). Neki istraživači koriste sistemski naziv fruktoziltransferaze [38], dok drugi koriste izraz β -fruktofuranozidaze za označavanje enzima odgovornih za reakciju transfruktozilacije [126]. Iz tog razloga u naučnoj zajednici i dalje postoji spor oko nomenklature enzima koji proizvode FOS [1]. Postoje tvrdnje da oba enzima poseduju i transfruktozilacionu i hidrolitičku aktivnost. FT imaju izraženu transfruktozilacionu aktivnost za razliku od FF koje je ispoljavaju isključivo u prisustvu visokih koncentracija saharoze, dok u uslovima niskih koncentracija dominira njihova hidrolitička aktivnost [127]. Hidrolitička aktivnost FT koju poseduju je uglavnom veoma niska, zbog niskog afiniteta prema vodi kao akceptoru. Vodeći se time, FT se smatraju efikasnijim enzimima za primenu u procesima enzimске sinteze zbog izražene transfruktozilacione aktivnosti u odnosu na hidrolitičku. Naučni radovi na ovom polju sugerišu da je veoma mali broj enzima koji imaju pogodan nivo transfruktozilacione aktivnosti za industrijsku implementaciju [125].

Pojedini autori su opsežno razmatrali reakciju transfruktozilacije i naveli da se odvija prema mehanizmu dvostrukog pomeranja (ping-pong) [128] za koji je karakteristično da enzim postoji u više stabilnih stanja kao i da se jedan proizvod formira i oslobađa pre vezivanja drugog [129]. Naime, predloženo je da sinteza FOS najpre počinje raskidanjem β -(2,1)-glikozidne veze donorskog supstrata (saharoze) pri čemu dolazi do oslobađanja glukoze i formiranja supstituisanog enzima tj. kompleksa enzima i fruktoze uspostavljanjem kovalentnih veza [128]. U narednom koraku dolazi do transfera fruktozne jedinice na širok spektar različitih akceptora i vraćanja enzima u inicijalno stanje.

Može doći do reakcije hidrolize (u manjoj meri) prenosom fruktoze na molekul vode ili do reakcije sinteze ukoliko se kao akceptor koristi drugi molekul saharoze ili prethodno sintetisani FOS, stvarajući složenu smešu FOS (slika 2.11) [38, 128].



Slika 2.11. Šematski prikaz delovanja FT u reakciji transfruktozilacije

Po završetku reakcije, reakciona smeša sadrži u najvećoj količini FOS različitih stepena polimerizacije, zatim glukozu koja se oslobađa kao nusprodukt kao i neznatne količine fruktoze i neproreagovale saharoze. Sam proces produkcije potvrđenih prebiotika (FOS) je veoma složen jer uključuje odvijanje simultanih i paralelnih reakcija i sinteze i hidrolize iz razloga što sintetisani FOS u prvim koracima deluju kao akceptori, dovodeći do formiranja jedinjenja višeg stepena polimerizacije, a potom i kao donori fruktoznih jedinica stvarajući jedinjenja nižeg stepena polimerizacije [3]. Međutim, optimizacijom reakcionih parametara enzimske sinteze moguće je favorizovati u nekoj meri reakciju transfruktozilacije, tj. uticati da transfruktozilaciona aktivnost bude dominantnija u odnosu na hidrolitičku.

Jedan od prvih pristupa kojim se može matematički opisati mehanizam reakcije transfruktozilacije je opisao Jung sa sar. i naveo da je dobijanje proizvoda posledica uzastopnih lančanih reakcija [130]. Autori su koristili saharozu i FT iz gljive *Aureobasidium pullulans* i opisali da mehanizam prate disproporcionalne reakcije s obzirom na to da u formiranju proizvoda tj. glukoze i FOS 3 učestvuju dve jedinice saharoze, jer ovaj molekul deluje i kao akceptor i kao donor. Predloženi mehanizam su opisali sledećom opštom jednačinom:



Ukoliko n iznosi 1, GF se odnosi na saharozu, G na glukozu, a GF_2 na FOS 3

Poznato je da od upotrebljenog mikroorganizma (odgovornog za produkciju enzima) zavisi i mehanizam reakcije transfruktozilacije [131]. Prema tome, pojedini autori su koristili pomenuti model za razmatranje sinteze FOS korišćenjem gljive *Aspergillus oryzae* [131] ili gljive iz roda *Rhodotorula* [132], dok su Nišizava (Nishizawa) i sar. u svojoj naučnoj publikaciji opisali upotrebu enzima iz gljive *Aspergillus niger* i predložili mehanizam koji obuhvata i dodatne korake uključene u tok sinteze [133].

Uzimajući u obzir da do produkcije FOS 4 može doći ne samo upotrebom FOS 3 kao akceptora i donora, već donor fruktozne jedinice može biti i saharoza, mehanizam su predstavili sledećim pojedinačnim reakcijama [133]:



GF_3 se odnosi na FOS 4, a GF_4 na FOS 5.

Detaljnijom analizom reakcije transfruktozilacije, prijavljeno je da postoji i inhibitorski efekat glukoze i fruktoze [132, 133]. Naime, Nišizava i sar. su došli do saznanja da se interakcija između enzima i supstrata može smanjiti sa povećanjem broja fruktoznih jedinica [133], a Alvarado-Hualanko (Alvarado-Huallanco) i Maugeri Filjo (Maugeri Filho) su prijavili da fruktoza deluje kao inhibitor u koncentraciji većoj od 50 % usled čega je njen inhibitorski efekat zanemarljiv u poređenju sa glukozom čije prisustvo značajno inhibira sintezu FOS [132, 133]. Pomenuta saznanja su svakako ključna radi boljeg razumevanja mehanizma i same reakcije koja vodi ka produkciji ciljanih bioaktivnih oligosaharida.

2.5.3. Uticaj reakcionih faktora

Kao što je pomenuto u prethodnom poglavlju, optimizacijom reakcionih parametara može se uticati na tok reakcije enzimske sinteze, a samim tim i na sastav reakcione smeše. Među najznačajnijim reakcionim parametrima čijim se podešavanjem može dobiti reakciona smeša željenog sastava FOS smatraju se pH, temperatura, početna koncentracija saharoze, izvor i koncentracija enzima, kao i vreme trajanja reakcije.

2.5.3.1. Uticaj pH i temperature

Optimalne vrednosti parametara poput temperature i pH zavise isključivo od izvora enzima koji se koristi u reakcijama sinteze. Reakcije koje zahtevaju upotrebu FT se mogu izvoditi u širokom rasponu pH (3,0-7,0) pri temperaturi od 35 do 70 °C. Podaci iz dostupnih naučnih publikacija ukazuju da je za FT optimalna vrednost temperature između 40 i 60 °C, dok je optimalan pH između 4,5 i 6,5 [38]. Na osnovu eksperimentalnih analiza ustanovljeno je da porast temperature u reakcionom sistemu nema značajan uticaj na ukupnu koncentraciju proizvoda tokom konverzije saharoze, ali da itekako ima uticaj na brzinu reakcije. U skladu sa tim, Vega-Paulino i Zuniga-Hansen su ispitali uticaj temperature u rasponu od 45-60 °C i utvrdili da porast reakcione temperature izaziva povećanje početne brzine reakcije [125]. Takođe, prijavljeno je i da izvođenje reakcije na temperaturi iznad 60 °C može izazvati termička oštećenja enzima što ima za posledicu i značajno smanjenje njegove aktivnosti [126]. Kada je pH u pitanju, ustanovljeno je da ovaj parametar veoma blago utiče na prinos proizvoda [125], dok ima veoma izražen uticaj na jonizaciju aminokiselina, utičući na taj način na primarnu i sekundarnu strukturu enzima, posledično i na njegovu aktivnost, a posledično i na brzinu odvijanja reakcije [38].

2.5.3.2. Uticaj početne koncentracije saharoze

Parametar koji ima značajan uticaj na sastav dobijene smeše jeste koncentracija saharoze. Dostupna veća početna koncentracija saharoze stimuliše proizvodnju FOS nižeg stepena polimerizacije, tj. FOS 3 i FOS 4 uz nisku proizvodnju glukoze, dok niže koncentracije indukuju stvaranje FOS većeg stepena polimerizacije (FOS 5) uz izdvajanje veće količine glukoze [38]. Uzimajući u obzir činjenicu da jači prebiotski efekat ispoljavaju FOS sa nižim stepenom polimerizacije, manipulacijom ovog parametra može se dobiti smeša FOS željenog hemijskog sastava [38]. U uslovima visoke koncentracije saharoze, favorizovana je reakcija sinteze FOS 3 uz oslobađanje glukoze sve do dostizanja maksimalnog stepena konverzije supstrata, nakon čega koncentracija FOS 3 počinje da opada usled sinteze FOS 4. Različiti autori izveštavaju da FOS 4 ne može da deluje kao supstrat za dobijanje FOS 5 dok su saharoza i FOS 3 prisutni u većim koncentracijama u reakcionom medijumu. Imajući u vidu da FOS 4 deluje i kao donor i kao akceptor fruktoznih jedinica, može se zaključiti da je sinteza FOS 5 uslovljena kinetikom nastanka FOS 4 [134]. U literaturi se navodi da je FOS 5 proizveden sa većom efikasnošću pri nižim početnim koncentracijama saharoze (100 i 200 g/L), dok je u reakcionim medijumima većih koncentracija (400 i 600 g/L) primećena manje efikasna sinteza tetra- i pentasaharida [134]. Treba istaći da se do ovog zaključka dolazi ukoliko se reakcije izvode pri identičnoj koncentraciji enzima i posmatraju u istom vremenskom periodu, jer je vreme trajanja takođe veoma važan kontrolni parametar koji diktira prinos finalnog proizvoda, odnosno reakcija je kinetički kontrolisana. Ukoliko bi vreme trajanje reakcije sa većom početnom koncentracijom saharoze bilo duže, moglo bi se očekivati da bi zbog hidrolize koja preovladava, došlo do veće produkcije FOS 5.

2.5.3.3. Uticaj koncentracije enzima

Koncentracija enzima je faktor koji ne utiče u velikoj meri na maksimalan prinos proizvoda o čemu svedoče brojni literaturni podaci, već utiče samo na brzinu enzimske reakcije kako je i očekivano. Upotrebom većih koncentracija, ostvaruje se veća početna brzina reakcije pa se samim tim očekuje i kraće vreme postizanja maksimalnog prinosa [134]. Sa aspekta industrije, poželjnija je upotreba nižih koncentracija enzima zbog njihove visoke tržišne cene ili produžena primena u imobilisanoj formi. Optimalni parametri pojedinih enzimskih smeša i FT iz različitih mikrobnih izvora predstavljeni su u tabeli 2.4.

Tabela 2.4. Pregled optimalnih uslova sinteze FOS korišćenjem FT iz različitih izvora

Izvor enzima	T, °C	pH	Konc. saharoze, %	Prinos FOS, %	Vreme, h	Ref.
Komercijalna smeša						
Rohapect CM	50	5,5	53,6	62,6	6	[125]
Viscozyme® L	50	5,5	53,6	58,8	6	[125]
Pectinex Smash	50	5,5	53,6	59,1	6	[125]
Seqenzym® FT	55	5,5	30,0-68,0	63,0	2	[135]
Mikroorganizam						
<i>Aspergillus aculeatus</i>	60	5,6	40,0	55,0	4	[136]
<i>Aspergillus oryzae</i>	60	5,5	75,0	>57,0	8	[131]
<i>Rhodotorula sp.</i>	50	4,5	50,0	57,0	24	[132]
<i>Penicillium citreonigrum</i>	35	6,0	20,0	65,0	67	[119]
<i>Aspergillus ibericus</i>	37	6,2	11,7	64,0	38	[137]
<i>Aureobasidium pullulans</i>	32	6,5	20,0	64,7	40-50	[138]

2.5.4. Fruktoziltransferaze

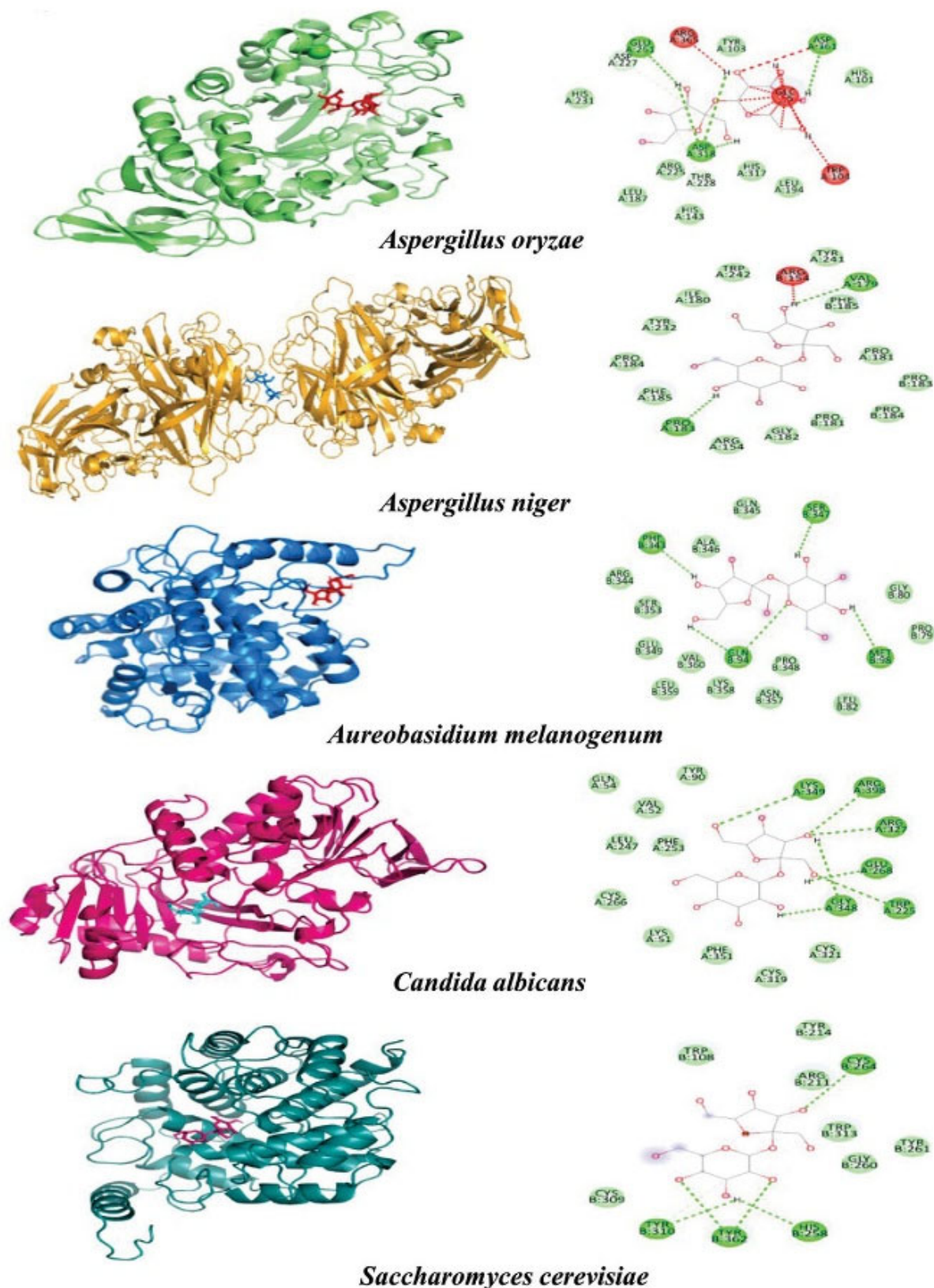
Enzimi poput FT, se mogu dobiti iz biljnih izvora, bakterija ili gljiva [66, 139]. Biljne vrste koje sadrže FOS poseduju enzime koji učestvuju u njihovoj produkciji. Uglavnom sadrže FT koje sintetišu različite tipove FOS (inulin, neo i levan tip). Budući da je izolovanje i prečišćavanje enzima iz biljaka veoma zahtevno, najčešće se preferira produkcija FT iz mikroorganizama [66]. Nekoliko autora je opisalo da pojedini mikroorganizmi mogu sintetisati enzime i izlučiti ih van ćelije (ekstracelularni enzimi) ili ih mogu zadržati u ćeliji (intracelularni enzimi). U skladu sa tim, mikrobne FT mogu biti proizvedene kao ekstracelularni i kao intracelularni enzimi od strane različitih sojeva bakterija i gljiva [68], što je i sumirano u tabeli 2.5.

Tabela 2.5. Lista bakterija i gljiva sa transfruktozilacionom aktivnošću [66, 139]

Bakterijske vrste	Mesto produkcije	Filamentozne gljive	Mesto produkcije
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Intra- i ekstracelularni	<i>Aspergillus aculeatus</i>	Ekstracelularni
<i>Bacillus velezensis</i>	Intracelularni	<i>Aspergillus flavus</i>	Ekstracelularni
<i>Priestia aryabhatai</i>	Ekstracelularni	<i>Aspergillus japonicus</i>	Intra- i/ili ekstracelularni
<i>Paenibacillus macerans</i>	Ekstracelularni	<i>Aspergillus niger</i>	Ekstracelularni
<i>Priestia megaterium</i>	Intracelularni	<i>Aspergillus oryzae</i>	Ekstracelularni
<i>Bacillus subtilis</i>	Intracelularni	<i>Aspergillus phoenicis</i>	Intracelularni
<i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i>	Intracelularni	<i>Aspergillus terreus</i>	Ekstracelularni
<i>Limosilactobacillus panis</i>	Intracelularni	<i>Aspergillus foetidus</i>	Ekstracelularni
<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	Intra- i/ili ekstracelularni	<i>Talaromyces islandicus</i>	Ekstracelularni
<i>Leuconostoc citreum</i>	Ekstracelularni	<i>Talaromyces rugulosus</i>	Ekstracelularni
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Intracelularni	<i>Penicillium citrinum</i>	Intra- i/ili ekstracelularni
<i>Streptococcus mutans</i>	Ekstracelularni	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Intra- i ekstracelularni
<i>Streptococcus salivarius</i>	Ekstracelularni	<i>Rhodotorula sp.</i>	Ekstracelularni
<i>Zymomonas mobilis</i>	Ekstracelularni		
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Intracelularni		

Najistraženiji mikroorganizmi koji učestvuju u produkciji enzima jesu filamentozne gljive iz rodova *Aspergillus*, *Penicillium*, *Aureobasidium*, *Rhizopus*, *Fusarium* i *Neurospora* [139]. Postoji nekoliko izveštaja da se za produkciju FOS mogu koristiti i kvasci, i to najčešće iz rodova *Saccharomyces*, *Rhodotorula* i *Candida*, ali i da imaju tendenciju ka produkciji FF, kod kojih pored transfruktozilacione, postoji izražena i hidrolitička aktivnost [68, 138-140]. U zavisnosti od mikrobnog producenta, dobijaju se i različite smeše FOS, pa stoga upotrebom FT iz

filamentoznih gljiva uglavnom nastaju oligosaharidi inulinskog tipa, dok iz kvasaca imaju tendenciju ka sintezi oligosaharida neo i levanskog tipa [141]. Strukturni detalji i katalitičke razlike nekoliko različitih FT iz filamentoznih gljiva i kvasaca prikazani su na slici 2.12 [142].



Slika 2.12. Prikaz različitih struktura pojedinih gljivičnih FT nakon spajanja sa saharozom (levo) i interakcija saharoze i prisutnih aminokiselina unutar aktivnog centra enzima (desno). Preuzeto i prilagođeno iz [142]

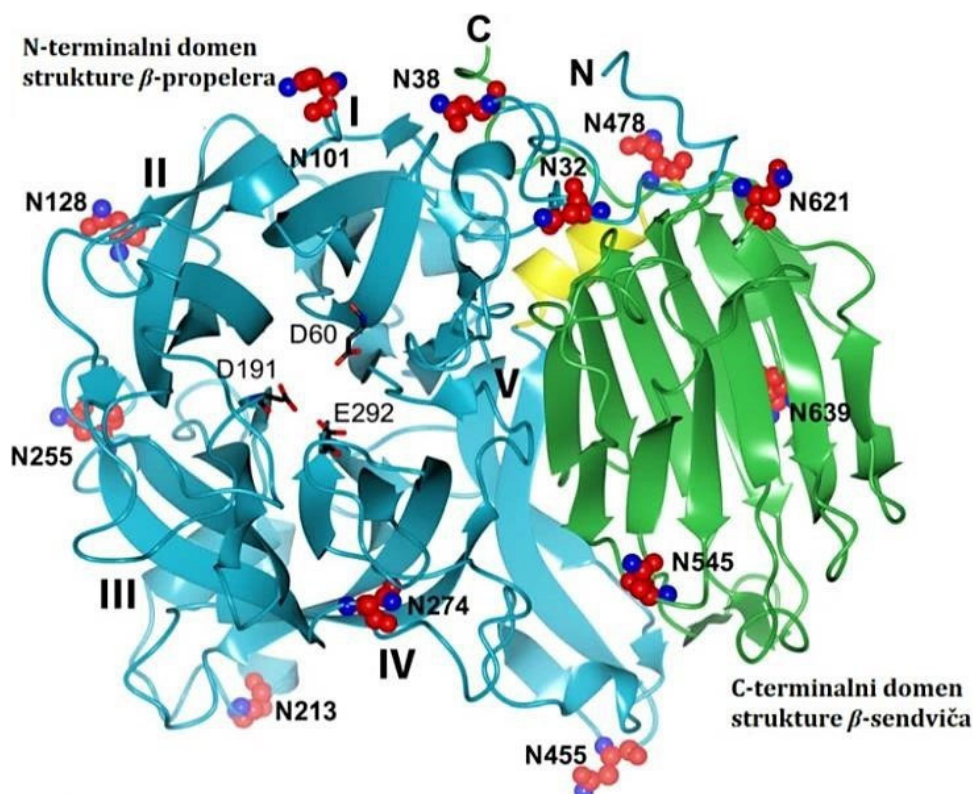
Što se tiče bakterija, najviše su proučavani laktobacili, kao i bakterijski rodovi *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Zymomonas* i *Acetobacter* [139], dok je popriličan broj FT izolovan iz mlečno-kiselinskih probiotskih bakterijskih vrsta *Limosilactobacillus reuteri* (stari naziv *Lactobacillus reuteri*), *Lactobacillus johnsonii* i *Lactobacillus gasseri* [66]. Studije istraživača pokazuju da iako postoji veliki broj mikroorganizama koji mogu proizvoditi enzime odgovorne za biokonverziju saharoze i produkciju FOS, samo nekoliko FT poseduje visok potencijal za industrijsku primenu. Primećeno je da gljivične imaju veći proizvodni kapacitet FOS u poređenju sa bakterijskim FT [80]. Pored toga što su se pokazali kao dobri proizvođači enzima, ogromnu pažnju privlače *Aspergillus* vrste budući da poseduju GRAS status. Mikrobnii sojevi poput *A. niger*, *A. japonicus*, *A. oryzae* i *A. aculeatus* poseduju izraženu transfrukozilacionu aktivnost zbog čega se smatraju veoma perspektivnim industrijskim proizvođačima [127].

Prema CAZy (Carbohydrate-Active Enzyme) bazi podataka koja klasifikuje enzime na osnovu njihove katalitičke funkcije prema ugljenim hidratima i sličnosti sekvenci aminokiselina [139], svi enzimi koji se koriste za sintezu FOS pripadaju familiji glikozil-hidrolaza (GH) i samim tim ulaze u sastav subfamilija GH32 ili GH68. FT koje potiču iz biljaka ili gljiva pripadaju subfamiliji GH32, dok one iz bakterija ulaze u sastav GH68 [38]. Katalitička i fizičko-hemijska svojstva FT isključivo zavise od mikroorganizma koji ih proizvodi i variraju u zavisnosti od vrste. Shodno tome, gljivične FT imaju molekulsku masu od 60 do 75 kDa, bakterijske između 45 i 65 kDa, dok FT proizvedene od bakterija mlečne kiseline od 60 do 170 kDa [66].

Prepoznato je da FT koje pripadaju subfamiliji GH32 imaju karakterističnu strukturu koja se sastoji od N-terminalnog katalitičkog domena koji sadrži pet krakova strukture β -propelera i koji je povezan sa C-terminalnim domenom strukture β -sendviča. U unutrašnjosti N-terminalnog domena nalazi se aktivni centar [38].

2.5.4.1 Fruktoziltransferaza iz *Aspergillus aculeatus*-a

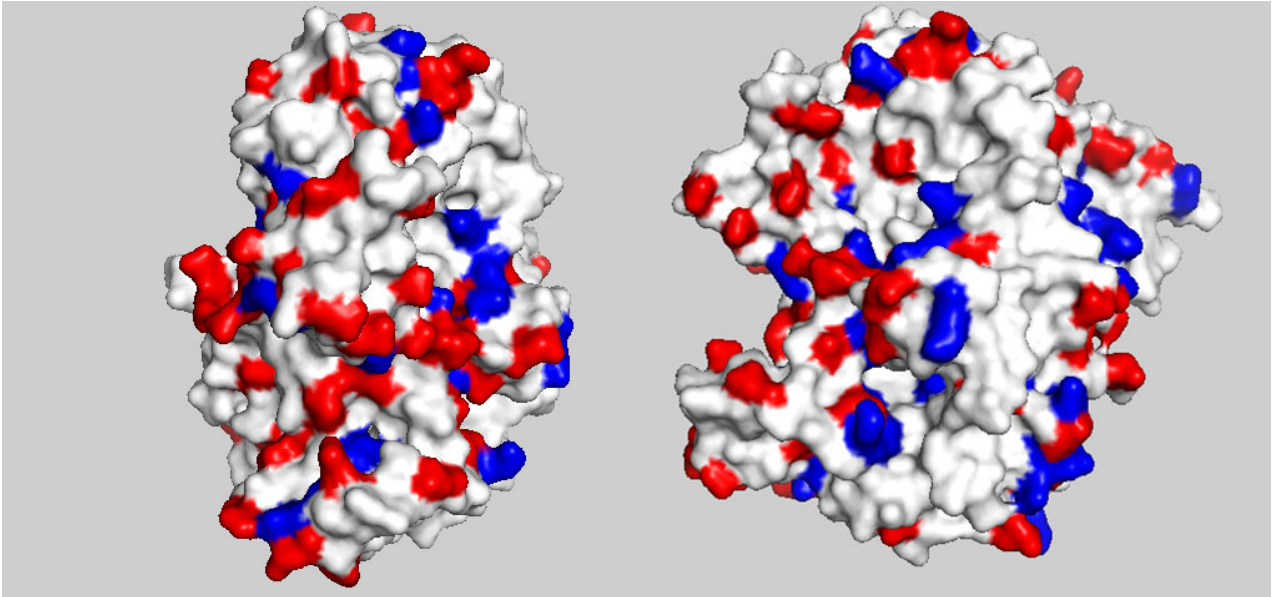
Iako FT iz *A. aculeatus*-a poseduju termičku i pH stabilnost kao i izuzetnu aktivnost za produkciju FOS zbog čega se smatraju veoma pogodnim za industrijsku implementaciju, ne postoji mnogo literaturnih podataka koji opisuju njihovu strukturu. Navodi se da su sekvence aminokiselina i dalje nepoznate, ograničavajući pokušaje proizvodnje rekombinantnih proteina kao i proučavanje njihovih molekularnih i strukturnih karakteristika. U cilju razjašnjenja strukture, grupa naučnika se bavila identifikacijom i karakterizacijom FT izolovane iz smeše enzima gljivice *A. aculeatus*. Kao rezultat dobijena su dva oblika ovog enzima, FT1 i FT2 koji su proizveli identične oblike FOS sa značajnom sposobnošću transfruktozilacije [143]. Primećene su neznatne razlike u optimalnom pH i temperaturi, koje se mogu pripisati glikozilaciji, s obzirom da se smatra da FT1 ima niži stepen glikozilacije u odnosu na FT2. Upotrebom BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sistema čija je osnovna namena upoređivanje bioloških sekvenci, utvrđena je identičnost sekvenci FT1 i FT2 sa kodirajućom sekvencom Aspac1_37092. Ova kodirajuća sekvenca odgovara pretpostavljenoj FT koja sadrži 654 aminokiselinska ostatka. Primećeno je da FT1 i FT2 poseduju i različite molekulske mase, 70 kDa i 100 kDa, redom. Kako je naučno potvrđena identičnost sekvenci ovih enzima, veruje se da razlike u molekulskoj masi potiču zbog glikozilacije. Shodno tome, ova dva proteina su u daljoj analizi posmatrana kao jedinstven enzim, FT. Takođe, primećeno je i da FT iz *A. aculeatus* pokazuje 96 % identičnosti u aminokiselinskim sekvencama sa FT iz *A. japonicus* predočavajući veliku sličnost u strukturi ispitanih enzima [143]. Prema tome, trodimenzioni strukturni model FT iz *A. aculeatus* je generisan upotrebom kristalografske strukture FT iz *A. japonicus* uz dodatne modifikacije i predstavljen je na slici 2.13.



Slika 2.13. Trodimenzionalni model FT iz *A. aculeatus*. N-terminalni domen je obojen plavom, C-terminalni zelenom i α -heliks žutom bojom. Preuzeto i modifikovano iz [143]

Sa slike 2.13 se može uočiti da FT dobijena iz *A. aculeatus* sadrži dva domena, N-terminalni β -propeler sa pet krakova (ostaci 21-468) i C-terminalni β -sendvič (ostaci 478-654). Ovi domeni su međusobno povezani pomoću kratkog α -heliksa (ostaci 469-477). N-terminalni domen sadrži pet krakova (na slici 13 označeni rimskim brojevima od I-V) koji su međusobno povezani čineći šupljinu unutar koje se nalazi aktivni centar kojeg karakterišu katalitički ostaci asparaginske (D60 i D191) i glutaminske kiseline (E292). Ostatak asparaginske kiseline D60 ima funkciju nukleofila, D191 stabilizatora u prelaznom stanju, dok ostatak E292 reguliše vezivanje terminalne fruktoze za supstrat [143]. Poznavanje aminokiselinskog sastava na površini enzima je od velike važnosti i za proces imobilizacije (poglavlje 2.6.) radi efikasnog izbora nosača i uspostavljanja stabilnih veza.

Budući da u literaturi nije dostupna 3D-struktura FT iz *A. aculeatus* koja predočava prisustvo baznih, kiselih i drugih ostataka prisutnih na površini enzima, upotrebom programa Pymol, konstruisan je približan model (slika 2.14.). Za tu svrhu korišćen je PDB broj FT dobijene od *A. japonicus*-a (3LIG) usled činjenice da je struktura enzima iz pomenutih mikrobnih izvora u velikoj meri podudarna. Crvenom bojom su predstavljeni kiseli funkcionalni ostaci, tj. aminokiseline koje mogu imati negativno naelektrisanje poput asparaginske i glutaminske kiseline, dok su plavom označeni bazni aminokiselinski ostaci lizina, arginina i histidina koji imaju pozitivno naelektrisanje pri neutralnim vrednostima pH. Kako se ističu aminokiseline sa negativnim naelektrisanjem, primenom pozitivno naelektrisanih jonoizmenjivačkih smola, postoji tendencija ka uspostavljanju jonskih veza i efikasnog vezivanja enzima za nosač. Međutim, usled prisustva i drugih funkcionalnih grupa, treba pažljivo ispitati i druge mogućnosti.



Slika 2.14. Raspored kiselih (crvena boja), baznih (plava boja) i ostalih (bela boja) aminokiselinskih ostataka na površini FT iz *A. japonicus*-a. Frontalni pogled molekula (levo) i bočni pogled (desno)

2.6. Sinteza FOS primenom imobilisanih enzima

2.6.1. Definicija i metode imobilizacije

Poznato je da su enzimi biološki katalizatori visokih selektivnosti koji omogućavaju odvijanje mnogobrojnih reakcija. Međutim, budući da su proteinske prirode, i pored brojnih prednosti, primenu u industriji često ometa njihova osetljivost na uslove procesa poput pH i temperature, a mogu biti i inhibirani visokim koncentracijama reakcionih komponenti [144, 145]. Pored toga, reakcije koje se zasnivaju na upotrebi nativnih enzima izvode se njihovim direktnim dodavanjem u reakcioni medijum, pri čemu nakon završene reakcije enzim ostaje ili kao kontaminirajuća primesa u finalnom proizvodu ili se odstranjuje raznim dodatnim metodama koje mogu narušiti njegovu aktivnost [146, 147]. U ovom slučaju isključena je mogućnost ponovnog iskorišćenja enzima u njihovom aktivnom obliku što dodatno poskupljuje proces proizvodnje zbog visoke cene enzima na tržištu.

Ova ograničenja se mogu prevazići postupkom imobilizacije enzima [144]. Imobilizacijom nastaju imobilisani enzimi tj. enzimi koji su fizički lokalizovani ili hemijski vezani u određenom prostoru zadržavajući svoju katalitičku aktivnost [145]. U poređenju sa slobodnim enzimima, imobilisani su poželjniji za primenu u industriji prvenstveno zbog veće otpornosti na promene u okruženju jer primenjena sredstva za imobilizaciju stabilizuju njihovu strukturu, a zatim i zbog višestruke ponovne upotrebe [144, 146]. Moguće ih je upotrebiti više puta iz razloga što se veoma jednostavno mogu ukloniti iz smeše uz zadržavanje svojih katalitičkih moći [144]. Takođe, esencijalnom prednošću imobilisanih enzima smatra se i mogućnost izvođenja kontinualnih enzimskih procesa u različitim reaktorskim sistemima [144].

Sa druge strane, primećeno je da imobilisani enzimi mogu ostvariti nižu aktivnost u odnosu na enzime upotrebljene u slobodnoj formi zbog otežanog pristupa supstrata [145]. Međutim, i u toku samog procesa imobilizacije može doći do gubitka aktivnosti usled konformacionih promena, sternih smetnji, uticaja površine nosača ili pretrpljenog hemijskog tretmana. Stoga, da bi imobilizacija enzima predstavljala opravdan postupak primene potrebno je pažljivo pristupiti izboru imobilizacione tehnike kako bi imobilisani enzimski preparat zadržao stabilnost u toku dužeg vremenskog perioda čime bi se nadomestio gubitak aktivnosti, a i troškovi samog procesa imobilizacije [147].

Do danas je opisan veliki broj imobilizacionih metoda koje se mogu razvrstati u nekoliko grupa (slika 2.15.) [148]:

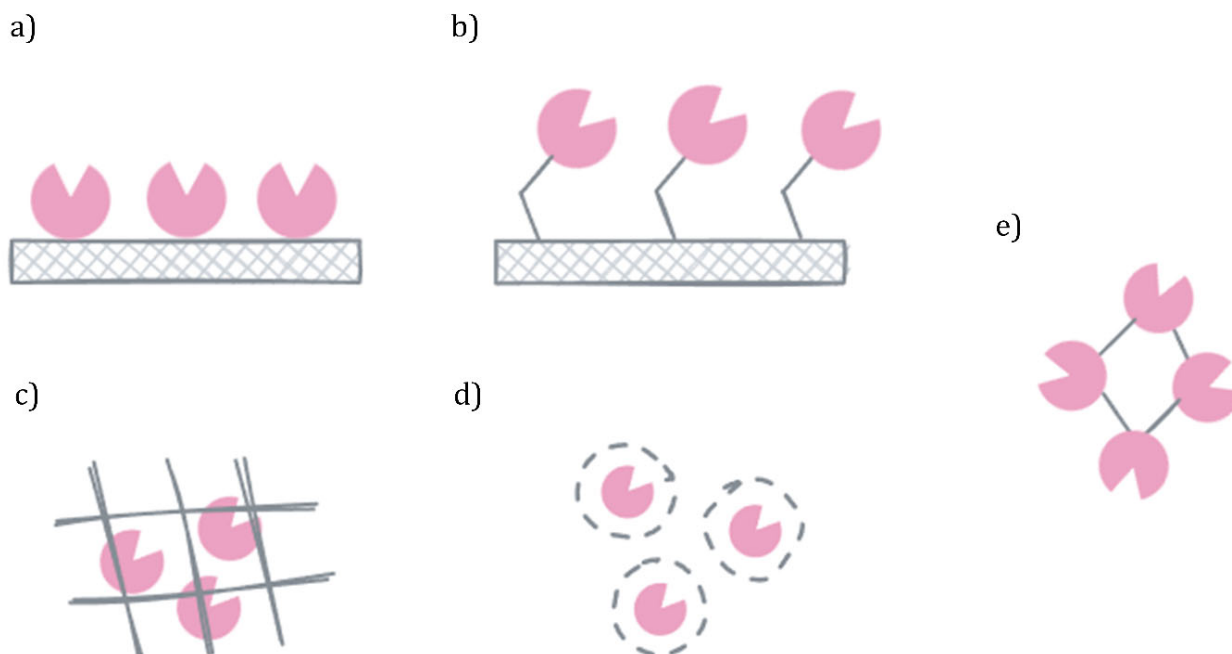
I. vezivanje enzima na čvrst nosač

- fizička adsorpcija - uspostavljanje slabih privlačnih sila između nosača i enzima
- kovalentna imobilizacija - uspostavljanje jakih kovalentnih veza između hemijskih grupa nosača i enzima

II. obuhvatanje enzima nosačem

- imobilizacija enzima u polimerne mreže - smeštanje enzima unutar određenih matrica
- mikroinkapsulacija - smeštanje enzima unutar sferne polupropusne membrane

III. umrežavanje enzima sa bifunkcionalnim reagensima - uspostavljanje unakrsnih kovalentnih veza između enzima upotrebom bifunkcionalnih reagenasa, stvarajući makročestice



Slika 2.15. Šematski prikaz različitih tehnika imobilizacije enzima poput a) fizičke adsorpcije b) kovalentne imobilizacije c) imobilizacije enzima u polimerne mreže d) mikroinkapsulacije i e) unakrsnog povezivanja enzima

2.6.1.1. Imobilizacija enzima na čvrst nosač

Adsorpcija predstavlja najstariju i najjednostavniju metodu koja se koristi za ograničavanje pokretljivosti enzima. Podrazumeva primenu najčešće aktivnog uglja i jonoizmenjivačkih smola kao nosača za koje se vezuje enzim pomoću jonskih veza, vodoničnih veza, Van der Valsovih sila ili hidrofobnih interakcija [148]. Isključivo od prirode dostupnih aminokiselina na površini enzima i hemijske prirode samog nosača zavisi do kojih će interakcija doći. Adsorbovani biokatalizatori se veoma lako mogu desorbovati sa nosača promenom uslova koji utiču na jačinu interakcija poput promene pH, temperature, koncentracije supstrata ili jonske jačine [145]. Imobilizacija adsorpcijom je veoma jednostavna za izvođenje i veoma atraktivna imobilizaciona tehnika, jer ne utiče značajno na smanjenje enzimske aktivnosti. Međutim, uspostavljanje slabih interakcija, može dovesti i do desorbovanja („spiranja“) enzima tokom reakcije a posledično i do gubitka aktivnosti [149].

Za razliku od adsorpcije, tehnika kovalentne imobilizacije se zasniva na formiranju jakih kovalentnih veza između funkcionalnih grupa enzima i nosača, i rezultira dobijanjem imobilisanih preparata veće stabilnosti, a u nekim slučajevima i aktivnosti. Pored toga, ovim pristupom je moguće značajno umanjiti „spiranje“ enzima, što inače predstavlja jedan od vodećih nedostataka adsorpcije [150]. Formiranje kovalentne veze zahteva prethodnu aktivaciju funkcionalnih grupa enzima ili nosača. S obzirom da aktivacija enzima može dovesti do njegove denaturacije, češće se pristupa aktivaciji nosača. Najčešći scenario za realizovanje kovalentne imobilizacije uključuje dva koraka: prvi koji se odnosi na aktivaciju nosača različitim reagensima i drugi koji podrazumeva formiranje kovalentne veze između aktiviranih nosača i reaktivnih grupa enzima [151]. Za aktivaciju nosača uglavnom se pristupa primeni glutaraldehida (GA), karbiimida ili epihlorhidrina [147, 151, 152], radi uvođenja aldehidnih, karboksilnih ili epoksidnih reaktivnih grupa, redom. Enzim se može vezati za nosač preko različitih funkcionalnih grupa bočnih lanaca strukturnih aminokiselina [145, 149], međutim vezivanje se najčešće realizuje preko amino, karboksilnih i tiolnih grupa [153]. Formirane jake

stabilne veze omogućavaju ponekad pravilnu orijentaciju enzima na površini nosača (aktivni centar enzima pristupačan supstratu), što može da rezultira većom aktivnošću i stabilnošću imobilisanog preparata. Sa druge strane, povećana rigidnost može ometati mikrokonformacione promene, do kojih inače dolazi usled interakcije sa supstratom, što može posledično dovesti do pada enzimske aktivnosti [150]. Međutim, neosporno je da kovalentno imobilisani enzimi poseduju pun potencijal za implementaciju u industrijskim procesima.

2.6.1.2. Obuhvatanje enzima nosačem

Pod ovom metodom se najčešće podrazumevaju procesi imobilizacije enzima u polimernim mrežama ili mikroinkapsulacije u polupropusnim membranama. Imobilizacija enzima u polimernim mrežama podrazumeva fizičko zarobljavanje enzima unutar određenih matrica poput poliakrilamidnog gela, alginata, kolagena, skroba, pektina i drugih. To se može postići mešanjem enzima i polimera, pri čemu dolazi do umrežavanja polimera i formiranja mrežaste strukture u kojoj se smešta enzim [145]. Sa jedne strane, polimerne mreže omogućavaju jednostavnu difuziju supstrata i proizvoda, dok sa druge zadržavaju enzim. Ovom metodom koja je univerzalna i jednostavna, enzim ne podleže konformacionim promenama, zaštićen je od negativnih uticaja spoljne sredine, a primećena je i smanjena kontaminacija jer krupne ćelije bakterija ne mogu da prođu u polimernu matricu [147]. Glavnim nedostatkom smatra se mogućnost spiranja enzima iz gela, jer su pore mreže uglavnom velike [148], a i enzim nije čvrsto vezan za nosač. Pored metode imobilizacije enzima u polimernim mrežama, metoda mikroinkapsulacije podrazumeva smeštanje enzima unutar sfernih polupropusnih membrana (kapsula) takođe sa selektivnom propustljivošću [144]. Ovom metodom može doći do inaktivacije enzima tokom inkapsulacije što se posmatra kao veliki nedostatak [154].

2.6.1.3. Unakrsno povezivanje enzima

Metoda unakrsnog povezivanja enzima omogućava formiranje stabilnih enzimskih agregata, s tim da zahteva pažljivo izvođenje kako bi se sačuvala funkcionalnost enzima [144, 155]. Imobilizacija unakrsnog povezivanja se izvodi u nekoliko koraka koji uključuju najpre taloženje i agregaciju enzima upotrebom precipitanata, a nakon toga upotrebu multifunkcionalnih reagenasa radi njihovog unakrsnog povezivanja [155]. Prvi korak se izvodi dodavanjem agenasa za taloženje poput amonijum-sulfata, polimera (polietilen glikola) ili *t*-butanola [155, 156] u vodenom rastvoru enzima. U slučaju nedostatka dovoljne koncentracije proteina, preferira se upotreba goveđeg seruma albumina (BSA) ili drugih proteina kako bi se olakšalo taloženje [156]. Takođe, može doći i do potencijalne interakcije enzima sa primenjenim precipitantom, pa se stoga često pristupa optimizaciji ovog koraka radi adekvatnog izbora agensa [155]. U drugom koraku se uspostavlja unakrsno povezivanje enzima korišćenjem GA zbog visoke reaktivnosti i niske tržišne cene. Naime, dolazi do uspostavljanja kovalentnih unakrsnih veza između GA i ostataka lizina prisutnih na površinama enzima formiranjem Šifovih baza i rezultirajući stvaranjem trodimenzionalnih umreženih agregata [156]. Međutim, višak GA može reagovati i sa drugim aminokiselinskim ostacima, a ukoliko su iz katalitičkog dela enzima može doći do smanjenja katalitičke aktivnosti. Prema literaturnim podacima, radi prevazilaženja ovog nedostatka, preporučuje se primena blagih umrežavajućih agenasa poput etilen glikola bis(sukcinimidil sukcinata) [156].

2.6.2. Nosači za imobilizaciju

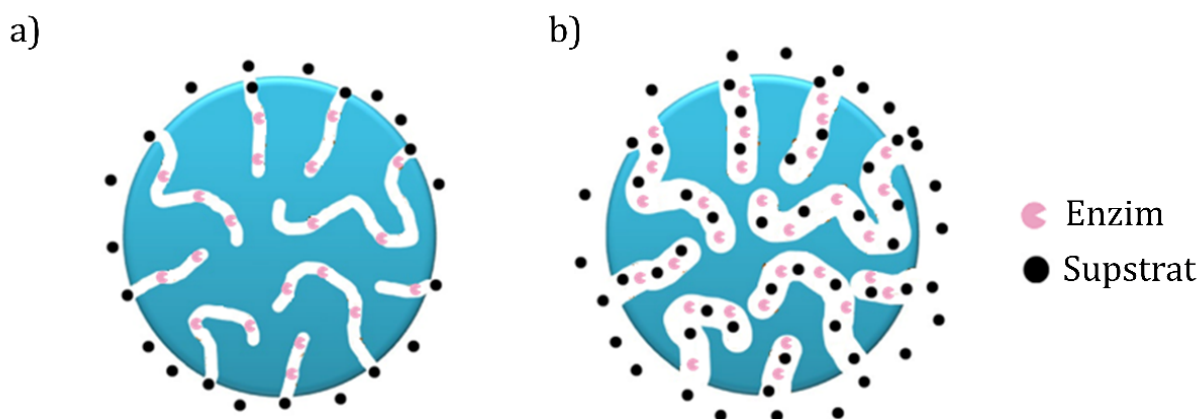
2.6.2.1. Karakteristike nosača za imobilizaciju

Za dobijanje efikasnog imobilisanog enzimskog preparata, pored karakteristika samog enzima, veoma je važan i izbor nosača. U literaturi postoji širok spektar nosača primenjenih u svrhu imobilizacije [157]. Da bi nosač bio upotrebljen za imobilisanje enzima neophodno je da

poseduje niz osnovnih svojstava koja uključuju visoku hemijsku, mehaničku i termičku stabilnost, postojanje obilja funkcionalnih grupa koje se lako mogu derivatizovati, posedovanje dobrog kapaciteta za vezivanje željenog molekula, hidrofilni karakter, nerastvorljivost u vodi, rezistentnost na mikrobe, ekološku prihvatljivost i ekonomičnost [152, 158].

Hemijska, mehanička i termička stabilnost su veoma važne odlike nosača omogućavajući njegovu primenu u različitim uslovima rada. Otpornost na različite promene pH sredine, na habanje i smicajne sile usled upotrebe u reaktorskim sistemima i kontinualnim procesima su neke od karakteristika koje treba razmotriti prilikom izbora nosača, jer poboljšavaju primenu imobilisanog enzima [152].

Kapacitet vezivanja je usko povezan sa poroznošću nosača. Postojanje pora povećava dostupnu površinu za vezivanje, a posledično i kapacitet nosača za vezivanje enzima [159]. Prema IUPAC-u (*eng. International Union of Pure and Applied Chemistry*), na osnovu veličine pora porozni nosači se mogu podeliti na: mikro- (prečnik pora <2 nm), mezo- (2-50 nm) i makroporozne (>50 nm) [160]. Veličina pora je obrnuto proporcionalna dostupnoj površini, tj. što je prečnik pora veći, manja je površina za vezivanje enzima [161]. Pri izboru nosača treba imati u vidu i veličinu enzima, kako bi molekuli proteina mogli da uđu unutar pora [152]. Iz tog razloga, često mikroporozni nosači nisu pogodni za imobilizaciju enzima čija je veličina u rasponu od 2-10 nm, jer je onemogućen njihov ulazak unutar pora. Generalno se najpogodnijim nosačima za imobilizaciju smatraju makroporozni s obzirom da njihovom primenom fizički pristup enzima unutar pora nije ograničen. Poslednjih godina brojni autori navode da su i mezoporozni nosači veoma pogodni, jer obezbeđuju bolju strukturnu stabilnost enzima, a poseduju i pore čija je veličina odgovarajuća za ulazak enzima. Međutim, da bi se sa sigurnošću tvrdilo da su bolji od makroporoznih, neophodne su opsežne studije [160]. Od veličine pora može zavisi i difuzija supstrata (slika 2.16.). Primena nosača sa manjim prečnikom pora može rezultirati difuzionim ograničenjima, tj. prilaz supstrata aktivnom centru enzima može biti otežan, posebno ako je reč o većim molekulima [161]. Sa tog aspekta, pogodnija je primena nosača sa većim porama. U poređenju sa neporoznim nosačima kod kojih je enzim distribuiran po površini, porozni se smatraju poželjnijim za primenu zbog veće dostupne površine za vezivanje enzima, ali i zbog toga što je imobilisani enzim zaštićen od direktnog izlaganja spoljnim uslovima, a ujedno i manje podložan denaturaciji [162].



Slika 2.16. Šematski prikaz imobilizacije enzima primenom: a) poroznog nosača sa manjom veličinom pora (onemogućen prilaz supstrata) i b) poroznog nosača sa većom veličinom pora (omogućen prilaz supstrata). Preuzeto i prilagođeno iz [161]

Na ishod imobilizacije poseban uticaj ima i priroda nosača sa aspekta hidrofилности/hidrofobnosti. Izuzev lipaze, većina enzima ne pokazuje zavidnu aktivnost i stabilnost pri imobilizaciji na hidrofobne nosače, jer dolazi do značajnih konformacionih promena te je stoga česta upotreba onih koje odlikuje hidrofилni karakter [7, 152].

2.6.2.2. Podela nosača za imobilizaciju

Nosači za imobilizaciju se mogu kategorisati na organske, neorganske, nanomaterijale i na nosače dobijene od agro-industrijskog otpada [157].

Organski nosači se dalje mogu podeliti na nosače dobijene iz prirodnih izvora (biopolimere) i sintetičke (polimere). U prirodne organske nosače se ubrajaju dekstran, hitozan, celuloza, agaroza, skrob, alginat, kolagen, želatin, a u sintetičke polivinilni i poliakrilni materijali (polivinil alkohol, poliakrilonitril, poliakrilamid, polimetakrilat), polietilen, polistiren i drugi [152, 157, 158]. Biopolimeri se zbog svojih unikatnih svojstava (biorazgradivost, biokompatibilnost, netoksičnost) široko primenjuju za imobilizaciju enzima. Imajući u vidu da se svrstavaju među obnovljive, lako dostupne i jeftine materijale, jer neki od njih predstavljaju i otpad pojedinih industrija, njihovo korišćenje u svrhu nosača za imobilizaciju je potpuno opravdano [163]. Takođe, usled prisustva različitih funkcionalnih grupa (najčešće hidrosilnih, amino i karboksilnih) poseduju izuzetan afinitet ka vezivanju proteina pa se često primenjuju za imobilizaciju adsorpcijom ili kovalentnom imobilizacijom nakon aktivacije. Neki od njih (hitozan, alginat, želatin, agaroza) imaju sposobnost stvaranja različitih konfiguracija i tendenciju ka geliranju pa se koriste i u svrhe inkapsulacije i zarobljavanja enzima [163, 164]. Sintetički nosači u čiji sastav ulaze polimeri koji sadrže širok spektar različitih funkcionalnih grupa se takođe smatraju veoma efikasnim za imobilizaciju enzima. Uglavnom poseduju karboksilne, karbonilne, epoksi, hidrosilne, amino i diolne grupe, ali i jako hidrofobne alkil grupe. Prema dostupnim funkcionalnim grupama, primenom komercijalnih sintetičkih nosača favorizovana je imobilizacija enzima adsorpcijom i stvaranjem kovalentnih veza [163].

Neorganski nosači predstavljaju podloge koje su na bazi silicijum-dioksida (silike), metalnih oksida (titanijum, cirkonijum, aluminijum, cink-oksidi, oksid gvožđa), minerala na bazi gline, hidroksiapatita, zlata, srebra i drugih [152, 157, 163]. Pored hemijske i termičke stabilnosti koje karakterišu ove nosače, odlikuje ih poroznost i izrazita krutost koja obezbeđuje konstantan oblik nosača, i garantuje stabilnost [157]. Iako su i organski nosači porozni, osetljiviji su na promene pritiska i pH [152]. Nedostatak neorganskih nosača se ogleda kroz redukovane mogućnosti za dobijanjem različitih geometrijskih oblika i postojanja nižeg afiniteta prema proteinima. Stoga je sasvim izvesno da ne postoji idealan i univerzalan nosač, adekvatan za sve enzime [163]. U slučaju neorganskih nosača, najčešće se primenjuju nosači na bazi silike koji se mogu koristiti u više različitih oblika, dok zbog velike poroznosti i dostupne površine obezbeđuju minimalna difuziona ograničenja, ali i efikasnu imobilizaciju enzima. Dostupne hidrosilne grupe na površini silike omogućavaju vezivanje proteina, a pogodne su i za reagovanje sa funkcionalnim agensima radi modifikacije nosača [163].

Nanomaterijali su se pokazali veoma pogodnim nosačima zbog velike dostupne površine koja pruža mogućnost vezivanja većeg broja molekula što rezultira poboljšanom katalitičkom aktivnošću enzima. Pored toga, imobilizacijom nastaje stabilan imobilisani preparat sa visokim potencijalom ponovne upotrebe. Vezivanjem enzima za površinu, aktivna mesta su široko izložena supstratu čime se minimiziraju difuziona ograničenja [163]. U ove svrhe, najčešća je upotreba nanočestica na bazi silicijum-dioksida, titanijuma i grafena [152, 157, 163].

Nosači od agro-industrijskog otpada su poslednjih godina veoma popularni jer se smatraju obnovljivom i ekološki prihvatljivom alternativom za imobilizaciju nosača. Prema dostupnim naučnim studijama, za potrebe imobilizacije enzima primenjena je ljuska pirinča, klip kukuruza,

ljuska jajeta i dr. Ovi lako dostupni nosači koje karakteriše niska cena i potencijal za redukcijom zagađenja životne sredine odlikuju i druge zavidne karakteristike (velika dostupna površina za vezivanje enzima, veća čvrstoća, odličan kapacitet adsorpcije, prisustvo reaktivnih funkcionalnih grupa, unapređenje stabilnosti i zadržavanje katalitičke aktivnosti enzima) [157] zbog kojih se ovi nosači smatraju obećavajućim za primenu u budućnosti. Nedostatak je heterogen hemijski sastav koji zavisi od ekoloških faktora i uslova prethodnog procesiranja pa je kontrola procesa imobilizacije i ponovljivost rezultata problematična.

2.6.3. Primeri primene imobilisanih enzima u sintezi FOS

U slučaju enzima koji omogućavaju biotransformaciju saharoze u FOS, najzastupljenijim metodama imobilizacije smatraju se adsorpcija ili uspostavljanje stabilnih kovalentnih veza. Međutim, postoje relevantne naučne publikacije i na temu imobilizacije enzima primenom metode obuhvatanja enzima nosačem, ali i unakrsnog povezivanja. Detaljan pregled dostupne literature po metodama imobilizacije je predstavljen tabelarno (tabele 2.6-2.8.). U pogledu ostvarenih prinosa FOS, adsorpcija i kovalentno vezivanje pokazale su se kao pogodnije metode za imobilizaciju FT. Većina autora primenila je čvrste nosače na bazi hitozana i metakrilata radi formiranja kovalentnih veza između enzima i nosača i stvaranja stabilnog imobilisanog preparata FT. Za razliku od metoda koje zahtevaju primenu čvrstih nosača, ređe su primenjivane metode koje uključuju imobilizaciju enzima u polimernim mrežama, mikroinkapsulaciju i unakrsno povezivanje. Međutim, uprkos manjem broju dostupnih istraživanja, rezultati objavljenih studija ukazuju i na njihov potencijal. Naime, Cheng i sar. su izvestili da primenom kalcijum alginatnog gela i fizičkim zarobljavanjem enzima, nastaje imobilisanim preparat čija primena rezultira prinosom FOS većim od 55 %, dok su Ademakinwa (Ademakinwa) i sar. prijavili da su umreženi agregati FT iz *Aureobasidium pullulans* NAC8 uspešno primenjeni u proizvodnji FOS dajući prinos od 57 %.

Tabela 2.6. Pregled primenjenih nosača za **imobilizaciju adsorpcijom** FF i FT u cilju produkcije FOS

Primenjeni nosač	Izvor enzima	Reagens za modifikaciju	Udeo FOS	Ref.
Jonoizmenjivačka smola na bazi stirena (Diaion HPA 25)	FT iz <i>Aureobasidium pullulans</i> KFCC 10524	/	~60 %	[165]
Jonoizmenjivački nosač (DEAE-celuloza)	FF iz <i>Aureobasidium</i> sp. ATCC 20524	/	~30 %	[166]
Čestice na bazi niobijuma i grafita	FT iz <i>Rhodotorula</i> sp	/	58 %	[167]
Nosač na bazi legure niobijuma i grafita	FT iz <i>Rhodotorula</i> sp	/	46 %	[168]
Sintetička vlakna, poliuretanska pena	FF iz <i>Penicillium expansum</i>	/	>52 %	[169]
Nosač na bazi silike i niobijuma	FT iz <i>A. oryzae</i> IPT-301	/	/	[170]

Tabela 2.7. Pregled primenjenih nosača za **kovalentnu imobilizaciju** FF i FT u cilju produkcije FOS

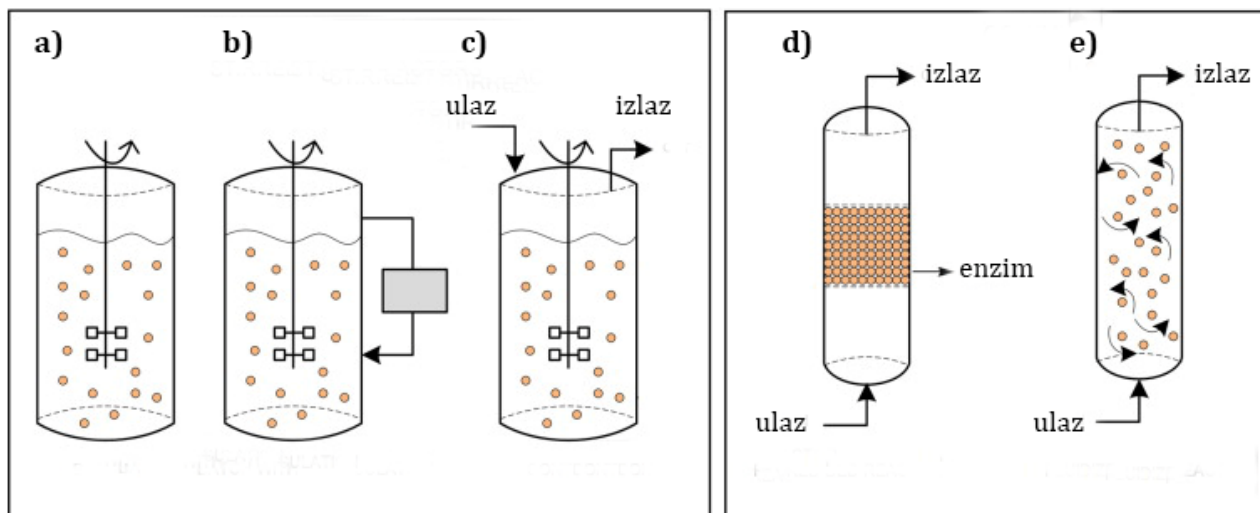
Primenjeni nosač	Izvor enzima	Reagens za modifikaciju	Udeo FOS	Ref.
Porozna silika (CARiACT)	FF iz <i>A. japonicus</i> MU-2	GA	>60 %	[171]
Metakrilamid-polimerne kuglice	FF iz <i>A. niger</i> ATCC 20611 i <i>A. japonicus</i> TIT-KJ1	/	60 %	[172]
Keramička membrana	FF iz <i>A. niger</i> ATCC 20611	GA	~55 %	[173]
Epoksi-polimerne kuglice (Eupergit® C)	FT iz <i>A. aculeatus</i> (Pectinex® Ultra SP-L)	/	57 %	[174]
Epoksi nosač od polimetakrilata	FT iz <i>A. aculeatus</i> (Pectinex® Ultra SP-L)	/	61,5 %	[175]
Kuglice hitozana	FF iz <i>A. japonicus</i> CCRC 930007	GA i THP	48 %	[176]
Čestice hitozana	FTa iz <i>A. aculeatus</i> (Viscozyme® L)	GA	55 %	[126]
Sfere hitozana	FT iz <i>A. aculeatus</i> (Viscozyme® L)	GA	>54 %	[177]
Čestice hitozana	FTa iz <i>A. aculeatus</i> (Pectinex® Ultra SP-L)	GA	/	[178]
Fe ₃ O ₄ -hitozan-magnetne nanočestice	FT iz <i>A. aculeatus</i> (Pectinex® Ultra SP-L)	GA	14,5 %	[179]
Metakrilni nosači Sepabeads® i ReliZyme™	FT iz <i>Schedonorus arundinaceus</i>	/	/	[180]

Tabela 2.8. Pregled primenjenih nosača za **imobilizaciju umrežavanjem, mikroinkapsulacijom i unakrsnim povezivanjem** FF i FT u cilju produkcije FOS

Tip imobilizacije	Primenjeni nosač	Izvor enzima	Reagens za modifikaciju	Udeo FOS	Ref.
Umrežavanje i mikroinkapsulacija	Ca-alginatni gel	FF iz <i>Aureobasidium</i> sp. ATCC 20524	/	~35,6 %	[181]
	Ca-alginatni gel	FF iz <i>A. japonicus</i>	/	>55 %	[182]
	Alginatne gel čestice	FT iz <i>A. aculeatus</i> (Pectinex® Ultra SP-L)	/	~46 %	[183]
	Alginatne gel čestice	FF iz <i>C. cladosporioides</i> MUT 5506	/	>50 %	[184]
Unakrsno povezivanje	Jonoizmenjivačka smola	FT iz <i>A. aculeatus</i> (Pectinex Ultra SP-L)	GA	~24 %	[185]
	Smole i polimetakrilatni gelovi	FT iz <i>Aureobasidium pullulan</i>	GA	/	[186]
	Čestice polistirena i tercijarnih amina (Diaion WA-30)	FF iz <i>A. oryzae</i> KB	GA	51,9 %	[187]
	/	FT iz <i>Aureobasidium pullulans</i> NAC8	GA	57 %	[188]

2.7. Reaktorski sistemi za proizvodnju FOS

Od laboratorijskog pristupa koji uključuje izvođenje sinteze FOS u malim razmerama i obezbeđuje neophodne informacije o samoj reakciji transfruktozilacije, radi masovne i skalabilne proizvodnje ovih prebiotika pristupa se primeni kompleksnijih reaktorskih sistema. Industrijski reaktorski sistemi obezbeđuju optimizaciju procesa u pravcu razvijanja ekološki prihvatljivog, ekonomski isplativog i maksimalno efikasnog procesa. Za izvođenje enzimskih reakcija primenom slobodnog ili imobilisanog enzima, najčešće se primenjuju reaktori različitih konfiguracija poput reaktora u vidu rezervoara sa mešalicom i reaktora u vidu kolone sa pakovanim i fluidizovanim slojem (slika 2.17.) [189]. Dizajn pomenutih sistema omogućava izvođenje reakcija u šaržnom ili kontinualnom režimu rada [190].



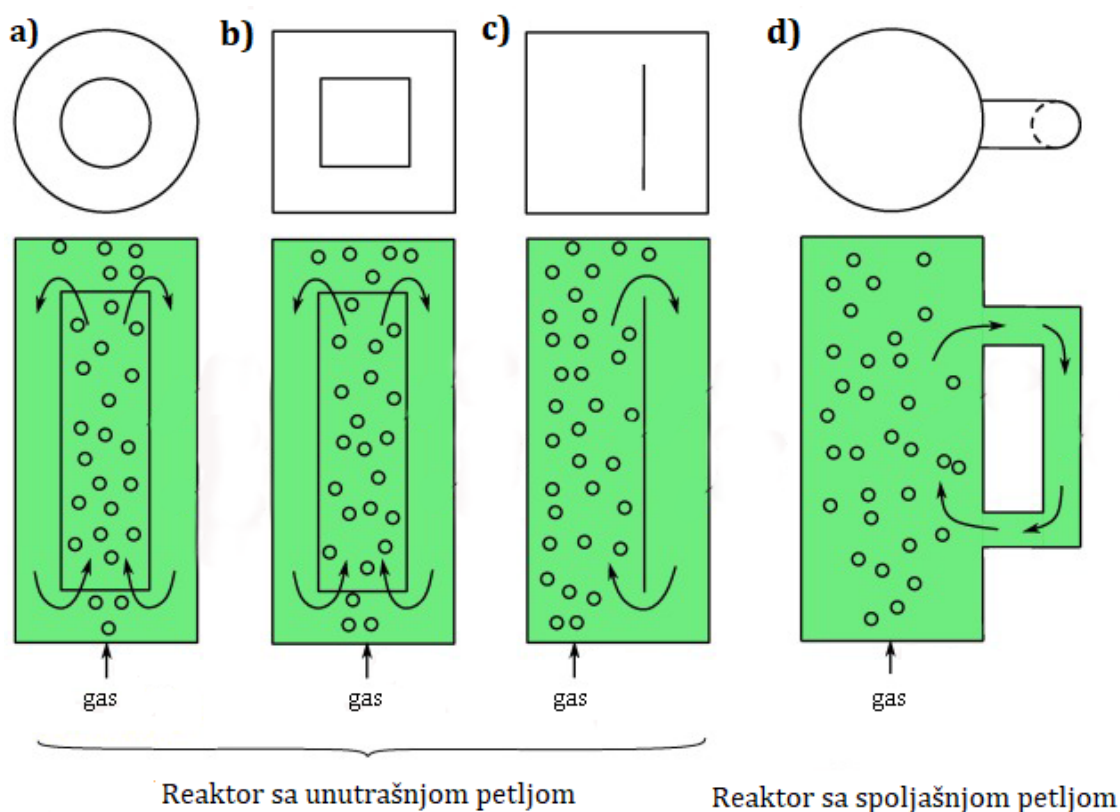
Slika 2.17. Šematski prikaz različitih reaktorskih konfiguracija: a) reaktor sa mešalicom b) reaktor sa mešalicom i recirkulacijom c) reaktor sa mešalicom za izvođenje kontinualnog procesa d) reaktor sa pakovanim slojem e) reaktor sa fluidizovanim slojem. Preuzeto i prilagođeno iz [189]

U pogledu sinteze FOS, u literaturi je opisana primena imobilisane FT i celih ćelija korišćenjem reaktora sa mešalicom u šaržnom režimu rada [126, 132]. Ovaj pristup uključuje korišćenje definisane količine supstrata i enzima/ćelija, unetih u ograničeno okruženje uz adekvatno mešanje. Ukoliko se primenjuje imobilisani enzim, po završetku reakcije, može se odvojiti i ponovo upotrebiti što može dovesti do smanjenja aktivnosti pri sledećoj upotrebi. Međutim, uglavnom se pažnja usmerava ka razvijanju kontinualnih procesa koji podrazumevaju istovremeno uvođenje supstrata i izvođenje proizvoda. U vezi sa tim, reaktor sa mešalicom može raditi i u kontinualnom režimu rada uključivanjem membrane na izlazu iz reaktora preko koje je omogućeno zadržavanje enzima i odvođenje proizvoda, uz kontinuirano uvođenje supstrata. Ovakva konfiguracija koja predstavlja enzimski membranski reaktor je prema navodima iz literature uspešno primenjena u cilju kontinualne produkcije FOS [191, 192]. O prednosti primene membranskih reaktora u odnosu na ostale opisane reaktorske sisteme će biti posvećeno posebno poglavlje u okviru ove doktorske disertacije.

Kontinualni režim rada omogućava primenu imobilisanog enzima sve dok značajno ne opadne njegova inicijalna aktivnost. Ovim pristupom je u poređenju sa šaržnim režimom rada isključen dodatni korak odvajanja enzima i ponovne upotrebe čineći ga troškovno efikasnijim [190]. Za izvođenje reakcija sa imobilisanim enzimima u kontinualnom režimu rada najčešće se preferira primena reaktora sa pakovanim slojem koji se sastoji od fiksiranog sloja imobilisanog enzima kroz koji struji supstrat. Jednostavnost izvođenja procesa, veliki kapacitet kao i potencijal za obimniju proizvodnju su samo neke od prednosti koje ovaj reaktorski tip izdvajaju od drugih

[177]. Kada je reč o sintezi FOS, FT imobilisane na različite nosače su primenjene u reaktorima sa pakovanim slojem, za izvođenje kontinualnih procesa [165, 166, 177, 182-184]. Lorenzoni i sar. su kovalentno imobilisali FT na sfere hitozana i prijavili prinos FOS od 59 %, kao i da izvođenjem kontinualne proizvodnje prebiotika u reaktoru sa pakovanim slojem nakon 40 dana nije došlo do smanjenja prinosa [177]. Iako postoje podaci da primena ovog reaktorskog sistema obezbeđuje poboljšani prenos mase i mogućnost ponovnog iskorišćenja imobilisanog enzima [184] u slučaju izvođenja reakcije transfruktozilacije, postoje i određena ograničenja. Naime, imajući u vidu da se u industrijskim uslovima teži ka dobijanju što većih količina FOS što ujedno zahteva i primenu većih početnih koncentracija rastvora saharoze koje odlikuje i veći viskozitet, posledično može doći do začepjenja kolone [177].

Isti autori koji su koristili sfere hitozana za imobilizaciju FT, pored primene u reaktoru sa pakovanim slojem, ispitali su i mogućnost izvođenja reakcije u reaktoru sa fluidizovanim slojem i u svojoj naučnoj publikaciji prijavili neznatno niži prinos od 54 % FOS [177]. Reaktor sa fluidizovanim slojem podrazumeva uvođenje supstrata sa dna, brzinom dovoljnom za podizanje čestica i njihove fluidizacije, a posledično i do odvijanja reakcije [189]. Takođe, često se za izvođenje hemijskih, biohemijskih i drugih procesa primenjuju pneumatski reaktori (air-lift reaktori) koje karakteriše prisustvo unutrašnje cilindrične ili pravougaone cevi i kod kojih se vazduh udvava sa dna omogućavajući kretanje čestica i mešanje [193, 194].



Slika 2.2. Šematski prikaz različitih geometrijskih konfiguracija air-lift reaktora: a) air-lift reaktor sa cilindričnom unutrašnjom cevju b) air-lift reaktor sa pravougaonom unutrašnjom cevju c) air-lift reaktor sa podeljenom pravougaonom unutrašnjom cevju d) air-lift reaktor sa spoljašnjom petljom. Preuzeto i prilagođeno iz [193].

Različiti dizajni ovog reaktorskog sistema sa unutrašnjom i spoljašnjom cirkulacijom su šematski prikazani na slici 2.18. Ovi višefazni sistemi poseduju dva različita područja strujanja tečnosti - tok sa dna koji nastaje kao posledica raspršivanja vazduha i stvaranja mehura koji podstiču kretanje ka vrhu i tok sa vrha koji se formira kao posledica istiskivanja tečnosti od strane vazduha. Ovakav princip omogućava dobru cirkulaciju tečnosti i efikasan prenos mase [195]. Takođe, jednostavna konstrukcija i niski operativni troškovi predstavljaju dodatne pogodnosti ovog reaktorskog sistema za izvođenje različitih reakcija primenom imobilisanih enzima [196]. Do sada je prijavljen samo jedan primer primene ovog reaktora za sintezu FOS i to korišćenjem imobilisanih celih ćelija [197]. Prema tome, u okviru ove disertacije će biti procenjen potencijal primene imobilisane FT iz komercijalne enzimske smeše Pectinex® Ultra SP-L u reakciji transfruktozilacije korišćenjem ovog reaktorskog sistema radi izvođenja kontinualnih procesa sinteze FOS.

2.8. Separacija FOS

Poznato je da reakcijom transfruktozilacije saharoze pored željenih funkcionalnih prebiotika tj. FOS nastaju i molekuli manjih molarnih masa - glukoza i fruktoza. Prisustvo pomenutih komponenti zajedno sa neproreagovalom saharozom deluje inhibitory na sintezu FOS, utiče na smanjenje prebiotskog efekta sintetisane smeše, a dovodi i do povećanja njene kalorijske i kariogene vrednosti. U cilju unapređenja funkcionalne vrednosti samog proizvoda pristupa se uklanjanju mono- i disaharida različitim tehnikama prečišćavanja. Na ovaj način moguće je dobiti proizvod veće čistoće što posledično dovodi i do povećanja njegove komercijalne vrednosti [80]. Postoje različiti pristupi uklanjanja ovih lako svarljivih komponenti. Prvi pristup uključuje njihovo uklanjanje nakon reakcije enzimske sinteze [198], dok se drugi odnosi na prečišćavanje tokom procesa sinteze i zahteva primenu membranskog reaktora [133]. Strategije koje se primenjuju za prečišćavanje smeše nakon enzimske sinteze su upotreba adsorpcione hromatografije, fermentacije kvascem i membranske separacije [199].

2.8.1. Prečišćavanje adsorpcijom

Ovaj vid separacije FOS podrazumeva primenu preparativne kolone ispunjene česticama adsorbensa koje mogu biti na bazi jonoizmenjivačkih smola, aktivnog uglja ili zeolita [199]. Konkretno, primena jonoizmenjivačke hromatografije uključuje upotrebu nosača sa fiksiranim naelektrisanim funkcionalnim grupama koji se mogu klasifikovati na katjonske izmenjivačke smole ukoliko vezuju katjone (pozitivno naelektrisane jone) ili anjonske ukoliko vezuju anjone (negativno naelektrisane jone). U tom kontekstu, katjonske jonoizmenjivačke smole sadrže funkcionalne grupe sa negativnim naelektrisanjem poput sulfonatnih (SO_3^-) ili karboksilatnih (COO^-) jona, za razliku od anjonskih koji sadrže uglavnom protonovane amino grupe [200]. Primena jonoizmenjivača se često koristi za prečišćavanje vode gde dolazi do jonske izmene, a ujedno i selektivnog uklanjanja neželjenih jona, dok se primena ovih smola u separaciji ugljenih hidrata ne bazira na jonskoj razmeni. U slučaju separacije ugljenih hidrata koriste se jonoizmenjivačke smole koje se pre upotrebe tretiraju određenim rastvorima radi vezivanja određenih katjona [201], ili se koriste one koje ne zahtevaju pred tretman već u svom sastavu sadrže odgovarajuće katjone. Separacija ugljenih hidrata u takvom sistemu se odvija prema njihovom afinitetu ka formiranju helatnih kompleksa sa katjonima (Ca^{2+} , Na^+ , K^+) preko hidroksilnih grupa. Stepens adsorpcije određenog jedinjenja je u direktnoj korelaciji sa jačinom formiranog kompleksa i određen je orijentacijom i brojem prisutnih hidroksilnih grupa [199]. Pojedini autori navode da katjonske izmenjivačke smole u ovom slučaju treba nazvati „katjonske adsorpcione smole“ [202].

Vanková i Polakovič su izveli prečišćavanje smeše FOS korišćenjem katjonske smole Amberlite™ CR1320Ca i prijavili prinos od 86,0 % [203]. Kampos i sar. su prečišćavali ekstrakt jakona sa FOS, testirali nekoliko komercijalnih smola različitih jonskih oblika, a najbolje rezultate ostvarili upotrebom Diaion UBK530Na smole jer je dobijen finalni proizvod čistoće FOS od 88,2 %, dok je prinos prečišćavanja iznosio 99,4 % [204].

Takođe, veoma pogodnim adsorbentom se smatra i aktivni ugalj kojeg karakteriše niska tržišna cena i visoki kapacitet adsorpcije [199]. Adsorpcija ugljenih hidrata na aktivnom uglju je zasnovana na uspostavljanju Van der Walsovih sila. Kako je površina aktivnog uglja hidrofobna, snažnije se adsorbuju molekuli većih molarnih masa (oligosaharidi) zbog hidrofobnijeg karaktera koji je posledica prisustva većeg broja CH grupa [199, 205]. U vezi sa tim, Nobre i sar. su veoma uspešno izveli prečišćavanje smeše FOS dobijene fermentacijom saharoze upotrebom gljive iz roda *Aureobasidium* korišćenjem aktivnog uglja i dobili frakciju čistoće FOS od 97% [206]. Kolonu sa pakovanim slojem ovog adsorbenta su korsitili i Kun i Filjo i prijavili čistoću proizvoda iznad 80% [207]. Ekstrakt jakona bogat FOS su Kampos i sar. prečišćavali ne samo

korišćenjem jonoizmenjivačke kolone, već i kolone ispunjene aktivnim ugljem. Iako su ovom metodom dobili niži prinos FOS (81,5%), postigli su potpuno uklanjanje monosaharida i čistoću ekstrakta od 92,0 % FOS [204]. Grupa autora je kao veoma pogodnu alternativu aktivnom uglju prijavila i upotrebu kolone sa pakovanim slojem zeolita [208].

Usled postojanja različitog afiniteta adsorbenta prema različitim ugljenim hidratima, evidentno je da se hromatografskim tehnikama može ne samo prečistiti već i frakcionisati proizvod. Glavne prednosti ove metode se ogledaju u ostvarenom visokom prinosu prečišćavanja i visokoj čistoći proizvoda [203], dok je njihova primena u industrijskim uslovima limitirana zbog malih kapaciteta, velike potrošnje energije i razblaživanja proizvoda što dalje zahteva uvođenje dodatnih koraka radi koncentrovanja [205].

2.8.2. Prečišćavanje fermentacijom

Eliminacija mono- i disaharida se može sprovesti i upotrebom specifičnih mikroorganizama koji metabolišu proste ugljene hidrate, ali ne i oligosaharide [205]. Do sada je prijavljeno da su kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, koji može potpuno da fermentiše glukozu, fruktozu i saharozu [205], i *Pichia pastoris*, koji metaboliše samo glukozu, veoma uspešno upotrebljeni u cilju povećanja čistoće smeše FOS [209, 210]. Iako i selektivna fermentacija kvascem predstavlja veoma efikasan način prečišćavanja koji karakterišu niski operativni troškovi, ovaj postupak se ne smatra veoma pogodnim za industrijsku implementaciju [205]. Kao glavni razlog navode se dodatni troškovi usled uvođenja neophodnih koraka radi uklanjanja etanola i drugih metabolita koji se ovom tehnikom oslobađaju u proizvod. Takođe, sama upotreba mikroorganizma može dovesti do promene sastava komponenti smeše čime je primena ove metode dodatno limitirana [199]. Radi prevazilaženja ovih nedostataka, membranske separacione tehnike se smatraju veoma efikasnim rešenjem koje odlikuje visoki potencijal primene i van laboratorijskih kapaciteta [205, 211].

2.8.3. Membranske separacione tehnike

Davne 1748. godine je francuski fizičar Žan Antoan Nole (Jean-Antoine Nollet) pokazao polupropusnost prirodnih membrana otkrivajući fenomen osmoze [212]. Dokazao je da je bešika životinja bila propusnija za vodu u odnosu na vino [212]. Nakon toga, veliki napredak u istoriji upotrebe membrana je bio 1855. godine kada je Adolf Fik (Adolf Fick) proučavao veštačke polupropusne membrane i objavio zakon (Fikov zakon) koji opisuje proces difuzije kroz membranu [212]. Potom su objavljena mnoga istraživanja iz oblasti membranske tehnologije, a veliki pomaci su zabeleženi 1950. godine kada je nemačka kompanija Sartorius Werke GmbH proizvela membrane za industrijsku upotrebu [213] i 1963. godine kada je industrijska primena počela otkrićem celulozno-acetatne membrane za reverznu osmozu od strane američkih hemijskih inženjera Loeba i Sourirajana [212, 214]. Danas se membrane u brojnim industrijskim procesima široko primenjuju.

Iako je inicijalna primena membranskih sistema bila povezana sa procesima prečišćavanja vode [215], u poslednje vreme je sve češća primena u tekstilnoj, papirnoj, hemijsko-procesnoj [212], farmaceutskoj [216], prehrambenoj industriji kao i biotehnologiji [211]. Glavne prednosti membranskih separacija koje ih izdvajaju od drugih tehnika prečišćavanja uključuju niske operativne troškove, jednostavno izvođenje procesa koji je ekološki opravdan, ali i dobijanje proizvoda visokog kvaliteta [199, 217, 218]. S obzirom na to da se separacije izvode uz korišćenje membrane koja predstavlja barijeru i omogućava diferencijalno razdvajanje određenih komponenti [219], ova tehnologija se može smatrati i veoma pogodnom za prečišćavanje bioaktivnih oligosaharida.

Membrane se često definišu prema veličini pora ili preko granične vrednosti molekulske mase (*eng. Molecular Weight Cut-Off, MWCO*) [220]. MWCO se odnosi na molekulska masu supstance

koju 90 % zadržava membrana (koeficijent odbijanja molekula iznosi 0,9) [221]. Stoga, mogu se razlikovati četiri grupe membranskih procesa: mikro-, ultra-, nanofiltracija i reverzna osmoza čije su detaljnije karakteristike prikazane u tabeli 2.9 [80]. Membrane za mikro- i ultrafiltraciju se najčešće koriste za koncentrisanje proteina [222] kao i za izdvajanje oligosaharida od polisaharida ili enzima [211], dok se za izdvajanje mono- i disaharida od oligosaharida najčešće koriste membrane za nanofiltraciju [199].

Tabela 2.9. Karakteristike membranskih procesa. Usvojeno iz [223, 224]

Tip membrane	Akronim	Prečnik pora, μm	Radni pritisak, bar	Zadržane komponente
Mikrofiltracija	MF	0,1-1,0	1-3	Bakterije, masti, čestice
Ultrafiltracija	UF	0,01-0,1	2-5	Polisaharidi, proteini, pigmenti
Nanofiltracija	NF	0,001-0,01	5-15	Disaharidi, oligosaharidi, divalentni joni
Reverzna osmoza	RO	< 0,001	15-75	Monovalentni joni

2.8.3.1. Vrste membranskih konfiguracija

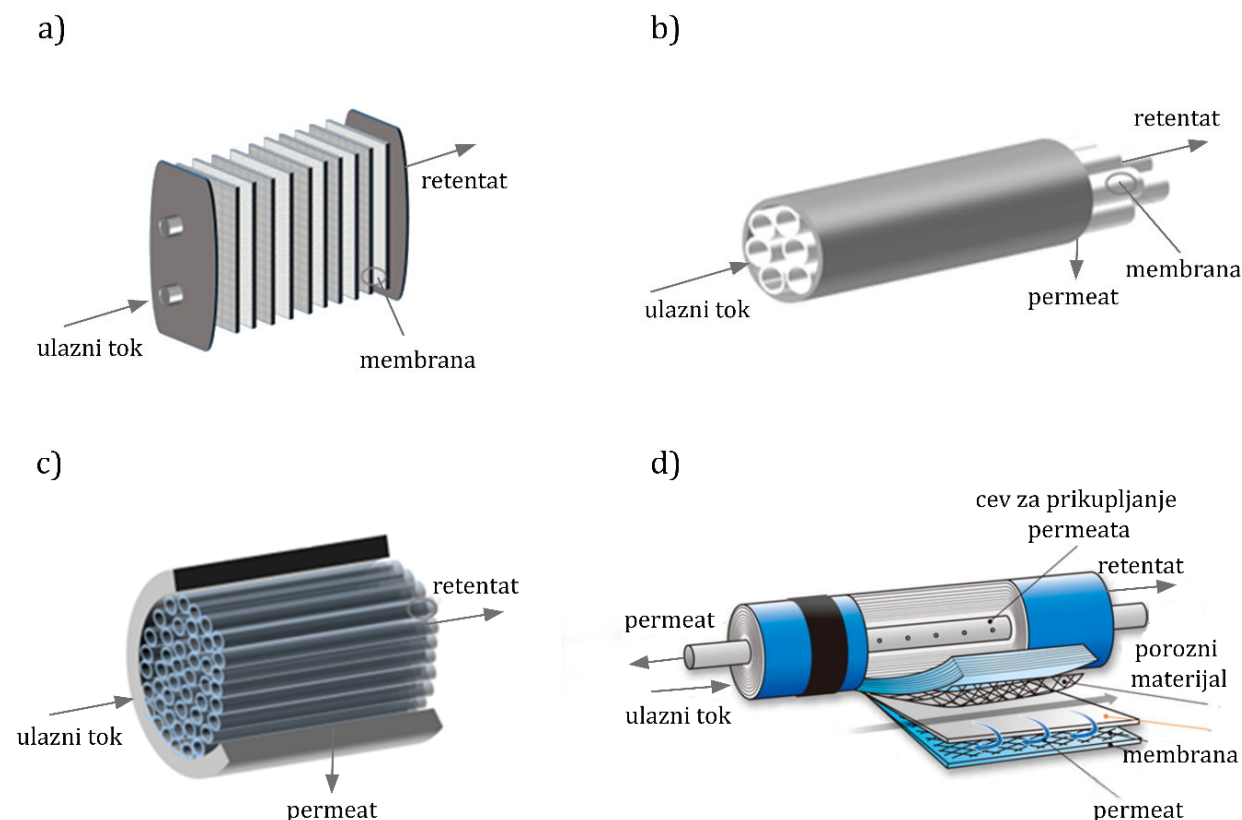
Membrane se pakuju u odgovarajuće module kako bi bile pogodne za upotrebu u membranskim procesima velikih razmera [224]. Razlikuju se četiri osnovne membranske konfiguracije koje su prilagođene raznovrsnim aplikacijama i koje karakteriše različita dostupna površina membrane: monolitni modul, cevni modul, modul sa šupljim vlaknima i spiralno namotan modul (slika 2.19) [225, 226].

Monolitni modul predstavlja jednu od najstarijih razvijenih konfiguracija. Uglavnom se koristi za prečišćavanje otpadnih voda procesima MF i UF, dok je veoma retka primena u NF [226]. Ovaj modul karakteriše jednostavan dizajn, lako čišćenje i održavanje membrane, pa se stoga veoma često koristi za laboratorijska ispitivanja [227]. Vodeći nedostatak ovog modula jeste niska efikasnost usled male gustine pakovanja [226, 227].

Cevni modul predstavlja sistem u kojem se membrane nalaze u vidu cevčica. Napojna smeša protiče kroz cevčice, a permeat se sakuplja u omotač. Ovaj sistem karakteriše lako čišćenje i jednostavna zamena membrane, ali zahteva veliku potrošnju energije [220].

Modul sa šupljim vlaknima sadrži snop šupljih vlakana i zbog posedovanja velike dostupne površine i male potrošnje energije smatraju se poželjnijim od drugih konfiguracija [226]. Međutim, primenom ovog sistema može doći i do blokiranja, zbog prisustva uskih kanala [220].

Najčešće primenjivani modul jeste *spiralno namotani modul* koji se sastoji od centralne cevi oko koje se namotavaju slojevi membrane između kojih se postavlja sloj od poroznog materijala radi proticanja napojne smeše i permeata. Napojna smeša se uvodi tangencijalno na membranu, a permeat prolazeći kroz membranu, se spiralno kreće ka centralnoj cevi gde se i sakuplja [220, 224]. Glavne prednosti ove konfiguracije su velika gustina pakovanja, samim tim i veća dostupna površina, niska cena i mali operativni troškovi. I u ovom slučaju, uski kanali mogu dovesti do blokiranja modula [220].



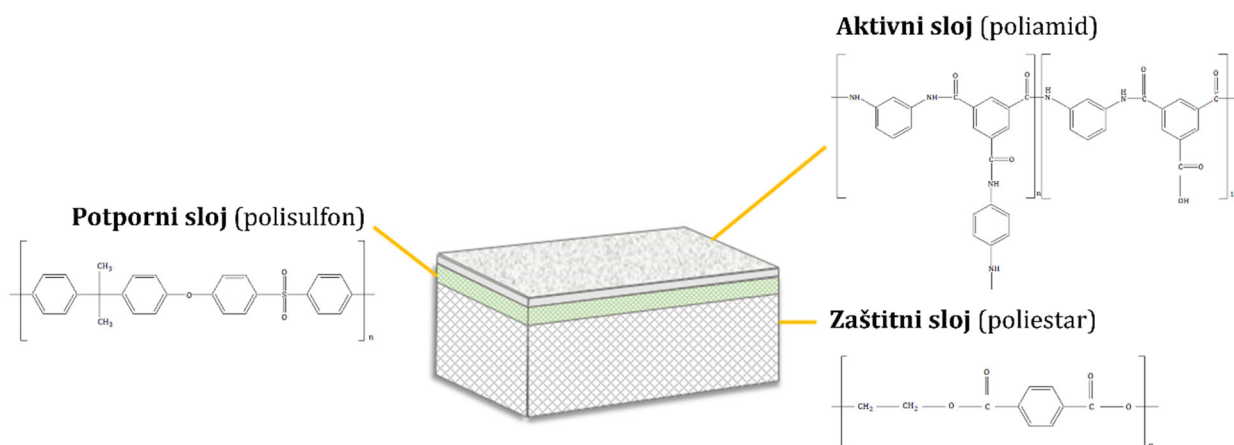
Slika 2.3. Šematski prikaz konfiguracije: a) monolitnog modula b) cevnog modula c) modula sa šupljim vlaknima i d) spiralno namotanog modula. Preuzeto i prilagođeno iz [226, 228]

2.8.3.2. Vrste membrana za nanofiltraciju

Nanofiltracioni proces uključuje upotrebu različitih membrana određenih karakteristika radi dobijanja što kvalitetnijeg proizvoda uz što manje gubitke [217]. Membrane pored veličine pora, definiše struktura kao i materijal od kojeg su konstruisane. Prema strukturi, mogu se podeliti na simetrične, asimetrične i kompozitne. Simetrične membrane poseduju identičnu veličinu pora po celokupnoj površini za razliku od asimetričnih kod kojih se veličine pora razlikuju i postepeno povećavaju. Kompozitne membrane se izdvajaju od pomenutih jednoslojnih membrana, jer u svom sastavu poseduju dodatni sloj koji je odgovaran za mehaničku stabilnost [205]. Materijali od kojih se membrane proizvode mogu biti organske i neorganske prirode. Sastavni deo organskih membrana jesu polimeri [227], dok se neorganske baziraju da upotrebi metala, zeolita, ugljenika i keramike [229].

Među polimerima koji ulaze u sastav membrana najčešće se primenjuju celuloza-acetat, poliamid, polisulfon i polietersulfon [205]. Membrane od celuloza-acetata se uglavnom proizvode kao jednoslojne simetrične ili asimetrične. Smatraju se hidrofilnim membranama sa odličnim adsorpcionim svojstvima [218], ali zbog strukture sklone su sabijanju usled delovanja visokog pritiska čime se smanjuje njihova permeabilnost [218]. Iako postoje dostupne studije o njihovoj upotrebi za prečišćavanje oligosaharida, njihova šira primena je limitirana zbog izražene osetljivosti na operativne parametre procesa (visoku temperaturu, pH i pritisak) [205]. Većina komercijalno dostupnih membrana koje dominiraju na tržištu i koje se potencijalno mogu primeniti za prečišćavanje oligosaharida jesu tankoslojne kompozitne membrane (Thin Film Composite, TFC). Ovaj tip membrane u svom sastavu sadrži tri sloja:

zaštitni, potporni sloj (noseći sloj) i aktivni sloj (slika 2.20.) [226]. Sastavni deo zaštitnog sloja je najčešće poliestarska mreža, dok su najčešće polimeri poput polisulfona i poliamida deo potpornog i aktivnog sloja, redom. Zbog svojih zavidnih karakteristika koje uključuju otpornost i stabilnost na kisele i bazne uslove procesa, polisulfon se često primenjuje za pripremu poroznog nosećeg sloja [226]. Različiti polimeri mogu biti upotrebljeni za formiranje aktivnog sloja, međutim često se koristi poliamid, jer se njegovom upotrebom postiže dobra mehanička čvrstoća, trajnost i selektivnost membrane [226].



Slika 2.20. Šematski prikaz karakteristične strukture tankoslojne kompozitne membrane

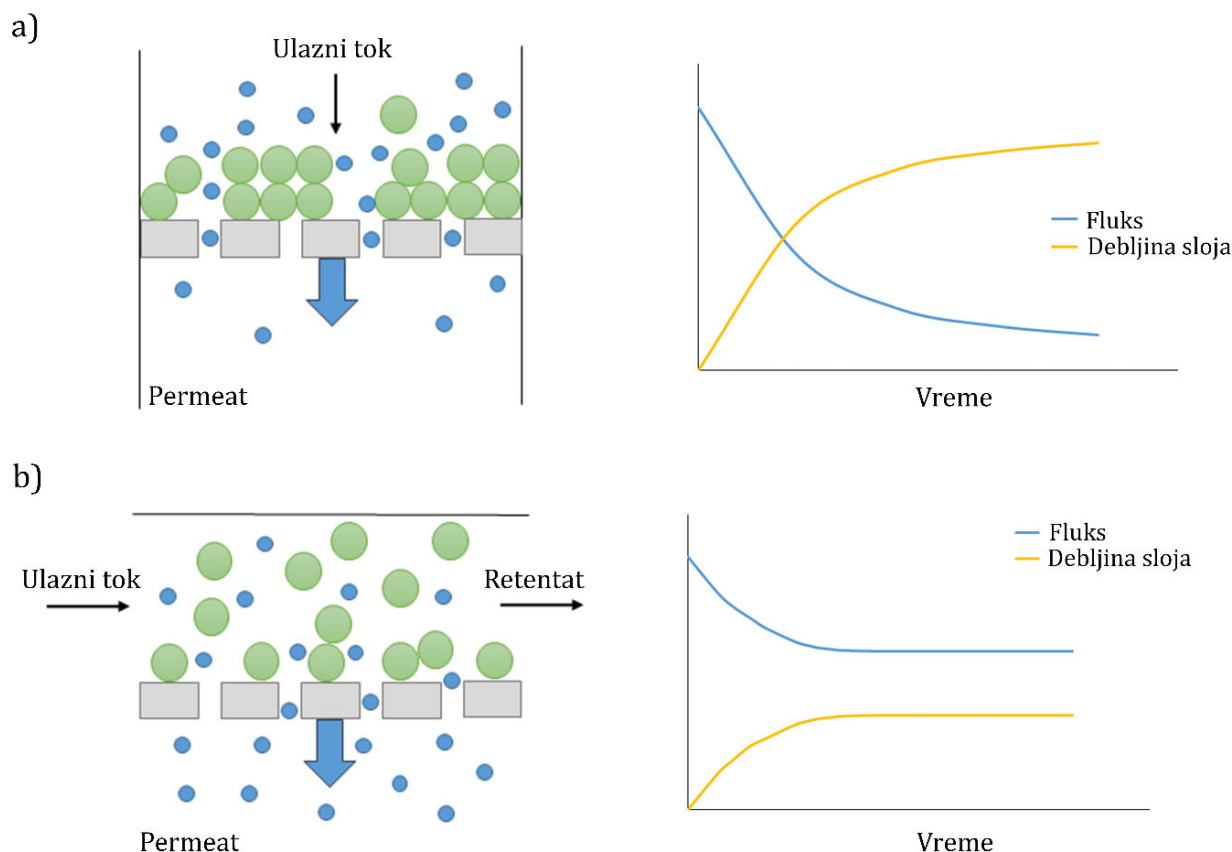
Sa druge strane, membrane proizvedene od neorganskih materijala poput aluminijuma, titanijuma, cirkonijuma poseduju usku raspodelu pora i veću poroznost što rezultira i boljim razdvajanjem [223]. Aktivni sloj keramičkih membrana je sastavljen od materijala dobijenog grupisanjem metala sa nemetalima u obliku oksida [227]. Ovu vrstu membrana karakterišu i izuzetna termička, hemijska i mehanička svojstva, kao i dug vek trajanja [223, 225]. Iako neorganski materijali poseduju superiornije karakteristike od polimernih, njihov glavni nedostatak jeste visoka cena čime je i njihova upotreba ograničena [227].

Prema opsežnoj analizi relevantne literature, postoje podaci da su za prečišćavanje smeše FOS u cilju dobijanja proizvoda veće čistoće i prinosa korišćene keramičke membrane [230], polietersulfonske NP010 i NP030 [231] kao i poliamidne GH-NF [198], NF270 [211], Desal-5 DL i Desal-5 HL [231]. Kako ne postoje podaci o upotrebi tankoslojne kompozitne membrane sa poliamidnim aktivnim slojem - NFW, NDX i NFG (Synder) u svrhu prečišćavanja biološki aktivnih FOS, u okviru ove doktorske disertacije će detaljno biti razmatrane i obrađene u segmentu rezultati i diskusija (poglavlje 4.4.)

2.8.3.3. Način izvođenja procesa nanofiltracije

Od načina izvođenja konvencionalnih nanofiltracionih procesa zavisi stepen separacije [220] pa se prema tome razlikuju dva režima rada: jednosmerna filtracija (dead-end) i tangencijalna filtracija (cross-flow) [232].

U slučaju izvođenja jednosmerne (dead-end) filtracije, dovodni tok se uvodi normalno na membranu, usled čega dolazi do akumulacije različitih molekula na samoj površini membrane i formiranja filtracionog sloja. U ovom slučaju fluks smeše koja se prečišćava se smanjuje sa vremenom, dok se debljina filtracionog sloja proporcionalno povećava (slika 2.21a) [233].



Slika 2.21. Šematski prikaz režima rada a) jednosmerne (dead-end) i b) tangencijalne (cross-flow) filtracije

Ovakva konfiguracija toka omogućava odvijanje procesa jedino u šaržnom režimu rada. Sa druge strane, u slučaju tangencijalne (cross-flow) filtracije, dovodni tok teče tangencijalno na površinu membrane pri čemu dolazi do odvajanja dve faze: permeata (rastvora koji prolazi kroz membranu) i retentata (rastvora koji ne prolazi kroz membranu) [232]. Naime, dolazi do prolaza određenih komponenti kroz membranu koje se izdvajaju u vidu permeata, dok preostale nastavljaju u struji retentata [232]. U ovom slučaju postepeno se formira filtracioni sloj kojeg prati neznatno smanjenje fluksa, nakon čega se uspostavlja stacionarno stanje (slika 2.21b). Manja debljina sloja je posledica tangencijalnog strujanja koje dovodi do pomeranja zadržanih komponenti sa membrane u struji retentata (koncentrata) [232]. Tangencijalna filtracija je zbog manjeg zaprljanja u poređenju sa jednosmernom filtracijom pogodnija za industrijsku primenu, a recirkulacijom retentata omogućeno je izvođenje procesa prečišćavanja u kontinualnom režimu rada [205, 233]. Proces nanofiltracije se često izvodi u kombinaciji sa dijalizacijom, savremenom tehnikom za unapređenje prečišćavanja, [234] koja podrazumeva uvođenje vode radi potpunijeg ispiranja nagomilanih komponenti sa membrane [230].

2.8.3.4. Uticaj operativnih parametara na proces nanofiltracije

Ključna karakteristika membrane od koje zavisi uspešnost i efikasnost procesa prečišćavanja je njena selektivnost. Idealna membrana bi trebalo da u potpunosti zadrži sve komponente čija je molekulska masa veća od definisane, međutim usled različitog prečnika pora to nije slučaj, pa se stoga definiše preko MWCO. Međutim, pored definisanih karakteristika od strane proizvođača, preporučuje se određivanje retencionih svojstava komponenti i membrane i eksperimentalnim putem. Prema tome, koliko je membrana za separaciju selektivna u odnosu

na prisutne komponente smeše kvantifikuje se preko koeficijenta odbijanja. Koeficijent odbijanja predstavlja meru sposobnosti membrane da zadrži rastvorne komponente napojne smeše [220].

Ovaj parametar se može odrediti na dva načina tj. na osnovu predloženih jednačina za preračunavanje iz retentata i permeata. Koeficijent odbijanja se iz retentata, može izračunati na sledeći način [235]:

$$C_{nR} = C_{nF} \left(\frac{V_F}{V_R} \right)^R \quad (7)$$

gde je: C_{nR} – koncentracija komponente n u retentatu, C_{nF} – koncentracija komponente n u napojnoj smeši, V_F – zapremina inicijalne napojne smese, V_R – zapremina retentata, R – koeficijent odbijanja komponente n koji može imati vrednosti od 0 (ukoliko određena komponenta bez ograničenja prolazi kroz membranu) i 1 (ukoliko je membrana nepropustljiva za određenu komponentu).

Logaritmovanjem jednačine 7, dobija se:

$$\ln C_{nR} = \ln C_{nF} + R \ln \left(\frac{V_F}{V_R} \right) \quad (8)$$

Nakon konstruisanja grafika zavisnosti $\ln C_{nR} - \ln (V_F/V_R)$ iz nagiba se može odrediti koeficijent odbijanja R

Takođe, pomenuti koeficijent je moguće odrediti i korišćenjem podataka dobijenih iz permeata, preko sledeće jednačine [236]:

$$R = \left(1 - \frac{C_{nP}}{C_{nF}} \right) \quad (9)$$

gde je: C_{nP} – koncentracija komponente n u permeatu, a C_{nF} – koncentracija komponente n u napojnoj smeši

Pored membranske konfiguracije i veličine pora, operativni parametri poput pritiska, brzine protoka, temperature i koncentracije ostvaruju direktan uticaj na difuziju rastvornih komponenti pa su stoga takođe ključni u određivanju efikasnosti procesa prečišćavanja [218, 237].

Pritisak predstavlja pogonsku silu za odvijanje masenog transporta kroz membranu i u uskoj je korelaciji sa primenjenim protokom sistema. Prema dosadašnjim istraživanjima čiji je fokus na separaciji ugljenih hidrata, ustanovljeno je da se sa povećanjem fluksa rastvarača povećava i pritisak sistema koji se najviše odražava na odbijanje rastvornih komponenti. Naime, sa povećanjem pritiska dolazi do kompresije membrane što posledično dovodi do smanjenja pora i povećanja adsorpcionog potencijala vode rezultirajući slabijom permeacijom molekula manjih molarnih masa i većim koeficijentima odbijanja čime je smanjena selektivnost [205]. Ovakvo zapažanje je prijavljeno od strane Nabarlaca (Nabarlatz) i sar. koji su odvajali XOS od lignina i drugih nečistoća prisutnih u ljusci badema [238], ali i Gulasa (Goulas) i ostalih koji su razmatrali efekat pritiska na koeficijente odbijanja glukoze, saharoze i rafinoze [239]. Prijavljeno je i da povećanje pritiska indukuje postojanje većeg porasta koeficijenata odbijanja kod molekula manjih molarnih masa poput mono- i disaharida u poređenju sa oligosaharidima [205]. Stoga, radi veće efikasnosti prečišćavanja, procese treba izvoditi pri nižim pritiscima [218].

Temperatura takođe predstavlja faktor od kojeg zavisi uspešnost procesa prečišćavanja. Materijal membrane ograničava operativnu temperaturu procesa, pa u skladu sa tim poliamidne membrane su limitirane na 50 °C, dok membrane sa aktivnim slojem polisulfona mogu da podnesu znatno više temperature (90 °C). Međutim, izvođenje separacije na visokim

temperaturama značajno utiče na povećanje ukupnih troškova procesa [205]. U literaturi postoji jednačina poznata kao Nerst-Plankonova jednačina ($r_p \cong 0.0036T + 0.68$) kojom je opisana korelacija između temperature i radijusa veličine pora [217]. Takođe, prijavljeno je da sa porastom temperature, dolazi do smanjenja adsorpcionog sloja vode na površini membrane čime je efektivna veličina pora veća, ali i do porasta toplotne energije koje dovodi do smanjenja energetske barijere koja postoji u porama olakšavajući difuziju molekula [218]. Stoga, povećanje temperature dovodi do smanjenja koeficijenata odbijanja što potvrđuju i prijavljeni rezultati u studiji Lea i sar. [205]. Naime, oni su izvodili proces prečišćavanja na dve različite temperature (25 i 60 °C) i prijavili da je sa porastom temperature ostvarena veća propusnost monosaharida (fruktoze i glukoze), dok je zadržanost saharoze ostala ista (veća od 90 %) [240].

Pored pomenutih radnih faktora, koncentracija komponenti koje učestvuju u procesu prečišćavanja takođe utiče na efikasnost. Feng i sar. su ispitivanjem uticaja ovog parametra u cilju prečišćavanja GOS prijavili da povećanje inicijalne koncentracije dovodi do smanjenja koeficijenata odbijanja [241]. Iako uvođenje veće koncentracije ukupnih ugljenih hidrata dovodi do izraženije koncentracione polarizacije tj. akumulacije komponenti na membrani, smanjenje koeficijenata odbijanja može biti i posledica izazvanog prodoriranja rastvorenih supstanci [205]. S obzirom na to da početna koncentracija može uticati na povećanje propusnosti, ali i dovesti do zaprljanja membrane i smanjiti vek upotrebe [242] u cilju efikasnog prečišćavanja treba pažljivo razmotriti ovaj parametar.

Do sada je objavljeno nekoliko studija u kojima je razmatran uticaj operativnih parametara na proces prečišćavanja FOS upotrebom različitih membrana u cilju dobijanja proizvoda što veće čistoće. Pregled dostupnih studija sa izabranim optimalnim uslovima je prikazan u tabeli 2.10.

Tabela 2.10. Pregled optimalnih radnih uslova i membrana za nanofiltraciju FOS

Membrana	Režim rada	T, °C	Pritisak, bar	Koncentracija, g/L	Protok, L/min	Čistoća FOS, %	Ref.
NP030	Dead-end	25	35	350	6,0	>90	[231]
GH-NF	Cross-flow	45	25	100	30,0	>90	[198]
GK-NF	Cross-flow	45	25	100	30,0	>90	[198]
NF5	Dead-end	45	35	100	/	92,3	[243]

2.9. Membranski reaktor

Potreba za postojanjem efikasnih i održivih procesa prečišćavanja sa potencijalom za industrijsku primenu izazvala je ogromno interesovanje istraživača i naučnih institucija ka razvoju simultanih procesa, a ujedno i membranskog reaktora [218]. Membranski reaktor predstavlja sistem koji za razliku od konvencionalnih reaktorskih sistema koji obezbeđuju jednu funkciju, pruža mogućnost simultanog izvođenja različitih procesa. Ovaj sistem omogućava kombinaciju sinteze i prečišćavanja željenih komponenti. Sa aspekta FOS, u membranskom reaktoru omogućena je biohemijska konverzija supstrata (saharoze) u željene prebiotike, a uz upotrebu odgovarajuće membrane i selektivno uklanjanje sporednih proizvoda reakcije. Prema dostupnim studijama koje navode da reakcijom transfruktozilacije dolazi do oslobađanja glukoze koja predstavlja inhibitor u sintezi FOS [133], primena pomenutog reaktorskog sistema kojim se može obezbediti odvođenje ove komponente može uticati na poboljšanje konverzije supstrata favorizujući sintezu proizvoda [232]. U ovom sistemu, upotrebom FT radi produkcije FOS, dolazi do zadržavanja enzima na membrani zbog specifikacija membrane koju definiše mala veličina pora u poređenju sa veličinom enzima. Prema tome, akumulacija biokatalizatora na membrani je posledica uspešne konverzije i funkcionalnosti membranskog reaktora. Pored pomenutog, vodeće prednosti membranskog reaktora uključuju i mogućnost odvijanja kontinualnih procesa, veću produktivnost, bolje stope konverzije odvođenjem inhibitora kao i jednostavno izvođenje procesa [218], dok se među nedostacima može izdvojiti pojava koncentracione polarizacije i zaprljanja membrane čime je skraćen njen vek upotrebe [232]. Najčešće se za realizaciju ovih procesa koriste membranski moduli koji su ravnog oblika (membrana u ramu), spiralni ili cevni [232].

Postoje dostupne studije koje navode da je membranski reaktor veoma uspešno primenjen za dobijanje proizvoda visoke čistoće funkcionalnih oligosaharida [133, 244, 245]. Konkretno za FOS, Nišizava (Nishizawa) je koristio membranski reaktor i prijavio čistoću proizvoda iznad 90 % FOS upotrebom saharoze, β -fruktofuranozidaze produkovane od strane gljive *A. niger* i membrane za nanofiltraciju na bazi poliamida (NF-45) [133]. U okviru ove doktorske disertacije će biti prikazana upotreba membranskog reaktora u cilju razvoja efikasnog simultanog postupka sinteze i separacije FOS primenom poliamidne membrane sa uskom raspodelom pora, saharoze kao supstrata i FT iz komercijalnog enzimskog preparata Pectinex® Ultra SP-L kao odgovarajućeg biokatalizatora.

2.10. Plan istraživanja

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije će biti usmerena ka realizaciji postavljenih ciljeva koji se odnose na:

- *razvoj novih i unapređenje postojećih postupaka sinteze FOS primenom slobodne i imobilisane FT*
- *razvoj katalitički aktivnih imobilisanih preparata FT sa potencijalom dalje primene u različitim reaktorskim konfiguracijama*
- *razvoj kontinualnih procesa proizvodnje FOS na laboratorijskom nivou sa perspektivom primene u industrijskim uslovima*
- *primenu membranske separacione tehnike tj. nanofiltracije u cilju dobijanja proizvoda veće čistoće FOS*
- *primenu membranskog reaktora radi simultanog izvođenja sinteze i prečišćavanja FOS i dobijanja troškovno efikasnijeg procesa*
- *testiranje prečišćene smeše FOS u in vitro TIM-2 dinamičkom modelu koji simulira procese u debelom crevu zarad procene prebiotskog potencijala*
- *primenu prethodno stečenih znanja zarad razvijanja funkcionalnih proizvoda obogaćenih prebioticima*

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Materijali

Lista korišćenih supstanci i hemikalija:

- Saharoza, anhidrovana (Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD)
- Pectinex® Ultra SP-L (Novozymes, Bagsvard, Danska), smeša enzima
- Viscozyme® L (Novozymes, Bagsvard, Danska), smeša enzima
- Viscoflow (Novozymes, Bagsvard, Danska), smeša enzima
- Natrijum-acetat trihidrat, $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$ (Zdravlje, Leskovac, Srbija)
- Natrijum-dihidrogenfosfat, NaH_2PO_4 (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Dinatrijum-hidrogenfosfat, Na_2HPO_4 (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Natrijum-bisulfit, NaHSO_3 (Carl Roth, Karlsruhe, Nemačka)
- Filteri za špric (Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD)
- Membrane za nanofiltraciju NFW, NDX i NFG (Synder Filtration Company, Vakavil, SAD)
- Kolona za detekciju ugljenih hidrata (Agilent Hi-Plex Ca^{2+} , Santa Clara, USA)
- Kolona za detekciju polifenola (Agilent Zorbax Eclipse Plus C-18, Santa Clara, USA)
- 1-kestoza, analitički standard (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirhen, Nemačka)
- Nistoza, analitički standard (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirhen, Nemačka)
- 1-fruktofuranozil nistoza, analitički standard (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirhen, Nemačka)
- Hidrofilne nanočestice silike Aerosil® 380 (FNS) (Evonik Industries, Esen, Nemačka)
- Makroporozni nosač Purolite® A109 (Purolite, Pensilvanija, SAD)
- Kalcijum-hlorid, CaCl_2 (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Kalijum natrijum tartarat, $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$ (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Natrijum-karbonat, Na_2CO_3 (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Bakar-sulfat, $\text{Cu}_2\text{SO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Albumin iz govedeg seruma, BSA (Sigma Chemical Co., Sent Luis, SAD)
- Komasi plava boja G-250 (Fluka Analytical, Stokbridž, SAD)
- Kalijum-bromid, KBr (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Pektin iz jabuke (Sigma Chemical Co., Sent Luis, SAD)
- Glukoza, anhidrovana (Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD)
- Nosač Purolite Lifetech™ ECR8409F (Purolite, Pensilvanija, SAD)
- Nosač Purolite Lifetech™ ECR8806M (Purolite, Pensilvanija, SAD)
- Nosač Purolite Lifetech™ ECR8285F (Purolite, Pensilvanija, SAD)
- Nosač Purolite® A109 (Purolite, Pensilvanija, SAD)
- Natrijum-hlorid, NaCl (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Hranljivi bujon (Torlak, Beograd, Srbija)
- MRS bujon (Torlak, Beograd, Srbija)
- Kvašev ekstrakt (Torlak, Beograd, Srbija)
- 1-pepton (Torlak, Beograd, Srbija)
- Tripton (Torlak, Beograd, Srbija)
- Mesni ekstrakt (Torlak, Beograd, Srbija)
- Tween-80 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirhen, Nemačka)
- Kalijum-hidrogenfosfat, K_2HPO_4 (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Amonijum-citrat, $(\text{NH}_4)_3$ -citrat (Carl Roth, Karlsruhe, Nemačka)
- Mangan-sulfat monohidrat, $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Magnezijum-sulfat heptahidrat, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Agar (Torlak, Beograd, Srbija)
- Javorov sirup (Nature's Promise Organic, Kanada)

- TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin) (Sigma-Aldrich, Štajnhajm, Nemačka)
- Gvožđe (II)-sulfat heptahidrat, $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, Štajnhajm, Nemačka)
- Glacijalna sirćetna kiselina, CH_3COOH (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Hlorovodonična kiselina, HCl (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Natrijum-hidroksid, NaOH (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Voda HPLC čistoće (Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD)
- Toluen (Carl Roth, Karlsruhe, Nemačka)
- Trietilamin (Carl Roth, Karlsruhe, Nemačka)
- 3-aminopropiltrimetoksisilan (APTMS) (Fluka Analytical, Stokbridž, SAD)
- Cijanuril-hlorid (Fluka Analytical, Stokbridž, SAD)
- Aceton (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Sumporna kiselina, H_2SO_4 (96 %) (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Acetonitril HPLC čistoće (Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD)
- Glutaraldehid, GA (25 %) (Sigma Chemical Co., Sent Luis, SAD)
- Triton X-100 (Acros Organic, Gel, Belgija)
- Etanol (Zorka Pharma, Šabac, Srbija)
- Metanol HPLC čistoće (Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD)
- Mravlja kiselina, CH_2O_2 (Zorka Pharma, Šabac, Srbija)
- Bromvodonična kiselina, HBr (Zorka Pharma, Šabac, Srbija)
- Benzen (Sigma Chemical Co., Sent Luis, SAD)
- Folinov reagens (ABCR GmbH & Co, Karlsruhe, Nemačka)
- Fosforna kiselina, H_3PO_4 (Zorka Pharma, Šabac, Srbija)
- 3,5-Dinitrosalicilna kiselina (Sigma Chemical Co., Sent Luis, SAD)
- Galna kiselina (Carl Roth, Karlsruhe, Nemačka)
- Gvožđe(III)-hlorid, FeCl_3 (Sigma-Aldrich, Štajnhajm, Nemačka)

Lista korišćenih mikroorganizama:

- *Lactiplantibacillus plantarum* 299v (Kolekcija sa Tehnološko-metalurškog fakulteta, Beograd, Srbija)
- *Lactocaseibacillus s rhamnosus* GG (ATCC 53103) (Kolekcija sa Tehnološko-metalurškog fakulteta, Beograd, Srbija)
- *Saccharomyces boulardii* CBS 5926 (Kolekcija sa Tehnološko-metalurškog fakulteta, Beograd, Srbija)
- *Escherichia coli* ATCC 25922 (Kolekcija sa Tehnološko-metalurškog fakulteta, Beograd, Srbija)

Lista korišćenih uređaja:

- Analitička vaga (AJ100 Mettler Toledo, Grajfenze, Švajcarska)
- Tehnička vaga (MP-3000 Chyo Balance Corp., Kjoto, Japan)
- pH metar (WTW inoLab pH 720, Šverte, Nemačka)
- Magnetna mešalica (IKA® C-MAG HS 7, Werke GmbH and Co., Štaufen, Nemačka)
- Orbitalna mešalica (IKA® KS 4000i control, Werke GmbH and Co., Štaufen, Nemačka)
- Termošejker (ThermoMixer® C, Eppendorf, Hamburg, Nemačka)
- Membranska pumpa (EMEC, Rijeti, Italija)
- Peristaltička pumpa (LLG, Mekenhajm, Nemačka)
- Vodeno kupatilo (Memmert, Bihenbah, Nemačka)
- RI detektor (ERC RefractoMax 520, Hoenbrun, Nemačka)
- HPLC sistem (Dionex Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD)
- Liofilizator (Biobase, Frimont, SAD)
- Vakuum sušnica (Binder Inc., Njujork, SAD)

- Ultrazvučno kupatilo (Gamed, Beograd, Srbija)
- Roler šejker (Stuart SRT9, Pariz, Francuska)
- Centrifuga (MiniSpin, Hamburg, Nemačka)
- UV-spektrofotometar (Ultrospec 3300 pro Amersham Biosciences, Frajburg, Nemačka)
- Vorteks (Reax 7000 Reidolph, Švabah, Nemačka)
- FTIR-spektrofotometar (BOMEM, Hartmann & Braun, Nemačka)
- Pneumatski reaktor sa unutrašnjom recirkulacijom (Beograd, Srbija)
- Autoklav (Sutjeska, Beograd, Srbija)
- Brojač kolonija (Funke Gerber, Berlin, Nemačka)
- Ručni refraktometar (Boeco, Hamburg, Nemačka)
- Rotacioni viskozimetar (Alpha series-Fungilab, Barselona, Španija)
- Vlagomer (MAR 50/1 mg Radwag, Radom, Poljska)

3.2. Metode

3.2.1. Određivanje transfruktozilacione aktivnosti

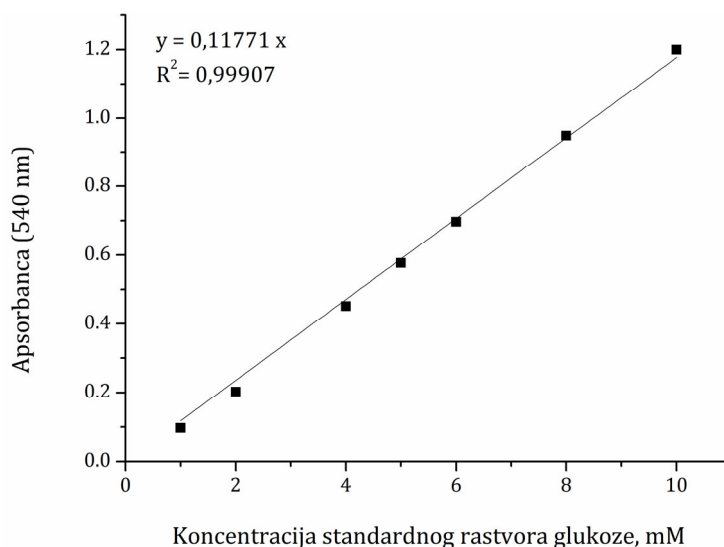
Aktivnost enzima FT iz komercijalnih enzimskih preparata Pectinex® Ultra SP-L, Viscozyme® L i Viscoflow® je određena praćenjem početne kinetike sinteze FOS. Naime, u erlenmjeru koji je sadržao 5 mL rastvora saharoze koncentracije 500 g/L i koji je termostatiran na 50 °C na orbitalnoj mešalici (IKA® KS 4000i control) dodata je određena količina enzimskog preparata (100 µL). Izvođenjem reakcije sinteze pri brzini mešanja od 120 rpm, u prvih 30 min od početka reakcije uzimani su uzorci (100 µL), razblaženi deset puta destilovanom vodom i dalje tretirani u termošejkeru (ThermoMixer® C) 5 min na 100 °C pri brzini mešanja od 300 o/min radi prekidanja reakcije. Uzorci su potom filtrirani korišćenjem filtera sa veličinom pora od 0,45 µm i analizirani upotrebom tečne hromatografije pod visokim pritiskom (HPLC, High-Performance Liquid Chromatography). Konstruisanjem grafika zavisnosti koncentracije FOS i vremena reakcije, preko dobijenog nagiba koji ilustruje početnu brzinu reakcije izračunata je i FT aktivnost. Jedna jedinica FT aktivnosti (IU) je definisana kao količina enzima koja katalizuje formiranje 1 µmol FOS po min pod tačno definisanim reakcionim uslovima. Prema opisanom postupku, određeno je da preparat Pectinex® Ultra SP-L ima aktivnost FT od 255 IU/mL.

3.2.2. Određivanje pektinolitičke aktivnosti

Praćenje pektinolitičke aktivnosti izvedeno je u cilju provere selektivnosti imobilizacije FT u odnosu na pektinaze iz primenjenog komercijalnog enzimskog preparata Pectinex® Ultra SP-L.

Pektinolitička aktivnost iz komercijalnog preparata Pectinex® Ultra SP-L određena je praćenjem početne kinetike hidrolize pektina i merenjem koncentracije nastalih redukujućih šećera DNS metodom [246]. Za ovu svrhu, korišćen je DNS reagens koji se priprema rastvaranjem 8 g NaOH i 5 g dinitrosalicilne kiseline u 150 mL destilovane vode i 150 g C₄H₄KNaO₆ u 100 mL destilovane vode. Pripremljeni rastvori se mešaju i razblaže destilovanom vodom do zapremine od 0,5 mL. Za određivanje aktivnosti pektinaza, korišćen je rastvor pektina koncentracije 0,5 % (w/v) koji je pripremljen upotrebom 0,1 M acetatnog pufera (pH 4,5). Rastvor je potom zagrevan na 50 °C na magnetnoj mešalici radi potpunog rastvaranja. Reakcija hidrolize je izvedena u erlenmajeru koji je sadržao 10 mL rastvora pektina i 0,25 % (v/v) enzimske smeše na orbitalnoj mešalici na 50 °C pri brzini mešanja od 120 o/min. Hidroliza pektina je praćena pomenutom DNS metodom koja je podrazumevala uzimanje određene količine uzorka (0,25 mL) u prvih 30 min, dodavanje identične količine DNS reagensa (0,25 mL), kuvanje u ključalom vodenom kupatilu 5 min, i potom dodavanje destilovane vode (2 mL). Apsorbanca dobijenih uzoraka je merena spektrofotometrijski na 540 nm. Na osnovu dobijene vrednosti apsorbanci i nagiba prethodno konstruisane standardne prave, određena je koncentracija glukoze (redukujućih šećera) iz koje je proračunata pektinolitička aktivnost. Jedna jedinica aktivnosti (IU) je definisana kao količina enzima koja katališe formiranje 1 µmol redukujućih šećera po min pod tačno definisanim reakcionim uslovima. Prema opisanom postupku, određeno je da preparat Pectinex® Ultra SP-L ima aktivnost pektinaza od 605 IU/mL.

Za konstruisanje standardne prave, korišćen je rastvor glukoze koncentracije 10 mM. Pripremom serije razblaženja i analize uzoraka DNS metodom dobijene su različite vrednosti apsorbance, a na osnovu grafika zavisnosti apsorbance i koncentracije glukoze, dobijen je nagib standardne prave ($1,1771 \times 10^{-1} \text{ mM}^{-1}$) koji je korišćen za određivanje koncentracije redukujućih šećera.



Slika 3.1. Standardna prava za određivanje koncentracije redukujućih šećera DNS metodom

3.2.3. Određivanje proteina

3.2.3.1. Određivanje koncentracije proteina metodom po Loriju

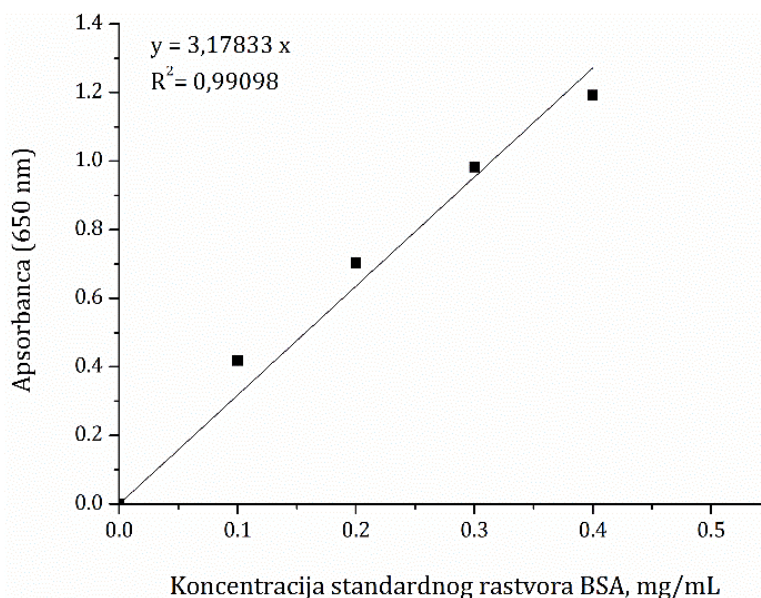
Koncentracija proteina u enzimskom preparatu i uzorcima određena je modifikovanom Lorijevom metodom [247]. Ova metoda uključuje upotrebu alkalnog rastvora bakra koji sa atomima azota iz peptidne veze proteina formira kompleks i redukuje se do jednovalentnog bakra. Dalji tok metode uključuje upotrebu Folinovog reagensa koji reaguje sa formiranim kompleksom i redukuje se u molibden-volfram plavo. Nastalo plavo obojenje koje se formira kao posledica reakcije sa proteinima, spektrofotometrijski se detektuje na 650 nm. Za određivanje proteina modifikovanom metodom po Loriju korišćeni su rastvori koji se pripremaju na sledeći način:

Rastvor A: 2 g $C_4H_4KNaO_6$ i 100 g Na_2CO_3 se rastvori u 500 mL rastvora NaOH (1 M) i razblaži destilovanom vodom do 1 L.

Rastvor B: 2 g $C_4H_4KNaO_6$ i 1 g $Cu_2SO_4 \cdot 5 H_2O$ se rastvori u 90 mL destilovane vode i dopuni do 100 mL rastvorom NaOH (1 M).

Rastvor C: 1 zapremina Folin-ovog reagensa (2 M) se razblaži sa 15 zapremina destilovane vode.

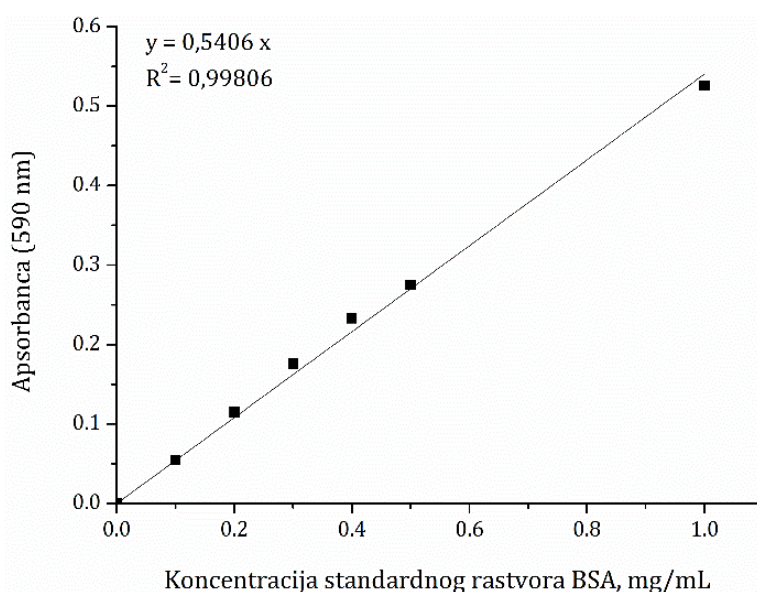
Postupak izvođenja ove metode uključuje upotrebu 1 mL uzorka i 0,9 mL rastvora A, inkubiranje u vodenom kupatilu 10 min na 50 °C, a zatim hlađenje do sobne temperature. Nakon toga dodaje se 0,1 mL rastvora B uz učestalo mešanje na vorteksu i inkubira na sobnoj temperaturi najmanje 10 min. Uzorak se dalje tretira sa 3 mL rastvora C uz mešanje, a potom se inkubira 10 min na 50 °C. Posle hladnjenja do sobne temperature, meri se apsorbanca na talasnoj dužini od 650 nm. Kontrolni uzorak je sadržao 1 mL destilovane vode (umesto zorka) i tretiran je na identičan način. Sadržaj proteina u uzorku (mg/mL) se određuje preko nagiba konstruisane standardne prave (3,17833 mL/mg) koja se dobija na osnovu izmerenih apsorbanci rastvora različitih koncentracija proteina (0,1-0,5 mg/mL) korišćenjem albumina iz goveđeg seruma (Bovine Serum Albumin, BSA) (slika 3.2).



Slika 3.2. Standardna prava za određivanje koncentracije proteina Lorijevom metodom

3.2.3.2. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bredfordu

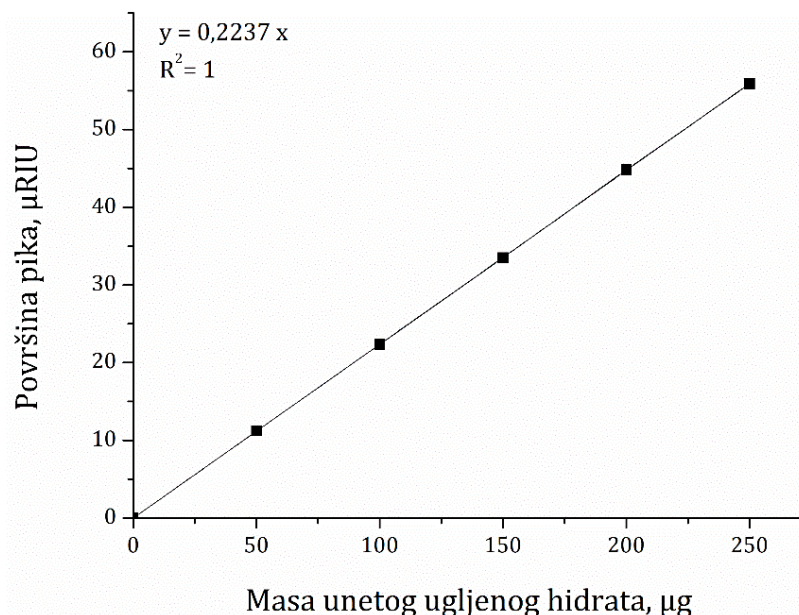
Za određivanje koncentracije proteina korišćena je takođe i Bredfordova metoda [248] koja se zasniva se na reakciji aminokiselina (najčešće arginina) sa anjonskim oblikom molekula komasi plave boje (Coomassie Blue G-250) dajući plavo obojeni kompleks. Ova metoda podrazumeva upotrebu Bredfordovog reagensa koji se priprema tako što se najpre rastvori 100 mg plave boje u 50 mL etanola (95 %), zatim doda 100 mL fosforne kiseline (85 %) i sud dopuni destilovanom vodom do zapremine od 1L. Rastvor se potom filtrira i čuva u tamnoj boci ne duže od 1 meseca. Za analizu je korišćena određena količina uzorka (20 μ L) i 1 mL Bredfordovog reagensa. Nakon 5 min trajanja reakcije, merena je apsorbanca na talasnoj dužini od 590 nm. Koncentracija proteina u uzorcima je određena na osnovu dobijene apsorbanca uzorka i nagiba standardne prave ($5,406 \times 10^{-1}$ mL/mg). Standardna prava je konstruisana korišćenjem različitih koncentracija rastvora BSA (0,1-1,0 mg/mL). Prema ovoj metodi utvrđeno je da je u prepratu Pectinex® Ultra SP-L prisutno 10 mg/mL proteina.



Slika 3.3. Standardna prava za određivanje koncentracije proteina Bredfordovom metodom

3.2.4. Određivanje koncentracije ugljenih hidrata HPLC metodom

Kvantifikacija sastava uzoraka određena je korišćenjem Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific HPLC uređaja. Radi definisanja sastava ugljenih hidrata, korišćena je Agilent Hi-Plex Ca²⁺ kolona za šećere (300 mm x 7,7 mm, 8 μm) na temperaturi od 80 °C. Kao mobilna faza korišćena je voda HPLC čistoće, sa protokom od 0,6 mL/min. Prisutne šećerne komponente su detektovane upotrebom RI detektora, a za prikupljanje i obradu podataka korišćen je program Chromeleon 7.2 Data System. Za konstruisanje kalibracione prave radi kvantitativnog određivanja prisutnih ugljenih hidrata korišćeni su standardi glukoze, fruktoze, saharoze, 1-kestoze (FOS 3), nistoze (FOS 4) i 1-fruktofuranozil nistoze (FOS 5) (slika 3.4).



Slika 3.4. Standardna prava za određivanje ugljenih hidrata HPLC metodom

3.2.5. Enzimaska sinteza FOS upotrebom slobodnog enzima

Reakcije enzimske sinteze FOS upotrebom slobodnog enzima su izvedene u šlifovanim erlenmajerima u kojima je inicijalno dodato 50 mL rastvora saharoze definisane koncentracije. Erlenmajeri su termostatirani na željenoj temperaturi reakcije u orbitalnoj mešalici nakon čega je dodata definisana količina enzimskog preparata Pectinex[®] Ultra SP-L. Reakcije su izvedene pri brzini mešanja od 120 rpm, a u tačno definisanim vremenskim intervalima u periodu od 0- 24 h uzimani su uzorci (100 μL), razblaženi deset puta, tretirani u termošejkeru 5 min na 100 °C pri brzini mešanja od 300 rpm zbog prekidanja reakcije i dalje analizirani na HPLC-u. Radi utvrđivanja optimalnih uslova sinteze FOS, ispitan je uticaj operativnih parametara koji uključuju temperaturu (30-70 °C), pH (4,0-8,0), koncentraciju supstrata (100-700 g/L) i koncentraciju enzima (1-5 % (v/v)). Prilikom sprovođenja pomenutih eksperimenata u kojima su varirani pojedinačni parametri, ostali parametri su bili konstantni.

3.2.5.1. Parametri praćenja procesa enzimske sinteze FOS

Parametri koji su korišćeni za definisanje i praćenje reakcija sinteze FOS poput *udela FOS u ukupnim ugljenim hidratima (%)*, *stepena hidrolize saharoze (%)* i *produktivnosti (g FOS/mL)*, dobijeni su korišćenjem sledećih jednačina:

$$\text{Udeo FOS u ukupnim ugljenim hidratima} = \frac{C_{FOS}}{C_{uk}} \times 100 \%, \quad (10)$$

$$\text{Stepen konverzije saharoze} = \frac{(C_0 - C_t)}{C_0} \times 100 \% \quad (11)$$

$$\text{Produktivnost} = \frac{m_{FOS,t}}{V_E} \times 100 \% \quad (12)$$

gde je: C_0 – početna koncentracija saharoze, C_t – koncentracija saharoze u definisanom vremenu, C_{FOS} – koncentracija FOS, C_{uk} – ukupna koncentracija svih ugljenih hidrata, $m_{FOS,t}$ – masa FOS u definisanom vremenu, a V_E – uneta zapremina enzimskog preparata.

3.2.6. Imobilizacija enzima

3.2.6.1. Modifikacije nanočestica za imobilizaciju

3.2.6.1.1. Modifikacija neporoznih nanočestica silike 3-aminopropiltrimetoksisilanom (APTMS-om)

U stakleni balon je odmereno 300 mg neporoznih komercijalnih nanočestica silike (FNS) i dodato 1,18 mL APTMS-a, 36 mL toluena i 50 μ L trietilamina uz kontinuirano dovođenje azota u trajanju od 48 h. Reakcija modifikacije je izvedena na 25 °C uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici. Nakon završene modifikacije, čestice su filtrirane, isprane tri puta korišćenjem 5 mL toluena, a zatim podvrgnute i ultrazvuku radi uklanjanja aminosilana. Ovako dobijena prečišćena amino-modifikovana silika (AFNS) je potom sušena 24 h u vakuum sušnici na 40 °C, a nakon toga do upotrebe čuvana u eksikatoru.

3.2.6.1.2. Aktivacija amino-modifikovanih nanočestica silike cijanuril-hloridom

U stakleni balon je odmereno 200 mg amino-modifikovanih nanočestica silike (AFNS) i dodato 1 g cijanuril-hlorida, 70 mL acetona i 50 μ L trietilamina uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici. Proces aktivacije je izveden na 0 °C u trajanju od 2 h. Nakon toga, čestice aktivirane cijanuril-hloridom (CCAFNS) su filtrirane, isprane tri puta korišćenjem 5 mL acetona, a potom sušene 24 h u vakuum sušnici na 40 °C i do upotrebe čuvane u eksikatoru.

3.2.6.2. Priprema makroporoznih nosača za imobilizaciju

Za izvođenje imobilizacije i modifikacije makroporoznog nosača Purolite® A109, pre same upotrebe neophodno je izvršiti pripremu samog nosača. U erlenmajeru, u kojem je odmerena određena količina nosača, dodat je rastvor H_2SO_4 (5 %) tako da površina čestica bude u potpunosti prekrivena i postavljen u ultrazvučno kupatilo 15 min. Nakon toga, vakuum filtracijom su odvojene čestice i isprane velikom količinom destilovane vode. Čestice su potom vraćene u erlenmajer i identičnim postupkom tretirane rastvorom NaOH (1 M), a zatim i acetonitrilom. Nakon vakuum filtracije i temeljnog ispiranja vodom, čestice su ostavljene na 25 °C, radi sušenja. Nosač pripremljen po opisanoj proceduri, je spreman za modifikaciju i imobilizaciju.

3.2.6.3. Modifikacije makroporoznih nosača za imobilizaciju

3.2.6.3.1. Modifikacija makroporoznog nosača upotrebom epihlorhidrina

Uvođenje epoksidnih grupa na površini nosača Purolite® A109 je izvedeno inkubiranjem 1 g prečišćenog nosača sa 330 μ l epihlorhidrina i 3 mL rastvora NaOH (1M). Erlenmajer sa pomenutim komponentama je postavljen na orbitalnu mešalicu u cilju odvijanja reakcije na temperaturi od 55 °C u trajanju od 30 min pri brzini mešanja 100 o/min. Po završetku reakcije, nosač je profiltriran, dva puta ispran acetonom i postavljen na sušenje u vakuum sušnici na 40 °C, 24 h. Nosač modifikovan na ovaj način je stabilan duži vremenski period.

3.2.6.3.2. Modifikacija makroporoznog nosača upotrebom glutaraldehida (GA)

Upotrebom različitih koncentracija GA moguće je izvršiti dve modifikacije koje rezultiraju formiranjem monomera (0,5 % GA) i dimera (15 % GA) na površini nosača. Najpre su pripremljene različite koncentracije rastvora GA (0,5 i 15 %) u zapremini od 5 mL, rastvaranjem inicijalnog rastvora GA u 200 mM fosfatnom puferu (pH 7,0), a nakon toga je proveren pH jer izrazito visoke vrednosti mogu ukazati na pojavu polimerizacije GA. Modifikacija 15 % GA je izvedena inkubiranjem 50 mg nosača sa 200 μ L pripremljenog rastvora ove koncentracije u plastičnoj vijali zapremine 5 mL koja je postavljena na roler šejker 15 h na 25 °C uz blago mešanje. Nosač je potom filtriran i ispran 25 mM fosfatnim puferom, a potom i destilovanom vodom. U slučaju upotrebe 0,5 % GA, postupak modifikacije je izveden na isti način, s tim što je vreme trajanja reakcije iznosilo 1 h. Ovako pripremljeni nosači su stabilni 24 h na 4 °C.

3.2.6.4. Desorpcija enzima

Radi utvrđivanja tipa prisutnih veza, imobilisani preparati su tretirani rastvorima kalcijum-hlorida i tritona. Najpre su tretirani 1M rastvorom CaCl₂ 1 h na 25 °C uz blago mešanje na roler šejkeru u cilju utvrđivanja prisutnih elektrostatičkih interakcija. Nakon toga, odvojeni su supernatanti koji su dalje korišćeni za određivanje proteina, a imobilisani preparati su ispirani tri puta destilovanom vodom i korišćeni za određivanje FT aktivnosti. Imobilisani preparati su potom tretirani tritonom X-100 radi utvrđivanja prisutnih hidrofobnih interakcija. Ostvarena FT aktivnost nakon ovog tretmana sugerise na prisustvo kovalentnih veza.

3.2.6.5. Odredjivanje koncentracije amino grupa na površini nosača

Koncentracija amino grupa na površini nosača utvrđena je titracijom koja uključuje upotrebu rastvora NaOH (10 mM). Naime, 50 mg modifikovanih čestica Purolite® A109 je inkubirano u 25 mL rastvora HCl (10 mM) u trajanju od 30 min, a potom i odvojeno centrifugiranjem. Dobijeni supernatant (25 mL) je titrisan rastvorom NaOH u prisustvu fenolftaleina kao indikatora. Prema utrošenoj zapremini NaOH, preračunata je koncentracija amino grupa na površini nosača i izražena kao μ mol/g nosača.

3.2.6.6. Odredjivanje koncentracije epoksidnih grupa na površini nosača

Koncentracija epoksidnih grupa je utvrđena titracijom, upotrebom rastvora HBr/CH₃COOH koji je pripremljen rastvaranjem 6 mL HBr (45%) u 250 mL CH₃COOH. U sud je odmereno 100 mg čestica, dodato 20 mL benzena, 10 mL glacijalne CH₃COOH i nekoliko kapi kristal violet boje rastvorene u CH₃COOH (1 %) kao indikatora. Prema utrošenoj zapremini rastvora za titraciju i prethodno dobijenog nagiba standardne prave ($4,9 \times 10^{-3}$ mL/ μ mol), određena je koncentracija epoksidnih grupa (μ mol/g nosača). Standardna prava je konstruisana na osnovu utrošene zapremine rastvora HBr/CH₃COOH i unete količine epihlorhidrina. Izvedena je titracija rastvora koji su pored 20 mL benzena, 10 mL glacijalne CH₃COOH i indikatora sadržali i različitu količinu epihlorhidrina (200-1000 μ mol).

3.2.6.7. Protokol i optimizacija imobilizacije FT

3.2.6.7.1. Protokol i optimizacija imobilizacije FT na nanočestice silike

FT iz enzimskog preparata Pectinex® Ultra SP-L je imobilisana na nemodifikovane (FNS), amino-modifikovane (AFNS) i cijanuril-hloridom aktivirane amino-modifikovane nanočestice silike (CCAFNS) korišćenjem definisane količine nosača, pufera i enzima. Prilikom imobilizacije FT na FNS nanočestice, u ependorfima zapremine 2 mL, odmereno je 10 mg nosača, a zatim dodato 50 μ L enzima i 950 μ L odgovarajućeg pufera. Radi optimizacije procesa, variran je najpre uticaj pH (4,0-7,0), a nakon izbora optimalne vrednosti, ispitan je i uticaj koncentracije

enzima (10-250 mg proteina/g nosača) i vremena imobilizacije (1-5 h). Imobilizacija FT na AFNS i CCAFNS nanočestice radi optimizacije procesa je izvedena na identičan način, varirani su pH, vreme imobilizacije i koncentracija enzima (10-250 mg proteina/g nosača) variranjem količine nosača (2-50 mg) i održavanjem fiksne količine enzimskog preparata (50 μ L) i pufera (950 μ L). Pripremljene smeše za imobilizaciju su potom postavljene na roler šejker na 25 °C, a nakon definisanog vremena imobilizacije centrifugirane 10 min pri 13000 o/min. Supernatant je odvojen zbog određivanja proteina, a nosač sa imobilisanim enzimom upotrebljen u reakciji sinteze FOS radi određivanja aktivnosti prema proceduri opisanoj u poglavlju 3.2.1.

3.2.6.7.2. Protokol i optimizacija selektivne imobilizacije FT na polimetakrilatne porozne nosače

FT iz preparata Pectinex® Ultra SP-L je imobilisana na polimetakrilatne smole Purolite Lifetech™ ECR8409F, ECR8806M i ECR8285F. Za tu svrhu korišćeno je 50 mg suvog nosača, 4,9 mL fosfatnog pufera i 0,1 mL enzima (koncentracija enzimskog preparata u smeši za imobilizaciju odgovara vrednosti 20 mg proteina/g nosača). Fosfatni pufer molarne koncentracije 0,1 M (pH 7,0) je korišćen za Lifetech™ nosače ECR8806M i ECR8285F, dok je pufer većeg molariteta (1 M) upotrebljen za imobilizaciju enzima na Lifetech™ ECR8409F nosač. Smeša za imobilizaciju je postavljena na roler šejker, na 25 °C u trajanju od 1h u slučaju nosača ECR8409F i ECR8285F i 24 h u slučaju ECR8806M. Po završetku imobilizacije, supernatant je odvojen i iskorišćen za određivanje sadržaja proteina, dok je nosač ispiran tri puta korišćenim puferom i upotrebljen u reakciji sinteze FOS u cilju određivanja transfruktozilacione aktivnosti po proceduri opisanoj u poglavlju 3.2.1. Nakon selekcije nosača za dalji rad, izvedena je i detaljna optimizacija procesa imobilizacije FT ispitivanjem uticaja pH (0,1 M i 1 M acetatni (pH 4,0-5,0) i fosfatni pufer (pH 6,0-7,0)), koncentracije enzima (10- 200 mg/g nosača) i vremena imobilizacije (1-5 h za ECR8409F i 1-24 h za ECR8285F). Prilikom variranja pojedinačnih parametara, ostali su održani konstantnim. Nakon izbora najpogodnijeg nosača, ispitana je i pektinoliticka aktivnost radi utvrđivanja selektivnosti. Selektivnost je određena kao odnos prinosa transfruktozilacione i pektinoliticke aktivnosti.

3.2.6.7.3. Protokol i optimizacija selektivne imobilizacije FT na nemodifikovani makroporozni nosač

FT i pektinaze iz preparata Pectinex® Ultra SP-L imobilisane su na nosač Purolite® A109 upotrebom 50 mg prethodno pripremljenog nosača, 4,75 mL puferskog rastvora i 0,25 mL enzima (50 mg proteina/g nosača). Smeša za imobilizaciju je postavljena na roler šejker, na 25 °C uz blago mešanje. Optimizacija procesa imobilizacije je izvedena variranjem pH (4,0-7,0), koncentracije enzima (20-200 mg/g nosača) i vremena imobilizacije (1-7 h). Za postizanje pH 4,0 i 5,0 korišćen je 0,1M acetatni, dok je za pH 6,0 i 7,0 korišćen 0,1 M fosfatni pufer. Nakon imobilizacije, odvojen je supernatant i ispitan sadržaj proteina, dok je imobilisani preparat iskorišćen za ispitivanje transfruktozilacione i pektinoliticke aktivnosti prema proceduri opisanoj u poglavlju 3.2.1 i 3.2.2., redom.

3.2.6.7.4. Protokol i optimizacija selektivne imobilizacije FT na epoksi-modifikovani makroporozni nosač

FT iz preparata Pectinex® Ultra SP-L je imobilisana na epoksi-modifikovanu polistirensku smolu Purolite® A109 dvostepenim postupkom koji uključuje najpre adsorpciju enzima, a potom uspostavljanje kovalentnih veza promenom uslova imobilizacije. Adsorpcija FT je izvedena upotrebom 50 mg modifikovanog nosača, 50 mM puferskog rastvora čiji je pH u opsegu 4,0-7,0 i enzimskog preparata koncentracije 10 mg/g nosača u ukupnoj zapremini od 1 mL uz blago mešanje na roler šejkeru u trajanju od 3 h. Nakon toga, supernatant je odvojen, i izvršena izmena pufera upotrebom 50 mM fosfatnog pufera pH 9,0 u trajanju do 24 h, takođe

uz blago mešanje na roler šejkeru na 25 °C. Po završetku, supernatant je odvojen i analiziran na sadržaj proteina, a imobilisani preparat iskorišćen za određivanje transfruktozilacione i pektinazne aktivnosti. Nakon utvrđivanja optimalnog pH, ispitan je i uticaj koncentracije enzima (2-40 mg/g nosača).

3.2.6.7.5. Protokol i optimizacija selektivne imobilizacije FT na GA-modifikovani makroporozni nosač

FT iz preparata Pectinex® Ultra SP-L je imobilisana na GA-modifikovane nosače upotrebom 50 mg modifikovanog nosača. Optimizacija selektivne imobilizacije FT je izvedena variranjem puferskog rastvora koncentracije 0,1M čiji je pH u opsegu od 4,0-7,0, vremena imobilizacije (3, 5, 7 i 24 h) i koncentracije enzima (10-200 mg/g nosača). Nakon imobilizacije, odvojen je supernatant i ispitan sadržaj proteina, dok je imobilisani preparat iskorišćen za ispitivanje transfruktozilacione i pektinolitike aktivnosti (poglavljja 3.2.1 i 3.2.2.).

3.2.6.7.6. Protokol i optimizacija umrežavanja enzima upotrebom GA

Da bi se izvršilo umrežavanje enzima, prvo je izvedena adsorpcija FT na nosač Purolite® A109, a nakon toga uveden GA. Adsorpcija je izvedena pod prethodno utvrđenim optimalnim uslovima. Umrežavanje adsorbovanog enzima izvedeno je suspendovanjem 50 mg nosača u 1 mL 0,5 % rastvora GA koji je prethodno pripremljen korišćenjem 25 mM fosfatnog pufera (pH 7,0). Ovako pripremljena smeša ostavljena je na roler šejker 1 h na 25 °C. Suspenzija je potom filtrirana, dok je višak GA ispran 25 mM fosfatnim puferom. Nakon toga, čestice su ostavljene 20 h na 25 °C, a potom upotrebljene za određivanje transfruktozilacione aktivnosti (poglavljje 3.2.1). Ispitivanjem uticaja koncentracije GA i vremena trajanja na umrežavanje enzima izvedena je i optimizacija ovog procesa. S tim u vezi, pored 0,5 % (v/v) GA i 1 h, ispitane su koncentracije GA od 1 i 2,5 % (v/v) kao i vreme umrežavanja od 3 i 5 h.

3.2.6.8. Parametri procesa imobilizacije enzima

Proces imobilizacije enzima za nosač bliže definišu sledeći parametri: *aktivnost imobilisanog preparata* (AKT, IU/g nosača), *prinos aktivnosti* (AIY (activity immobilization yield), %), *prinos imobilizacije* (IY (immobilization yield), %) i *specifična aktivnost enzima* (SA, IU/mg prot). Dobijaju se izračunavanjem preko sledećih jednačina:

$$AIY = \frac{AKT}{AKT_0} \times 100 \% \quad (13)$$

$$IY = \frac{C_{P0} - C_{PSN}}{C_{P0}} \times 100 \% \quad (14)$$

$$SA = \frac{AKT}{C_{P0} - C_{PSN}} \times 100 \% \quad (15)$$

gde je: C_{P0} – koncentracija unetih proteina (mg/mL), C_{PSN} – koncentracija proteina u supernatantu nakon imobilizacije (mg/mL), AKT – aktivnost (IU/g nosača), a AKT_0 – uneta aktivnost imobilisanog preparata (IU/g nosača).

3.2.7. Termička stabilnost

Termička stabilnost slobodnog i imobilisanog enzima je ispitana njihovim inkubiranjem na različitim temperaturama (55-70 °C) u trajanju od 3 h. Naime, inkubirano je 50 mg imobilisanog enzima i ekvivalentna količina slobodnog enzima u cilju dobijanja iste aktivnosti. U definisanim vremenskim intervalima ispitana je aktivnost slobodnog i imobilisanog enzima prema proceduri opisanoj u poglavljju 3.2.1 u cilju određivanja parametara koji detaljnije definišu proces inaktivacije (brzina inaktivacije, poluvreme inaktivacije enzima i energija

inaktivacije). Termička stabilnost je prikazana kao relativna aktivnost (%) u odnosu na početnu aktivnost koja je proglašena kao 100 %.

Brzina inaktivacije (k_d , 1/h) se dobija logaritmovanjem eksponencijalnog modela deaktivacije i konstruisanjem grafika zavisnosti odnosa aktivnosti i vremena inkubacije (jednačina 16) [249].

$$\ln \frac{(A_t)}{(A_0)} = -k_d \times t \quad (16)$$

gde su A_t i A_0 ispoljena aktivnost nakon definisanog vremena i početna aktivnost, redom (IU/g nosača za imobilisani i IU/mL za slobodni enzim)

Poluvreme inaktivacije enzima na određenoj temperaturi inkubacije ($t_{1/2}$, h) je izračunato preko sledeće jednačine:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d} \quad (17)$$

Energija inaktivacije (E_d , kJ/mol) je određena preko logaritmovanog oblika Arenijusove jednačine na osnovu linearne regresije $\ln k_d$ i T^{-1} [250].

$$\ln k_d = \ln A - \frac{E_d}{RT} \quad (18)$$

gde je A – specifična konstanta deaktivacije, R – univerzalna gasna konstanta (8,314 J/mol K) i T – absolutna temperatura (K)

3.2.8. Operativna stabilnost

Operativna stabilnost pripremljenog imobilisanog enzimskog preparata je ispitana izvođenjem reakcije sinteze FOS u šaržnom i pneumatskom reaktorskom sistemu pri prethodno utvrđenom vremenu trajanja reakcije nakon čega je imobilisani enzim odvojen iz smeše centrifugiranjem, temeljno ispran destilovanom vodom i ponovo upotrebljen u reakciji sinteze u narednom ciklusu. U periodu trajanja ciklusa (karakteristično za svaki imobilisani enzimski preparat) u određenim vremenskim intervalima uzimani su uzorci i na identičan način kao u poglavlju 3.2.5. tretirani i pripremani za HPLC analizu. Operativna stabilnost je kao i termička, izražena kao relativna vrednost.

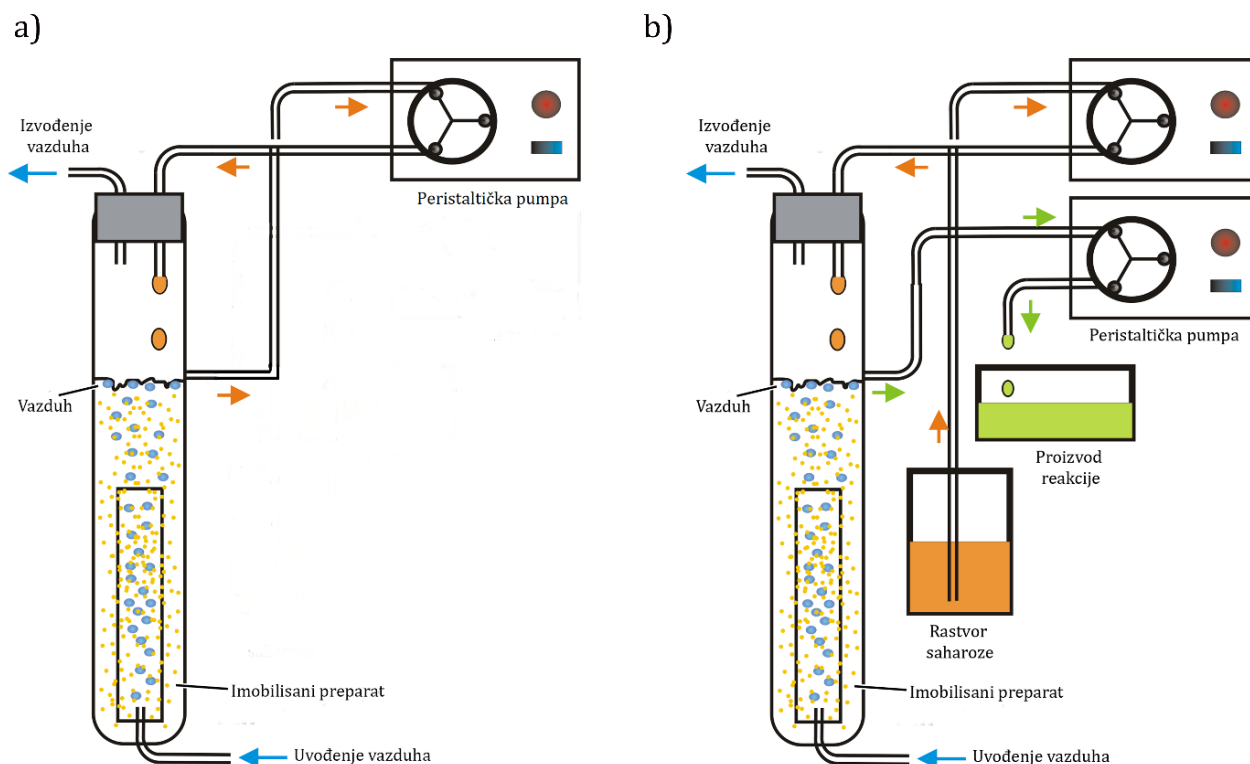
3.2.9. Enzimaska sinteza FOS upotrebom imobilisanog enzima u šaržnom reaktorskom sistemu

Za praćenje toka reakcije transfruktozilacije i procene efikasnosti imobilisanih preparata u šaržnom režimu rada korišćen je rastvor saharoze koncentracije 500 g/L zapremine 20 mL kao i različite koncentracije imobilisanog preparata (0,5, 5 i 10 % (w/v)) u slučaju primene nemodifikovanog i 1 i 10 % (w/v) epoksi-modifikovanog nosača Purolite® A109) pod prethodno utvrđenim optimalnim uslovima. Reakcije su izvedene u šlifovanim erlenamjerima na orbitalnoj tresilici na 50 °C pri brzini mešanja od 120 o/min u trajanju od 24 h. Uzorci su u definisanim vremenskim intervalima uzimani i tretirani prema proceduri opisanoj u poglavlju 3.2.5.

3.2.10. Enzimaska sinteza FOS upotrebom imobilisanog enzima u pneumatskom (air-lift) reaktorskom sistemu

Izvođenje sinteze FOS u pneumatskom reaktorskom sistemu sa unutrašnjom recirkulacijom je izvedeno upotrebom aparature šematski prikazane na slici 3.5. Korišćen je pneumatsko reaktor sledećih osnovnih dimenzija: visina 40 cm, visina unutrašnje cevi 20 cm, prečnik spoljašnje cevi 30 mm i prečnik unutrašnje cevi 19 mm. Eksperimenti su izvedeni uvođenjem rastvora

saharaze koncentracije 500 g/L (150 mL), podešavanjem protoka vazduha obezbeđujući adekvatno mešanje (50 mL/s) i dodavanjem imobilisanog enzimskog preparata. Takođe, i u ovom sistemu je ispitan uticaj koncentracije upotrebljenog imobilisanog preparata (0,5, 5 i 10 % (w/v) u slučaju primene nemodifikovanog i 1 i 10 % (w/v) u slučaju epoksi-modifikovanog nosača Purolite® A109) dobijenog pod prethodno utvrđenim optimalnim uslovima. Reakcije sinteze su praćene 24 h pri čemu su uzimani uzorci i tretirani na identičan način kao u poglavlju 3.2.5. U ovom reaktorskom sistemu ispitana je i mogućnost odvijanja kontinualnog procesa uvođenjem supstrata tj. vodenog rastvora saharoze i izvođenjem proizvoda u momentu dostizanja maksimalnog prinosa FOS. Za realizaciju kontinualnog procesa korišćena je koncentracija imobilisanog preparata od 10 % (w/v).



Slika 3.5. Šematski prikaz konfiguracije pneumatskog reaktora u: a) šaržnom i b) kontinualnom režimu rada

3.2.11. FTIR analiza

Za dobijanje FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) spektra odmereno je 2 g uzorka tj. nemodifikovanog, modifikovanog i modifikovanog nosača sa enzimom koji je preveden u formu praha, pomešan sa KBr i presovan hidrauličkom presom. FTIR spektri su snimljeni na 25 °C u opsegu od 400-4000 cm^{-1} i rezoluciji 4 cm^{-1} korišćenjem spektrofotometra.

3.2.12. Prečišćavanje dobijene smeše FOS

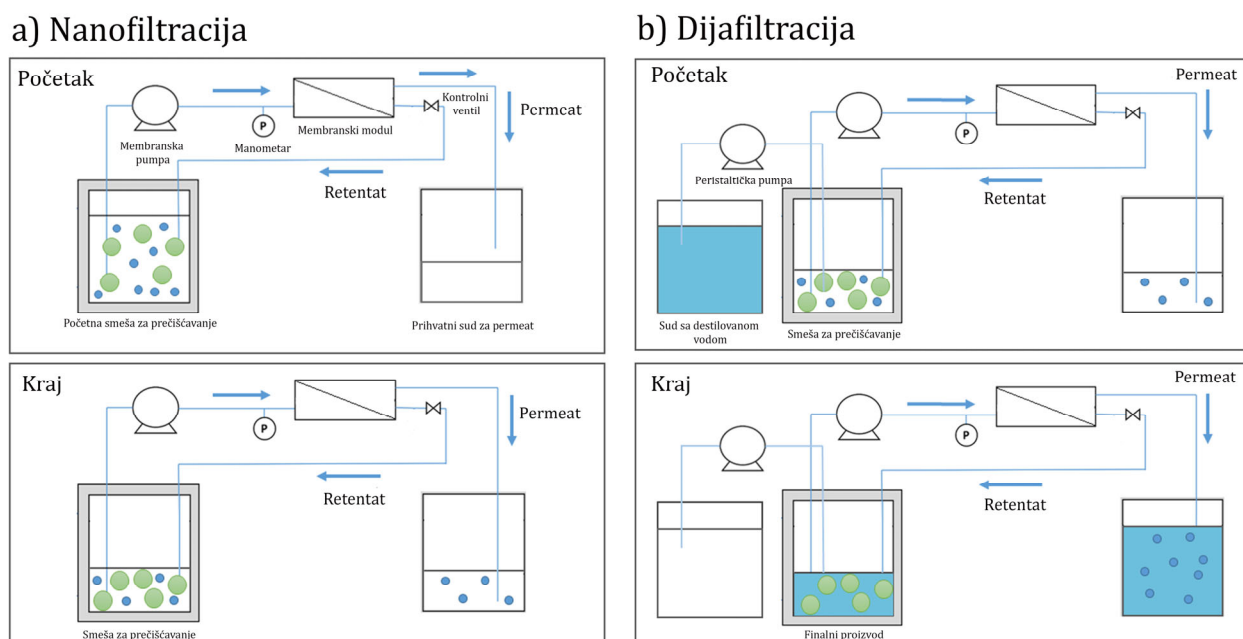
3.2.12.1. Priprema smeše FOS za prečišćavanje

Smeša FOS korišćena za dalje prečišćavanje dobijena je prema proceduri opisanoj u poglavlju 3.2.4. izvođenjem reakcije transfruktozilacije pod prethodno utvrđenim optimalnim uslovima. Naime, za potrebe prečišćavanja pripremljena je veća količina smeše, te je stoga u erlenmajer zapremine 1 L dodato 500 mL vodenog rastvora saharoze koncentracije 500 g/L i 1 % (v/v) enzimske smeše Pectinex® Ultra SP-L radi pokretanja reakcije. Nakon 24 h, celokupna

zapremina je inkubirana 10 min na 100 °C u ključalom vodenom kupatilu zbog deaktivacije enzima.

3.2.12.2. Aparatura za izvođenje procesa prečišćavanja

Proces prečišćavanja FOS od neželjenih di- i monosaharida uključuje procese nanofiltracije i dijafiltracije. Stoga, za izvođenje ovih eksperimenata korišćena je sledeća oprema: sud sa napojnom smešom, magnetna mešalica, membranska pumpa, metalno kućište sa kontrolnim ventilom za podešavanje protoka i manometrom za merenje pritiska u kojem je smešten membranski modul, prihvatni sud za permeat, sud sa destilovanom vodom, peristaltička pumpa i vodeno kupatilo. Šematski prikaz aparature i faza prečišćavanja dat je na slici 3.6.



Slika 3.6. Šematski prikaz aparature za izvođenje procesa nano- i dijafiltracije

3.2.12.3. Protokol i optimizacija procesa prečišćavanja

Za izvođenje serije eksperimenata koji uključuju proces prečišćavanja smeše FOS korišćeni su membranski moduli sa aktivnim slojem poliamida i različitim raspodelom pora (NFW (300-500 Da), NDX (500-700 Da) i NFG (600-800 Da)). Prema deklaraciji proizvođača, dužina pomenutih membrana je 30,50 cm, spoljašnji prečnik 4,60 cm, a unutrašnji 1,59 cm. Detaljnije karakteristike membrana dobijene od proizvođača su prikazane u tabeli 3.1.

Tabela 3.1. Karakteristike nanofiltracionih tankoslojnih kompozitnih membrana deklariranih od strane proizvođača

Model	Polimer	MWCO	Odbijanje laktoze	Odbijanje MgSO ₄	Odbijanje NaCl
NFW	Poliamid	300-500 Da	98,5 %	97 %	20 %
NDX	Poliamid	500-700 Da	90 %	95 %	40 %
NFG	Poliamid	600-800 Da	60 %	50 %	10 %

Pre početka procesa prečišćavanja, u sistem je najpre uvedena destilovana voda radi temeljnog ispiranja membrane. Napojna smeša zapremine 1,50 L koja je pripremljena razblaživanjem prethodno sintetisane smeše FOS destilovanom vodom do željene koncentracije ukupnih ugljenih hidrata, postavljena je na magnetnu mešalicu radi zagrevanja do postizanja određene

temperature. Pokretanjem membranske pumpe, uvedena je u sistem i termostatirana na temperaturi procesa, recirkulacijom. Otvaranjem kontrolnog ventila i izvođenjem permeata iz sistema definisanim protokom, započet je proces nanofiltracije. Na svakih 150 mL prikupljenog permeata, uzimani su uzorci iz oba izlaza (retentat i permeat) i dalje analizirani na HPLC-u. Izvođenjem definisane količine permeata, dolazi do koncentrovanja inicijalne napojne smeše. U momentu koncentrisanja napojne smeše deset puta tj. pri ostatku 150 mL inicijalne napojne smeše, započet je proces dijafiltracije uvođenjem destilovane vode protokom koji je identičan protoku izvođenja permeata. Na ovaj način uspostavljeno je održavanje konstante zapremine sistema, a uzorci su uzimani na identičan način radi praćenja toka procesa. Optimizacija procesa prečišćavanja u cilju dobijanja proizvoda što veće čistoće ali i prinosa, izvedena je ispitivanjem uticaja veličine pora primenjenih membrana (300-500 Da, 500-700 Da i 600-800 Da), ali i variranjem procesnih parametara poput temperature (20-45 °C), koncentracije ukupnih ugljenih hidrata u napojnoj smeši (1-5 % (v/v)) i protoka sistema (10-45 mL/min). Variranjem pojedinačnih parametara, ostali su zadržani konstantnim u cilju utvrđivanja najboljih uslova za izvođenje procesa prečišćavanja. Po završetku svakog eksperimenta, sistem je ispiran najpre destilovanom vodom, a potom i rastvorom za čuvanje membrane tj. 1 % rastvorom natrijum-bisulfita radi sprečavanja pojave kontaminacije. Prečišćena smeša dobijena izvođenjem procesa pod utvrđenim optimalnim uslovima je podvrgnuta liofilizaciji i u formi praha upotrebljena za ispitivanje prebiotskog potencijala na modelu koji simulira procese u donjem delu GIT-a (debelom crevu) tj. TIM-2 modelu.

3.2.12.4. Parametri procesa prečišćavanja

Parametri koji definišu proces prečišćavanja upotrebom membranskih modula su: *koeficijent odbijanja* (R (rejection coefficient)), *čistoća* (P_u (purity), %), *prinos prečišćavanja* (Y (purification yield), %) i *faktor prečišćenosti* (FP).

Kao što je pomenuto u poglavlju 2.8.1.4. koeficijent odbijanja se može odrediti iz retentata i permeata. Koeficijent odbijanja se iz retentata može izračunati na osnovu nagiba dobijenog primenom jednačine 8, dok se iz permeata može izračunati primenom jednačine 9.

S obzirom na to da je osnovni cilj izdvojiti iz inicijalne smeše FOS od nečistoća koje su u obliku manjih molekula poput glukoze, fruktoze i saharoze, za definisanje efikasnosti odvijanja procesa prečišćavanja su od velike važnosti parametri poput čistoće (P_u) i prinosa prečišćavanja (Y) koji se mogu preračunati preko sledećih jednačina [230, 251]:

$$P_u = \frac{m_{uk\ FOS}}{m_{uk\ uglj.hidr.}} \times 100\ \% \quad (21)$$

$$Y = \frac{C_{uk\ FOS, kraj} \times V_{F,kraj}}{C_{uk\ FOS, početak} \times V_{F, početak}} = \frac{m_{uk\ FOS, kraj}}{m_{uk\ FOS, početak}} \times 100\ \% \quad (22)$$

gde $m_{uk\ FOS}$ predstavlja zbir masa FOS 3, FOS 4 i FOS 5 u retentatu, u definisanom momentu, $m_{uk\ uglj. hidr.}$ predstavlja zbir masa saharoze, glukoze, fruktoze i ukupnih FOS u definisanom momentu, $C_{uk\ FOS, početak}$, $C_{uk\ FOS, kraj}$ predstavlja zbir koncentracija FOS 3, FOS 4 i FOS 5 u retentatu na početku i na kraju procesa prečišćavanja, redom, dok $V_{F, početak}$ i $V_{F, kraj}$ predstavljaju zapreminu smeše za prečišćavanje na početku i na kraju procesa.

Pored čistoće (odnosi se na FOS), udeo komponente n može biti određen preko sledeće jednačine:

$$\text{Udeo komponente} = \frac{m_n}{m_{uk\ uglj.hidr.}} \times 100\ \% \quad (23)$$

Faktor prečišćenosti (FP) predstavlja parametar kojim se definiše koliko je puta povećana čistoća komponente n u smeši u odnosu na početnu količinu te komponente. Ovo izračunavanje

se može izvršiti na nekoliko načina, a u ovom slučaju je to odnos čistoće FOS u ukupnim ugljenim hidratima nakon i pre prečišćavanja [251]:

$$FP = \frac{P_{uFOS} (\%)}{P_{uFOS,po\check{c}etak} (\%)} \quad (24)$$

3.2.13. Enzimaska sinteza FOS i prečišćavanje u membranskom reaktoru

S obzirom na to da membranski reaktor podrazumeva sistem u kojem se simultano može odvijati i sinteza i prečišćavanje smeše FOS, za izvođenje ovih eksperimenata korišćen je rastvor saharoze koncentracije 50 g/L. Naime, rastvor supstrata u zapremini od 500 mL je najpre termostatiran na 40 °C, recirkulacijom kroz sistem, a nakon umešavanja dodata je i definisana količina enzimskog preparata u tečnoj formi kako bi koncentracija u sistemu iznosila 1 % (v/v). Od momenta dodavanja enzima i recirkulacijom retentata favorizovano je izvođenje reakcije sinteze FOS, a okretanjem ventila i izvodjenjem permeata protokom 22 mL/min u definisanom vremenskom intervalu od početka reakcije pokrenut je i proces prečišćavanja dobijene smeše. Izvođenjem dijafiltracije, tj. uvođenjem destilovane vode iz drugog prihvatnog suda upotrebom peristaltičke pumpe identičnim protokom omogućeno je održavanje konstantne zapremine početne smeše. Na svakih 150 mL permeata uzimani su uzorci, tretirani 5 min na 100 °C u termošejkeru radi deaktivacije enzima, filtrirani i analizirani na HPLC sistemu.

Zbog prirode procesa koji se odvijaju u membranskom reaktoru, optimizacija procesa je izvedena variranjem vremena trajanja reakcije tj. vremena početka prečišćavanja (30 min i 2 h), dok su ostali parametri ostali nepromenjeni. U cilju utvrđivanja efikasnosti odvijanja procesa u ovakvom sistemu, dobijeni podaci su upoređeni sa vrednostima dobijenih u šaržnom reaktorskom sistemu.

3.2.14. Ispitivanje rasta mikroorganizma i određivanje standardne prave

Za ispitivanje rasta mikroorganizama korišćene su odgovarajuće hranljive podloge koje su pripremane prema uputstvu proizvođača. Naime, za *Lactiplantibacillus plantarum* 299v (u daljem tekstu *L. plantarum*) i *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG (u daljem tekstu *L. rhamnosus*) korišćen je MRS bujon, za *Saccharomyces boulardii* CBS 5926 (u daljem tekstu *S. boulardii*) YPD podloga pripremljena iz komponenti (tabela 3.2), a za *Escherichia coli* ATCC 25922 (u daljem tekstu *E. coli*) hranljivi bujon (HB).

Tabela 3.2. Komponente koje ulaze u sastav podloge za gajenje mikroorganizma

MRS	YPD
10 g/L tripton	10 g/L kvašćev ekstrakt
10 g/L mesni ekstrakt	10 g/L 1-pepton
20 g/L glukoza	20 g/L glukoza
5 g/L kvašćev ekstrakt	
2 g/L K ₂ HPO ₄	
5 g/L Na-acetat	
2 g/L (NH ₄) ₃ -citrat	
0,05 g/L MnSO ₄ x H ₂ O	
0,2 g/L MgSO ₄ x 7H ₂ O	
1 g/L Tween-80	

Eksperimenti su izvedeni inokuliranjem hranljive podloge prekonocnom kulturom (inokulum) koja je pripremljena zasejavanjem sa 4 % čiste kulture mikroorganizma u odgovarajući bujon. Erlenmajeri su potom postavljeni u orbitalnoj mešalici, na određenoj temperaturi (37 °C za *L. plantarum*, *L. rhamnosus* i *E. coli* i 30 °C za *S. boulardii*). U definisanim vremenskim intervalima (0-24 h) uzorkovan je 0,1 mL i pomešan sa 9,9 mL fiziološkog rastvora (0,85 % NaCl) u cilju pripreme odgovarajućeg razblaženja (10^2). Nakon pripreme serije razblaženja, iz svake epruvete je određena količina uzorka (10 μ L) prenet na čvrstu hranljivu podlogu radi određivanja broja mikroorganizma. Ploče su potom termostatirane na temperaturi rasta 24 h, a pomoću brojača kolonija utvđen je i prisutan broj (CFU/mL). Za pripremu čvrste hranljive podloge korišćen je odgovarajući bujon u kombinaciji sa agrom (koncentracija 2 % (w/v)).

Za konstruisanje standardne prave napravljeno je nekoliko različitih razblaženja prekonocne kulture, a zatim određeno zamućenje (OD) spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 600 nm ali i broj kolonija pripremom serije razblaženja uzorka i prenošenjem na ploče. Dobijanjem korelacije OD-CFU/mL dobijen je i nagib neophodan za preračunavanje broja kolonija prekonocne kulture radi podešavanja početnog broja pri izvođenju eksperimenata. Prema tome, dobijeni nagib za *L. plantarum* je $3,0 \times 10^{-9}$ mL/CFU, za *L. rhamnosus* $5,0 \times 10^{-9}$ mL/CFU, za *S. boulardii* $2,0 \times 10^{-7}$ mL/CFU i za *E. coli* $5,0 \times 10^{-10}$ mL/CFU.

3.2.15. Ispitivanje prebiotske aktivnosti proizvoda na pripadnike crevne mikrobiote

Prebiotska aktivnost prečišćene smeše FOS je ispitana korišćenjem probiotskih kultura *L. plantarum*, *L. rhamnosus* i *S. boulardii* i indikatorskog soja patogene vrste *E. coli*. U tu svrhu ispitan je uticaj različitih koncentracija smeše oligosaharida (1-5 % (w/v)) na rast pomenutih mikroorganizama. Eksperimenti su izvedeni u erlenmajerima zapremine 50 mL, u hranljivoj podlozi (MRS za *L. plantarum* i *L. rhamnosus*, YPD za *S. boulardii* i HB za *E. coli*) zapremine 10 mL gde je prethodno dodata određena količina testirane smeše u formi praha. Hranljiva podloga za probiotske kulture je pripremljena iz komponenti kako ne bi sadržala izvor ugljenih hidrata (glukoza), dok je komercijalna podloga (HB) koja je osiromašena komponentama na bazi ugljenika, korišćena za ispitivanje rasta *E. coli*. Hranljive podloge pripremljene na ovaj način su potom sterilisane u autoklavu na 121 °C. Eksperimenti su izvedeni dodavanjem određene količine prekonocne kulture u odgovarajuću sveže sterilisanu hranljivu podlogu kako bi početni broj iznosio 1×10^7 CFU/mL za *L. plantarum*, *L. rhamnosus* i *E. coli* i 1×10^5 CFU/mL za *S. boulardii*. Erlenmajeri su potom postavljeni u orbitalnu tresilicu na određenoj temperaturi (37 °C za *L. plantarum*, *L. rhamnosus* i *E. coli* i 30 °C za *S. boulardii*) radi praćenja kinetike. U definisanim vremenskim intervalima (0-24 h) uzeti su uzorci iz svakog erlenmajera (1 mL), a potom je pripremljena serija razblaženja radi određivanja broja. Kao negativna kontrola korišćena je glukoza, pa je u skladu sa tim na identičan način ispitan uticaj različitih koncentracija glukoze (1-5 % (w/v)) na rast pomenutih mikroorganizama umesto korišćene smeše oligosaharida. Prebiotski potencijal je izražen kao prebiotska aktivnost (PAS, prebiotic activity score) i izračunat preko sledeće jednačine u kojoj je broj kolonija izražen kao logaritamska vrednost CFU/mL [252]:

$$PAS = \left(\frac{X_1}{Y_1}\right) - \left(\frac{X_2}{Y_2}\right) \quad (25)$$

X_1 predstavlja razliku broja kolonija probiotske kulture u prisustvu testirane smeše određene koncentracije nakon 24 h i broja kolonija probiotske kulture u prisustvu testirane smeše određene koncentracije nakon 0 h

Y1 predstavlja razliku broja kolonija probiotske kulture u prisustvu glukoze određene koncentracije nakon 24 h i broja kolonija probiotske kulture u prisustvu glukoze određene koncentracije nakon 0 h

X2 predstavlja razliku broja kolonija *E. coli* u prisustvu testirane smeše određene koncentracije nakon 24 h i broja kolonija *E. coli* u prisustvu testirane smeše određene koncentracije nakon 0 h

Y2 predstavlja razliku broja kolonija *E. coli* u prisustvu glukoze određene koncentracije nakon 24 h i broja kolonija *E. coli* u prisustvu glukoze određene koncentracije nakon 0 h

3.2.16. Ispitivanje uticaja prečišćene smeše FOS na pripadnike crevne mikrobiote upotrebom *in vitro* TIM-2 modela

3.2.16.1. Protokol pripreme rastvora za izvođenje eksperimenata na TIM-2 modelu

Izvođenje eksperimenata na *in vitro* modelu TIM-2 uključuje pripremu sledećih rastvora po sledećim protokolima:

Rastvor kalcijum-hlorida: za pripremu je odmereno 45 g CaCl_2 i dodata destilovana voda zapremine 1 L. Po umešavanju, pH je podešen na 5,8.

Rastvor magnezijum-sulfata: za pripremu je odmereno 50 g MgSO_4 i dodata destilovana voda zapremine 1 L. Po umešavanju, pH je podešen na 5,8.

Rastvora cisteina: za pripremu je odmereno 20 g cistein HCl i dodata destilovana voda zapremine 1 L. Po umešavanju, pH je podešen na 5,8.

Rastvor dijalizata (Dial): za pripremu je odmereno 100 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$, 180 g NaCl, 0,2 g $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g volovske žuči i dodata destilovana voda zapremine 4 L. Po umešavanju, pH je podešen na 5,8.

TBCO rastvor: za pripremu je odmereno 43,2 g polisorbata 80, 60 g bakteoptona, 60 g kazeina, 1,0 g volovske žuči i dodata destilovana voda zapremine 1 L. Po umešavanju, pH je podešen na 5,8. Odmeravanjem 6,25 puta većih količina, pripremljen je koncentrovani rastvor (6,25 x TBCO) koji ulazi u sastav pripreme rastvora SIEM.

SIEM-CHO rastvor (SIEM rastvor bez svarljivih ugljenih hidrata): za pripremu je odmereno 100 g TBCO, 2 g rastvora MgSO_4 , 2 g rastvora cisteina, 0,2 mL rastvora vitamina, 4 mL rastvora soli Zouten, 1 mL emulzije protiv stvaranja pene i 10 g destilovane vode. Po umešavanju, sastojci su dodatno umešani ručnim mikserom, a potom je podešen pH na 5,8.

SIEM rastvor: za pripremu je odmereno 100 g CHO (smeša pektina (12 g/L), ksilana (12 g/L), arabinogalaktana (12 g/L), amilopektina (12 g/L) i skroba (100 g/L)), 25 g 6,25 x TBCO, 2 g rastvora MgSO_4 , 2 g rastvora cisteina, 0,2 mL rastvora vitamina, 4 mL rastvora soli Zouten i 1 mL emulzije protiv stvaranja pene. Po umešavanju, sastojci su dodatno umešani ručnim mikserom, a potom je podešen pH na 5,8.

Dijalizat: za pripremu je odmereno 500 g prethodno pripremljenog rastvora dijalizata (Dial), 50 g rastvora MgSO_4 , 50 g rastvora CaCl_2 , 100 g rastvora cisteina, 5 g rastvora vitamina i 4295 g destilovane vode. Po umešavanju, pH je podešen na 5,8.

Rastvor ugljenih hidrata (CHO): za pripremu je odmereno 12 g pektina iz kore citrusa, 12 g ksilana, 12 g arabinogalaktana, 12 g amilopektina, 100 g skroba i dodata destilovana voda zapremine 1 L.

3.2.16.2. Priprema fekalnog inokuluma

Uzorci fecesa su prikupljeni od zdravih dobrovoljaca (ukupno 44 donora, starosti od 22 do 60 godina), koji nisu imali ograničenja u ishrani i nisu primali antibiotsku terapiju poslednja 3 meseca od momenta uzorkovanja. U kutiji sa anaerobnom trakom su direktno prikupljeni uzorci fecesa, pri čemu su ubzo i homogenizovani u anaerobnoj komori prema proceduri koju su naveli Marisol Agire (Marisol Aguirre) i sar. u publikovanom naučnom radu [253]. Pre inokulacije u TIM-2 modelu, epruvete sa homogenizovanim suspenzijama fecesa zapremine 35 mL su odmrznute u vodenom kupatilu na 37 °C u trajanju od 1 h.

3.2.16.3. Protokol izvođenja eksperimenata na TIM-2 modelu

TIM-2 model predstavlja kompijuterski kontrolisan *in vitro* model koji se sastoji od 4 jedinica od kojih svaka oponaša procese u ljudskom debelom crevu. Ovaj sistem omogućava podešavanje parametara što približnije realnim uslovima, pa prema tome simulira temperaturu tela od 37 °C, pH lumena (5,8), anaerobne uslove, peristaltičke pokrete, a sadrži i membrane za uklanjanje mikrobnim metabolita. Naime, za izvođenje eksperimenta najpre je uveden fekalni inokulum preko sterilnog plastičnog šprica, koji je pripremljen u anaerobnom kabinetu umešavanjem sveže odležane suspenzije fecesa i rastvora dijalizata u donosu 1:1. Svaka jedinica je inokulisana sa standardizovanom razblaženom suspenzijom fecesa (60 mL). Takođe, za potrebe ovog eksperimenta neophodno je napuniti sterilne plastične špricave simuliranim efluksnim medijumom (*eng. Simulated Ileal Efflux Medium*, SIEM) koji po sastavu oponaša komponente koje dospevaju u ljudsko debelo crevo preko tankog creva u zapremini od 45 mL. Eksperiment počinje hranjenjem mikrobiote preko šprica koji je napunjen hranom (SIEM) u trajanju od 16 h pri čemu se ova faza naziva „adaptacioni period“. Po utrošku hrane i završetku perioda adaptacije, sistem je zaustavljen na 2 h izazivajući izgladnjivanje mikroba, pa prema tome ova faza predstavlja „period gladovanja“. Nakon toga, izvršeno je uzorkovanje lumena i dijalizata, predstavljajući nulti vremenski period. Priključivanjem špricava koji su sadržali SIEM (za dobijanje kontrolnog uzorka u duplikatu) i špricava koji su bili ispunjeni smešom SIEM-CHO i uzorka (prečišćena smeša FOS) u koncentraciji 7,5 g/dan, u zapremini od 60 mL, započeto je dodavanje hrane, a ujedno i testirani period. Uzorci iz lumena i dijalizata su prikupljeni nakon 24, 48 i 72 h, pri čemu je po uzorkovanju vršena izmena špricava tj. hrane novom količinom (60 mL). Protok uvođenja hrane je digitalno podešen i iznosio je 2,5 mL/h. Prikupljeni uzorci su istog trenutka zaleđeni korišćenjem tečnog azota, a potom skladišteni na -80 °C.

3.2.16.4. Analiza uzoraka dobijenih sa TIM-2 modela

Uzorci iz dijalizata analizirani su na gasnoj hromatografiji (GC) radi utvrđivanja sadržaja SCFA (sirćetna, propionska i buterna kiselina), BCFA (*eng. Branched Chain Fatty Acid*) (izo-buterna i izo-valerijanska kiselina), amonijaka i laktata. Uzorci koji su dobijeni iz lumena korišćeni su za analizu sastava mikrobiote, ali i za analize na GC. Naime, analize na GC sistemu (8890 GC System, Agilent, Holandija) zahtevaju prethodnu pripremu uzoraka. Uzorci iz lumena najpre su centrifugirani 10 min na 14.000 o/min, a potom je 150 µL supernatanta pomešano sa 550 µL rastvora internog standarda za čiju su pripremu korišćeni mravlja kiselina, metanol, destilovana voda i 2-etil buterna kiselina. Uzorci dijalizata su pripremljeni umešavanjem 300 µL uzorka i 400 µL internog standarda. Koncentracija organskih kiselina je određena na osnovu prethodno konstruisane standardne prave upotrebom standardnih rastvora.

Za analizu sastava mikrobiote, najpre su iz uzoraka dobijenih iz lumena izolovani DNK molekuli korišćenjem QIAamp Fast DNA Stool kiti (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka), a potom je pomoću Qubit 3.0 fluorimetra (Invitrogen, Waltham, USA) izvršeno određivanje koncentracije izolovane DNK. Potom je izvedeno sekvenciranje primenom Illumina MiSeq sistema gde su dobijene sekvence u FASTQ formatu. Neobrađene sekvence u FASTQ formatu su zatim

analizirane u softverskom paketu Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2 (QIIME-2, v2023.9) [254]. Nakon procene kvaliteta i filtriranja, sekvence su klasifikovane u varijante ampliconskih sekvenci (ASVs - Amplicon Sequencing Variants) pomoću dada2 paketa u R softveru (R Statistical Computing Software) [255]. Taksonomska klasifikacija određena je korišćenjem SILVA baze podataka (Silva Comprehensive Ribosomal RNA Database, v138.2), dok je filogenetsko stablo konstruisano q2-phylogeny funkcijom u okviru QIIME2 [256, 257]. Singletoni su uklonjeni pre statističke analize, a relativna zastupljenost bakterija procenjena je na taksonomskim nivoima tipa, reda, familije i roda.

3.2.16.4.1. Statistička analiza uzoraka dobijenih sa TIM-2 modela

FOS smeša je ispitivana u duplikatu, dok je kontrolna SIEM smeša ispitivana u triplikatu. Statistička analiza izvršena je u R softveru (v 4.3.3) uz pakete phyloseq, qiime2R, microeco i MicrobiomeStat [258, 259]. Za ispitivanja strukture mikrobnog ekosistema određivani su različiti parametri za procenu α i β diverziteta. α -diverzitet analiziran je računanjem Šenonovog indeksa (Shannon diversity index), koji uzima u obzir raznovrsnost i ravnomernost distribucije mikrobnih zajednica.

Šenon indeks se izračunava primenom sledeće formule [260]:

$$H = - \sum_{i=1}^S p_i \ln(p_i) \quad (26)$$

gde je:

S - ukupan broj taksona

p_i - relativna učestalost svakog taksona

Razlike u β -diverzitetu između grupa procenjene su na osnovu ponderisanih UniFrac distanci (Weighted UniFrac distances), dok je PERMANOVA analiza (Permutational Multivariate Analysis of Variance, adonis2, 999 permutacija) korišćena za statističku evaluaciju razlika ($p < 0,05$) [261]. Vizualizacija distanci β -diverziteta izvršena je pomoću analize glavnih koordinata (Principal Coordinate Analysis, PCoA) i analize glavnih komponenti (Principal Component Analysis, PCA) sa centrovanim logaritamski transformisanim (Centered Log-Ratio, CLR) podacima.

Longitudinalne promene u sastavu mikrobiote analizirane su na različitim taksonomskim nivoima, a podaci normalizovani metodom ukupne sume (Total Sum Scaling, TSS). Za analizu diferencijalne zastupljenosti bakterija primenjen je LinDA metod (Linear Model for Differential Abundance Analysis) iz MicrobiomeStat paketa [262]. Razlike u relativnim zastupljenostima bakterijskih grupa između 24, 48 i 72 h eksperimenta procenjene su Association test funkcijom iz istog paketa. Statistička značajnost određena je primenom Benjamini-Hochberg korekcije (Benjamini-Hochberg False Discovery Rate, FDR) ($q < 0,05$). Longitudinalne varijacije diferencijalno zastupljenih rodova prikazane su grafičkim prikazima vulkanskog tipa.

3.2.16.4.2. Analiza kratkolančanih masnih kiselina

Proizvodnja organskih kiselina analizirana je u GraphPad Prism softveru (v10.2.3), a razlike među grupama testirane su ANOVA metodom (Analysis of Variance) sa Fisherovim LSD testom (Least Significant Difference, $p < 0,05$). Spearmanova korelacija (Spearman correlation analysis) između koncentracija organskih kiselina i bakterijskih rodova analizirana je nakon eliminacije rodova sa zastupljenošću $< 0,01$ % ($q < 0,05$, microeco paket).

3.2.17. Enzimaska sinteza FOS u javorovom sirupu

U realnom sistemu kakvim se smatra javorov sirup, izvedena je optimizacija sinteze FOS upotrebom FT iz Pectinex® Ultra SP-L. Kako su koncentracija supstrata i pH definisani samom prirodom proizvoda, ispitan je uticaj temperature (30-80 °C) i koncentracije enzimskog preparata (1-5 % (v/v)) na reakciju biokonverzije saharoze. Reakcija je prekidana zagrevanjem reakcione smeše sirupa 5 min u ključalom vodenom kupatilu na 100 °C. Nakon izbora optimalnih parametara, ispitana je i direktna upotreba različitih imobilisanih enzimskih preparata u cilju produkcije FOS. Tok sinteze je ispitan unosom identičnog broja jedinica koje odgovaraju izabranoj optimalnoj koncentraciji slobodnog enzima. Reakcija je prekidana uklanjanjem imobilisanog enzima i zagrevanjem reakcione smeše sirupa 5 min u ključalom vodenom kupatilu na 100 °C. Prema identičnoj proceduri opisanoj u poglavlju 3.2.8, ispitana je i operativna stabilnost upotrebljenih imobilisanih preparata u javorovom sirupu.

3.2.17.1. Određivanje fizičko-hemijskih karakteristika javorovog sirupa

Parametri poput transmisije (prolaznost svetlosti), pH, viskoziteta, gustine i suve materije su određeni za nemodifikovani i modifikovani javorov sirup na sledeći način. Naime, propusnost (%) je određena spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 560 nm, viskoznost (mPa s) upotrebom rotacionog viskozimetra na 23 °C i brzini mešanja 50 o/min, suva materija (°Brix) korišćenjem ručnog refraktometra na 25 °C, dok je za određivanje gustine (g/mL) upotrebljen piknometar. Takođe, ispitana je i stabilnost FOS čuvanjem modifikovanog sirupa na 4 °C u periodu od jedne godine. Stabilnost FOS je izražena kao relativna vrednost udela FOS u poređenju sa udelom FOS inicijalnog modifikovanog sirupa.

3.2.17.2. Senzorna analiza

Po dobijanju potpunih informacija o senzornom testu, učesnici su dobrovoljno dali pismenu saglasnost pre svog učešća. U realizaciji senzorne analize učestvovalo je 40 neobučenih učesnika koji su ocenjivali proizvode (nemodifikovan i modifikovan javorov sirup) prema sledećim parametrima: boja, aroma, slatkoća, gorčina, drvenast ukus, karamelizovan ukus, tekstura i ukupan utisak koristeći hedonističku skalu od 9 tačaka (nizak (1-3), srednji (4-6) i visok (7-9)).

3.2.17.3. Ispitivanje prebiotske aktivnosti modifikovanog javorovog sirupa na pripadnike crevne mikrobiote

Prebiotska aktivnost modifikovanog javorovog sirupa je ispitana prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.15. Naime, ispitan je uticaj različitih koncentracija sirupa (1-5 % (v/v)) na rast odabranih mikroorganizama. Međutim, kako je ispitivani uzorak u tečnoj formi, radi sprečavanja narušavanja incijalne koncentracije podloge dodavanjem različitih količina sirupa, pripremljene su koncentrovane hranljive podloge. Prebiotiska aktivnost je takođe izračunata preko jednačine 25.

3.2.17.4. Određivanje sadržaja polifenola

Sadržaj ukupnih polifenola je određen prema sledećoj proceduri: 50 µL uzorka je tretirano sa 250 µL Folinovog reagensa (Folin-Ciocalteu), a potom i sa 3 mL destilovane vode. Nakon jednog minuta, dodat je 1 mL 15 % rastvora Na₂CO₃ i određena količina destilovane vode do ukupne zapremine od 5 mL. Uzorci su zatim inkubirani 2 h u mraku, a nakon toga je upotrebom spektrofotometra izvršeno merenje apsorbance na talasnoj dužini od 750 nm. Na osnovu dobijene vrednosti apsorbance i nagiba prethodno konstruisane standardne prave (1,1 x 10⁻³ mg GAE/L), dobijen je ukupan sadržaj polifenola kao izražen mg GAE (ekvivalent galne kiseline)/L. Merenje je izvedeno u odnosu na kontrolu koja je dobijena prema identičnoj

proceduri, upotrebom destilovane vode umesto uzorka. Za izradu standardne prave korišćena je galna kiselina, tj. pripremljeni su rastvori različitih koncentracija (1-1500 mg/L) koji su tretirani prema identičnoj proceduri.

Za definisanje prisutnih polifenolnih jedinjenja u uzorcima, korišćen je HPLC uređaj i reverzno-fazna Eclipse Plus C-18 kolona (4,6 mm ×150 mm, 5 μm) na temperaturi od 25 °C. Razdvajanje komponenti je omogućeno primenom linearnog gradijenta sa sledećim sistemom rastvarača: voda sa 0,05 % mravlje kiseline (rastvarač A) i metanol sa 0,05 % mravlje kiseline (rastvarač B). Najpre je započeto gradijentno eluiranje sa 5-95 % rastvora B do 42 min, a potom od 42,1 do 48 min izokratsko eluiranje 5 % rastvorom B pri brzini protoka 1 mL/min. Ova metoda je korišćena za analizu uzoraka javorovog sirupa koji su 10 puta razblaženi. Detekcija proizvoda u uzorcima je izvedena pri talasnoj dužini od 280 i 350 nm [263].

3.2.17.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti

Za određivanje antioksidativne aktivnosti korišćena je FRAP metoda [264] koja se zasniva na redukciji Fe(III)-tripiridil-triazin kompleksa [Fe³⁺-TPTZ] do Fe(II)-tripiridil triazina [Fe²⁺-TPTZ] u kiselj sredini. Za ovu analizu neophodan je FRAP reagens koji se priprema na sledeći način: 300 mM acetatni pufer se pomeša sa 10 mM TPTZ (priprema se rastvaranjem u 40 mM HCl) i 20 mM FeCl₃ u odnosu 10:1:1. Nakon pripreme, 50 μl uzorka se pomeša sa 1,5 mL reagensa, vorteksira i inkubira u mraku 5 min. Po završetku inkubacije, spektrofotometrijski se određuje apsorbancija na talasnoj dužini od 593 nm, a dobijena antioksidativna aktivnost se izračunava korišćenjem nagiba standardne prave ($6,878 \times 10^{-1}$ mmol Fe²⁺/L). Merenje je izvedeno u odnosu na kontrolu koja je dobijena prema identičnoj proceduri, upotrebom FRAP reagensa. Standardna prava je dobijena upotrebom različitih koncentracija rastvora FeSO₄ (0,2- 1,0 mmol/L) koji su tretirani na isti način.

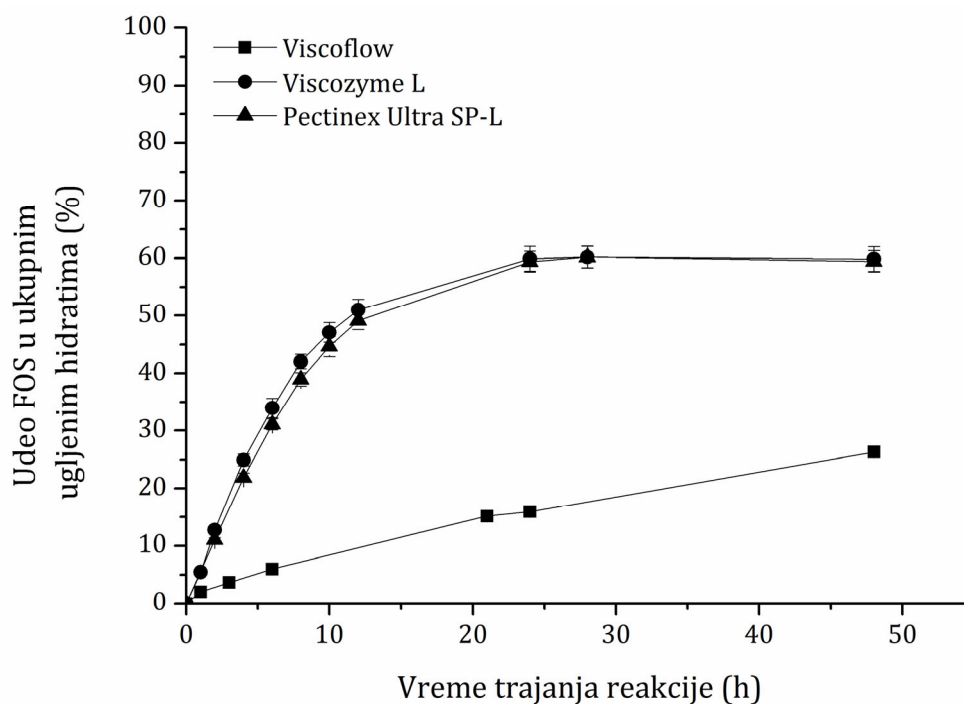
4. REZULTATI I DISKUSIJA

Cilj istraživanja ove doktorske disertacije je bio usmeren na ostvarivanje doprinosa u razvoju postupaka sinteze FOS upotrebom slobodnog i imobilisanog enzima korišćenjem različitih funkcionalnih nosača, zatim na realizaciji postupaka prečišćavanja proizvoda korišćenjem membranskih separacionih tehnika, ali i na primeni procesa sinteze FOS u potencijalnim kompleksnim proizvodima na bazi saharoze u cilju razvoja funkcionalnog proizvoda.

Prvi deo istraživanja je orijentisan ka selekciji najpogodnijeg komercijalnog enzimskog preparata za sintezu FOS i detaljnoj optimizaciji ključnih procesnih parametara reakcije transfruktozilacije sa aspekta prinosa i produktivnosti FOS u cilju razvijanja efikasnog i ekonomski opravdanog procesa koji rezultira dobijanjem smeše željenog sastava. U narednoj fazi, istraživanja su fokusirana na dobijanje stabilnog i visokoaktivnog imobilisanog enzimskog preparata različitim tehnikama imobilizacije kao i na razvoju kontinualnih postupaka proizvodnje u reaktorskim konfiguracijama radi intenzifikacije procesa sinteze FOS. Kako se kao izvor enzima FT primenjuje komercijalni enzimski preparat Pectinex® Ultra SP-L koji predstavlja mešavinu različitih enzima među kojima dominiraju pektinaze, istraživanja su usmerena i na obezbeđivanju dodatne funkcije imobilisanog preparata tj. selektivnosti. Ovim pristupom omogućeno je vezivanje ciljanog enzima, a ujedno i delimično prečišćavanje FT od pektinaza, celulaza i drugih hidrolitičkih enzima prisutnih u komercijalnoj smeši radi dalje implementacije u brojnim supstratima prehrambene industrije na bazi saharoze sa ciljem unapređenja nutritivnih i funkcionalnih karakteristika proizvoda. Poslednji deo istraživanja je fokusiran na optimizaciju i razvoj održivih i efikasnih postupaka prečišćavanja dobijene smeše FOS tehnikama nano- i dijafiltracije, ali i na utvrđivanju prebiotskog efekta prečišćene smeše ne samo mikrobiološkim testovima koji uključuju primenu pojedinačnih predstavnika crevne mikrobiote, već i upotrebom *in vitro* dinamičkog modela TIM-2 koji simulira procese koji se odvijaju u debelom crevu. Pored toga, istraživanja su takođe usmerena i ka primeni membranskog reaktorskog sistema koji ima za cilj obezbeđivanje dvostruke funkcije tj. simultano izvođenje enzimske sinteze i prečišćavanje FOS, uz smanjenje vremena trajanja procesa. Za kraj istraživanja, stečena znanja o razvijenim postupcima enzimske konverzije saharoze u FOS primenjena su i na druge sisteme, poput javorovog sirupa, u cilju dobijanja funkcionalnog proizvoda obogaćenog prebioticima.

4.1. Selekcija komercijalnog enzimskog preparata

Radi izvođenja enzimski katalizovane reakcije transfruktozilacije u cilju produkcije FOS ispitani su pojedini industrijski enzimski preparati. Naime, smeše pektinolitičkih i celulitičkih enzima sa transfruktozilacionom aktivnošću poput Pectinex® Ultra SP-L, Viscozyme® L i Viscoflow® su primenjene za sintezu prebiotika. Postignuti rezultati su uporedno prikazani na slici 4.1 sa koje se može sagledati da sva tri primenjena preparata poseduju potencijal za sintezu FOS. Imajući u vidu ostvarene maksimalne udele FOS u ukupnim ugljenim hidratima u slučaju primene enzimskih preparata Pectinex® Ultra SP-L i Viscozyme® L (oko 60 % nakon 24 h), evidentno je da ovi preparati pokazuju uporedivu i znatno bolju aktivnost u odnosu na enzimski preparat Viscoflow® kod kojeg su dobijeni udeli bili značajno manji (ispod 30,0 % nakon 48 h). Pored toga što su se dva primenjena preparata pokazala kao odlični producenti FOS, prilikom izbora enzima važno je sagledati i cenu koja najčešće predstavlja bitnu stavku u ukupnim troškovima procesa. Maloprodajne cene preparata Pectinex® Ultra SP-L i Viscozyme® L su slične i iznose oko 30 €/L. Uzimajući u obzir njihovu podjednaku efikasnost kao i podatak da su okvirne cene preparata skoro identične, enzimski preparat Pectinex® Ultra SP-L, u kojem dominiraju pektinolitički enzimi u poređenju sa Viscozyme® L u kojem pored pektinaza, ksilanaza i hemicelulaza preovladavaju β -glukanaze [265], je izabran za dalji rad.



Slika 4.1. Uporedni prikaz poređenja udela FOS u reakcionim smešama korišćenjem različitih enzimskih preparata

Vodeći razlog priloženog izbora smeše, pored toga što se razvijanjem postupaka sinteze može dobiti proizvod bogat prebioticima, jeste i njena potencijalna primena kao izvora FT u prehrambenim proizvodima različitog sastava sa što manjim narušavanjem njihovih inicijalnih svojstava. Naime, prostor za obezbeđivanje dodatne funkcije pomenutog industrijskog preparata, pruža izvođenje selektivne imobilizacije FT, što takođe predstavlja jedan od ciljeva ove doktorske disertacije. Ovakvim pristupom bi bilo omogućeno delimično prečišćavanje preparata od dominantnih hidrolitičkih enzima - pektinaza, a posledično i obezbeđena dodatna primena komercijalne smeše.

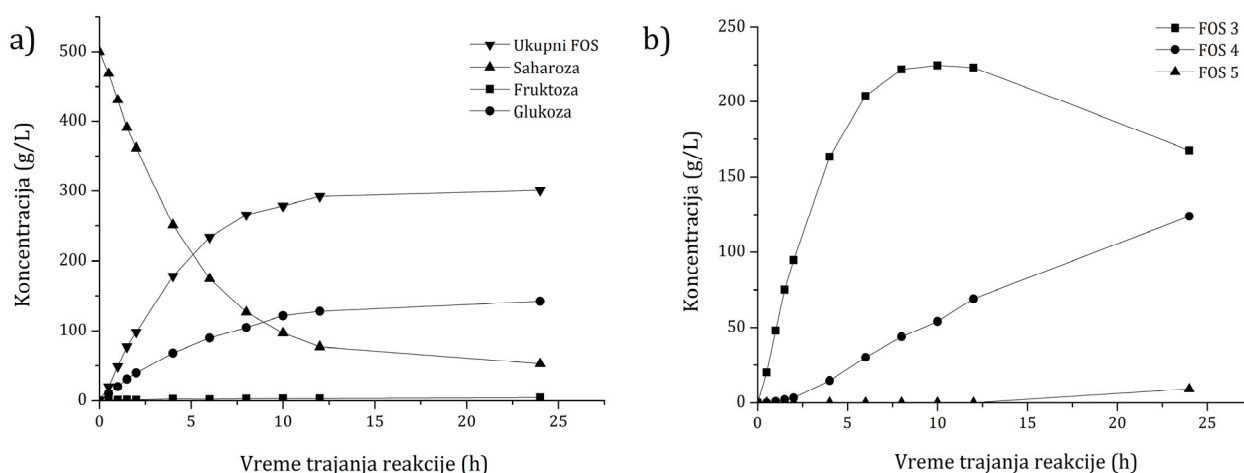
4.2. Enzimska sinteza FOS sa slobodnim enzimom

Uzimajući u obzir činjenicu da je reakcija transfruktozilacije kinetički kontrolisana i da se sastav proizvoda može menjati variranjem kontrolnih parametara [266], u ovom poglavlju prikazana je detaljna optimizacija procesa enzimske sinteze. U vezi sa tim, ispitan je uticaj pH, temperature, koncentracije enzima i supstrata na biokonverziju saharoze korišćenjem komercijalnog preparata Pectinex® Ultra SP-L [191]. S obzirom na to da i vreme trajanja reakcije predstavlja važan parametar koji diktira sastav konačnog proizvoda, prilikom izbora optimalnih uslova, biće razmatran i ovaj faktor. Pored osnovnog cilja koji uključuje razvijanje efikasnog procesa dobijanja smeše bogate FOS, od velike je važnosti da se razvijeni proces može preneti i na druge supstrate bogate saharozom radi direktne produkcije bioaktivnih molekula i stvaranja proizvoda koji bi mogli biti deklarirani kao funkcionalni.

Da vreme reakcije ima značajan uticaj na sastav reakcione smeše najbolje ukazuju rezultati eksperimenta u kojem je ispitan tok enzimske sinteze FOS koji je izveden korišćenjem rastvora saharoze (500 g/L) pripremljenog u 0,1 M natrijum acetatnom puferu (pH 5,5) pri koncentraciji enzima od 2,55 IU/mL na temperaturi od 50 °C. Na osnovu promene profila pojedinačnih komponenti (slika 4.2) uočava se da odigravanjem reakcije dolazi do trošenja saharoze na sintezu FOS, jer koncentracija saharoze konstantno opada tokom celog ispitivanog perioda. Istovremeno, koncentracija ukupnih FOS naglo raste u prvih 10 h, a zatim prelazi u

stacionarnu fazu. Period stagnacije se može bolje razumeti detaljnim pregledom koncentracionih profila FOS različitih stepena polimerizacije prikazanih na slici 4.2. Može se primetiti da dolazi prvo do stvaranja FOS 3, i da je u prvih 6 h ova komponenta glavni proizvod reakcije, nakon čega dobija ulogu akceptora fruktozne jedinice za formiranje FOS 4. Nagli rast FOS 3 se usporava usled trošenja ovog jedinjenja u sintezi tetrasaharida, iako i dalje dolazi do sinteze trisaharida. U nekom trenutku, oko 12 h, prevladava potrošnja FOS 3, dok u ovom periodu sinteza FOS 4 postaje dominantna. Pri kraju ispitivanog reakcionog perioda, nakon stvaranja odgovarajućih koncentracija FOS 4, počinje sinteza FOS 5. Sporednim proizvodima ove reakcije smatraju se glukoza, fruktoza i neproreagovala saharoza. Zanimljiva koncentracija fruktoze ukazuje na dominaciju reakcije transfruktozilacije nad hidrolizom.

S obzirom na gore pomenutu složenost sinteze FOS, neophodno je pažljivo proučavanje reakcionih uslova kako bi se dobila reakciona smeša željenog sastava. Stoga, izvedena je serija eksperimenata enzimske sinteze FOS variranjem ključnih reakcionih faktora kako bi se izabrali najpogodniji za efikasno dobijanje smeše bogate prebioticima.



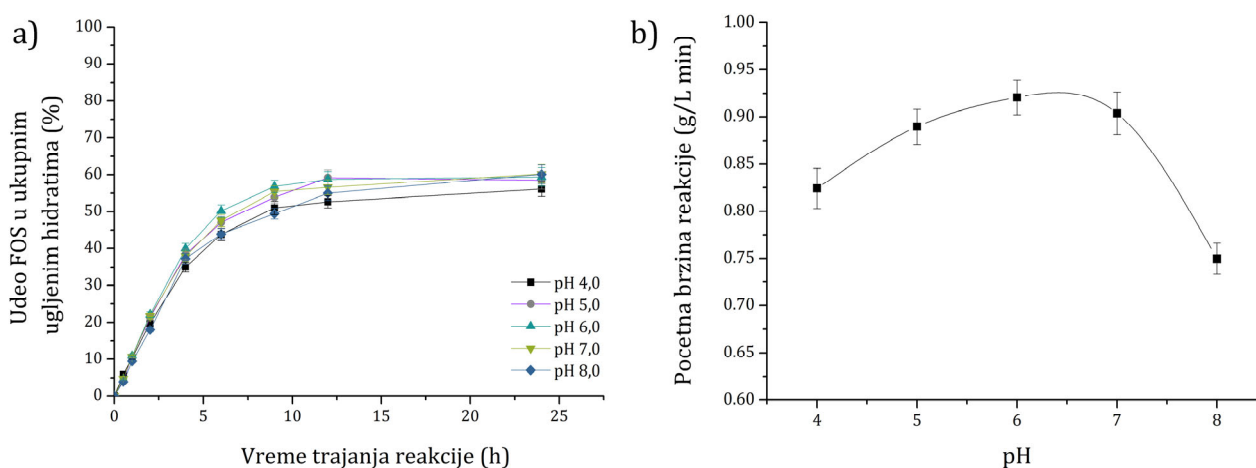
Slika 4.2. Vremenski tok enzimske sinteze FOS u pogledu promene a) svih komponenti smeše b) individualnih FOS.

4.2.1. Uticaj pH i temperature

Kao što je pomenuto i u teorijskom delu ove disertacije (poglavlje 2.5.2), efekat eksperimentalnih uslova poput pH i temperature zavisi od prirode korišćenog enzima [38]. Enzimi su osetljivi na promene pH, jer može doći do promene stanja jonizacije aminokiselina koje su sastavni deo strukture enzima, a samim tim i do promene strukture i oblika enzima. Ovakav efekat može rezultirati promenom aktivnosti ili dovesti čak do potpune inaktivacije enzima [267]. Kako je promena pH usko povezana sa promenom aktivnosti, ovaj parametar ostvaruje značajan uticaj na brzinu enzimske reakcije, dok je uticaj na prinos FOS često neznan [266].

Reakcija sinteze FOS je izvedena u medijumima koje karakteriše širok raspon pH vrednosti (4,0-8,0) pri koncentraciji saharoze 500 g/L i enzima 2,55 IU/mL na temperaturi od 50 °C, a dobijeni rezultati su prikazani na slici 4.3. Prikazani profili promene udela FOS su slični i u skladu sa navodima koje su prijavili Vega-Paulino i Zuniga-Hansen, da promena pH ostvaruje mali uticaj na prinos proizvoda [125]. Sa grafika se može primetiti da je FT iz smeše Pectinex® Ultra SP-L aktivna pri svim ispitanim pH vrednostima, kao i da je preparat posebno pogodan za sintezu FOS pri pH vrednostima većim od 4,0 zbog ostvarenih udela FOS koji iznose 58,5-

60,2 %. Na osnovu grafika koji ilustruje promenu početne brzine reakcije pri različitim ispitanim pH vrednostima može se uočiti da je najveća početna brzina od 0,92 g/L min postignuta u blago kiseljoj sredini, pri pH 6,0, dok su neznatno niže brzine od 0,89 i 0,90 g/L min dobijene pri pH 5,0 i pH 7,0, redom. Pri izboru optimalnog parametra treba uzeti u obzir i činjenicu da je osnovna primena komercijalnog enzimskog preparata hidroliza pektina u voću i povrću dejstvom pektinaza u kiselim uslovima [268]. Imajući ovo u vidu, u svetlu buduće primene preparata u kompleksnim supstratima, za izvođenje sinteze FOS izabran je pH 7,0, pri kojem neželjena aktivnost pektinaza može biti potisnuta do neke mere. Pored toga, izabrana pH vrednost omogućava i izvođenje reakcija u vodenoj sredini, čineći proces jednostavnijim i prihvatljivijim za prehrambenu industriju.

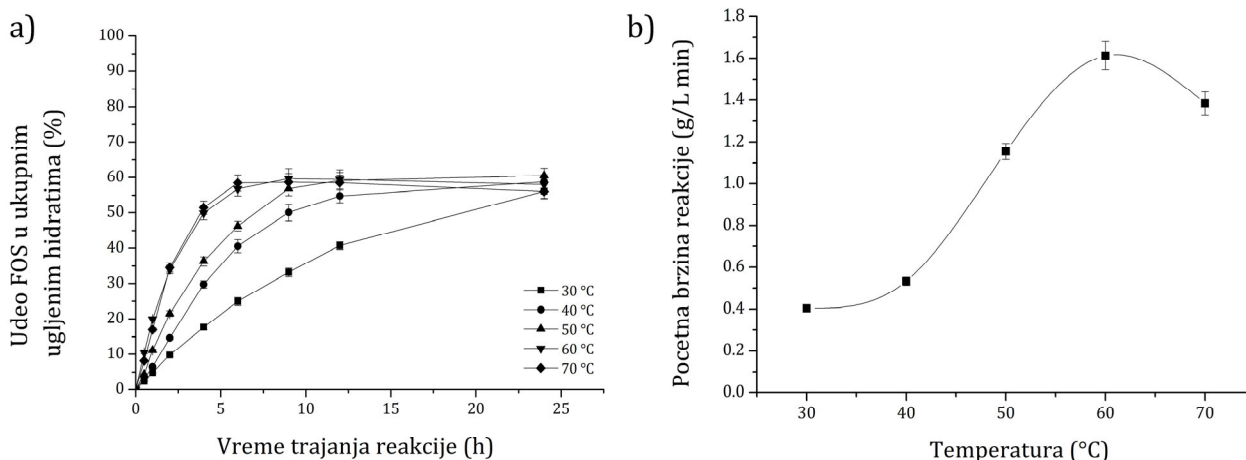


Slika 4.3. Uticaj pH na: a) udeo FOS b) početnu brzinu enzimske reakcije.

U poređenju sa pH, temperatura predstavlja parametar koji može imati značajan uticaj na brzinu enzimske reakcije [125] pošto sa porastom temperature dolazi do povećanja i brzine enzimske reakcije. Međutim, visoke temperature mogu dovesti do termičkog oštećenja enzima, a posledično i do značajnog pada aktivnosti enzima [269]. Stoga, ovaj parametar koji je ključan za uspešno izvođenje enzimskih reakcija je ispitan u narednom setu eksperimenata.

Konkretno u slučaju sinteze FOS, ispitane su različite temperature izvođenja reakcije (30-70 °C) i dobijeni rezultati eksperimenata prikazani su na slici 4.4. Primetno je da je sinteza FOS moguća u celom ispitivanom opsegu temperatura (slika 4.4a), kao i da se sa povećanjem temperature, brzina početne reakcije značajno povećava (slika 4.4b). Da povećanje brzine reakcije utiče na vreme dostizanja maksimalnog udela FOS dodatno potvrđuju i ostvareni rezultati. Naime, maksimalan udeo FOS od 56,05 %, 58,80 % i 60,4 % na temperaturi od 30, 40 i 50 °C je ostvaren nakon 24 h izvođenja reakcije, a 59,63 % i 58,64 % FOS na 60 i 70 °C nakon 9 h. Prijavljeno zapažanje je u skladu sa podacima koje su prijavili i drugi autori koji su ispitivali uticaj temperature na kinetiku sinteze FOS [125]. Izvođenje sinteze FOS na višim temperaturama rezultira značajnim smanjenjem vremena trajanja reakcije (sa 24 na 9 h) što dodatno potvrđuju i ostvarene početne brzine reakcije koje u poređenju sa brzinom od 0,53 g/L min izmerenoj na 40 °C iznose 1,61 i 1,38 g/L min za 60 i 70 °C, redom. Pri izboru optimalnog parametra treba detaljno sagledati sve mogućnosti. Sa jedne strane, više temperature su poželjne ne samo zbog poboljšane brzine reakcije, već i zbog veće rastvorljivosti saharoze, sprečene mikrobne kontaminacije i smanjenog viskoziteta [136], dok sa druge strane, izvođenje reakcije na visokim temperaturama u nekim kompleksnim supstratima može dovesti do promene boje ili čak uticati na karakteristike proizvoda [270]. U ovoj situaciji, podatak da je najveća ostvarena vrednost

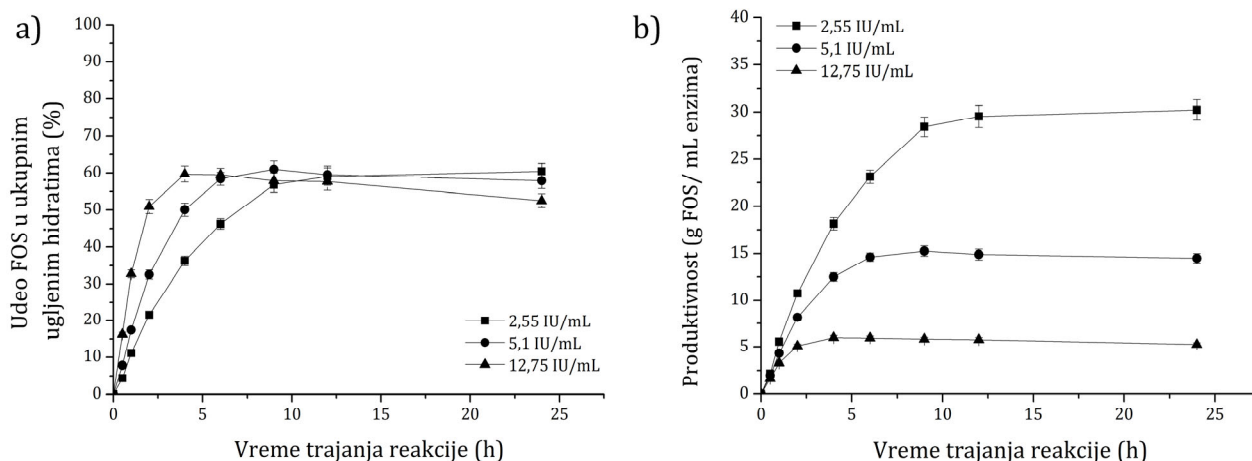
udela FOS od 60,4 % nakon 24 h trajanja reakcije dobijena na 50 °C, je bio presudan pri izboru optimalnog parametra, pa je ova temperatura izabrana za dalji rad.



Slika 4.4. Uticaj temperature na: a) udeo FOS b) početnu brzinu enzimske reakcije.

4.2.2. Uticaj koncentracije enzima

Nakon razmatranja pH i temperature, izvedeni su eksperimenti u kojima su primenjene različite koncentracije enzima (2,55-12,75 IU/mL) kako bi se definisali optimalni uslovi za reakciju sinteze FOS. Dobijeni rezultati su prikazani na slici 4.5, odakle se može videti da profili promene udela FOS potvrđuju da se upotrebom većih koncentracija postiže i veća početna brzina reakcije [125], a ujedno i kraće vreme dostizanja maksimalne vrednosti prinosa. Naime, primenom najniže koncentracije enzima od 2,55 IU/mL ostvaren je maksimalni udeo FOS od 60,44 % nakon 24 h (odgovara koncentraciji FOS od 302,2 g/L), 61,04 % FOS (305,2 g/L) nakon 9 h u slučaju koncentracije 5,1 IU/mL i 59,73 % FOS (298,7 g/L) nakon 4 h u uslovima najveće koncentracije enzima (12,75 IU/mL). Radi pouzdanijeg utvrđivanja efekta ovog parametra na reakciju sinteze, što je naročito bitno sa aspekta postizanja veće ekonomičnosti procesa, neophodno je sagledati i produktivnost procesa sinteze FOS (slika 4.5b).



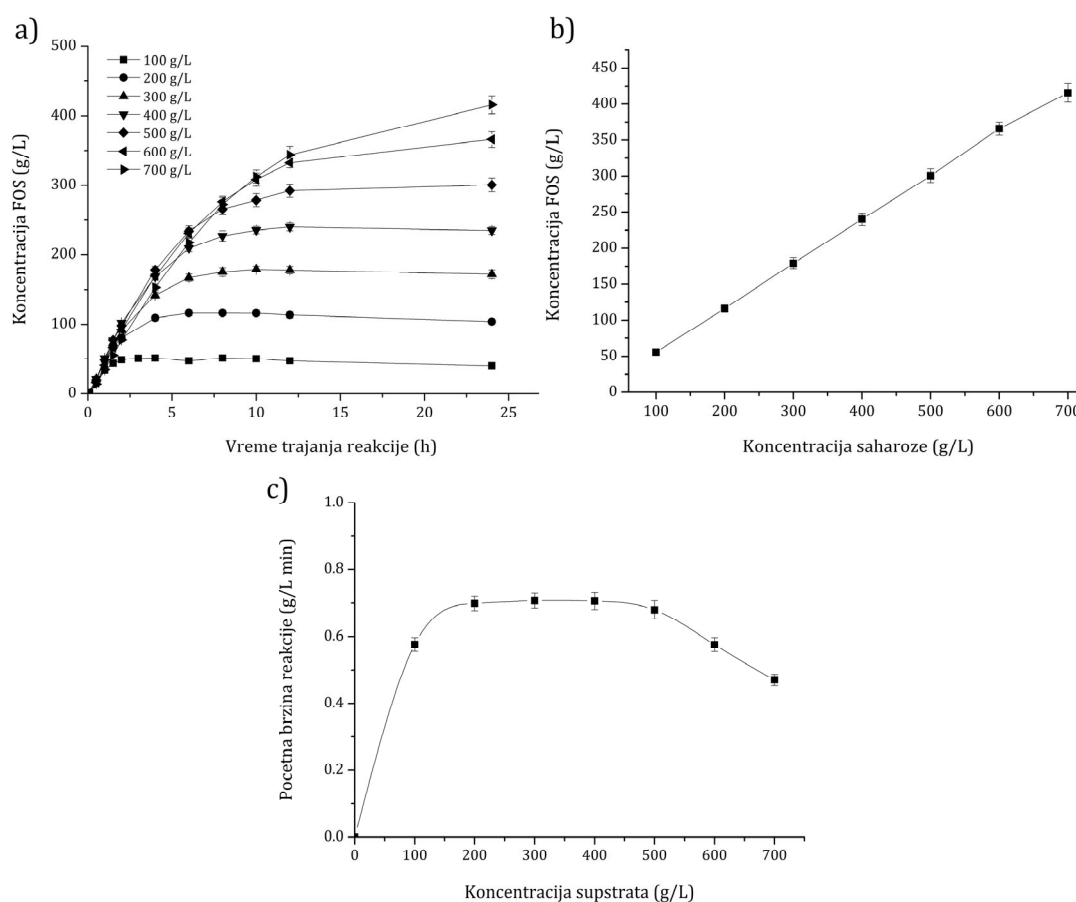
Slika 4.5. Uticaj koncentracije enzima na: a) udeo FOS b) produktivnost.

Sa slike 4.5b koja ilustruje promenu produktivnosti u uslovima različitih koncentracija enzima sa vremenom trajanja reakcije, može se uočiti potpuno suprotan trend promene. Naime, sa povećanjem ponuđene koncentracije enzima, produktivnost opada u celom ispitivanom vremenskom periodu. Imajući u vidu da cena enzima zauzima vodeće mesto u ukupnim

troškovima procesa kao i da se pri najnižoj koncentraciji postužu odgovarajući efekti, koncentracija od 2,55 IU/mL je izabrana za dalji rad. Ovim izborom dobijena je reakciona smeša sledećeg sastava: 60,4 % FOS, 10,1 % saharoze i 29,5 % monosaharida.

4.2.3. Uticaj koncentracije supstrata

Pored pomenutih reakcionih parametara, koncentracija supstrata takođe predstavlja važan faktor od kojeg zavisi kinetika sinteze FOS. Imajući u vidu da je koncentracija saharoze u direktnoj korelaciji sa količinom sintetisanih prebiotika, ispitan je uticaj ovog parametra u opsegu od 100-700 g/L. Tok sinteze je prikazan na slikama 4.6 i 4.7 i razmatran preko dva različita izlaza: koncentracija FOS (g/L) i udeo FOS (%). Uticaj ovog faktora na početnu brzinu reakcije sinteze FOS prikazan je na slici 4.6c. Sa 4.6a je evidentno da primena veće koncentracije direktno određuje i dobijanje većih količina FOS. Ovakav efekat je u skladu sa podacima iz naučne literature [125, 271]. Pomenuti efekat može biti posledica veće prisutnosti molekula koji mogu delovati kao akceptori fruktoze, favorizujući reakciju sinteze FOS u odnosu na hidrolizu [125]. Pri ispitanim različitim koncentracijama saharoze, koncentracije FOS koje odgovaraju ostvarenom maksimalnom prinosu se kreću u opsegu od 55,7-415,7 g/L (slika 4.6b).



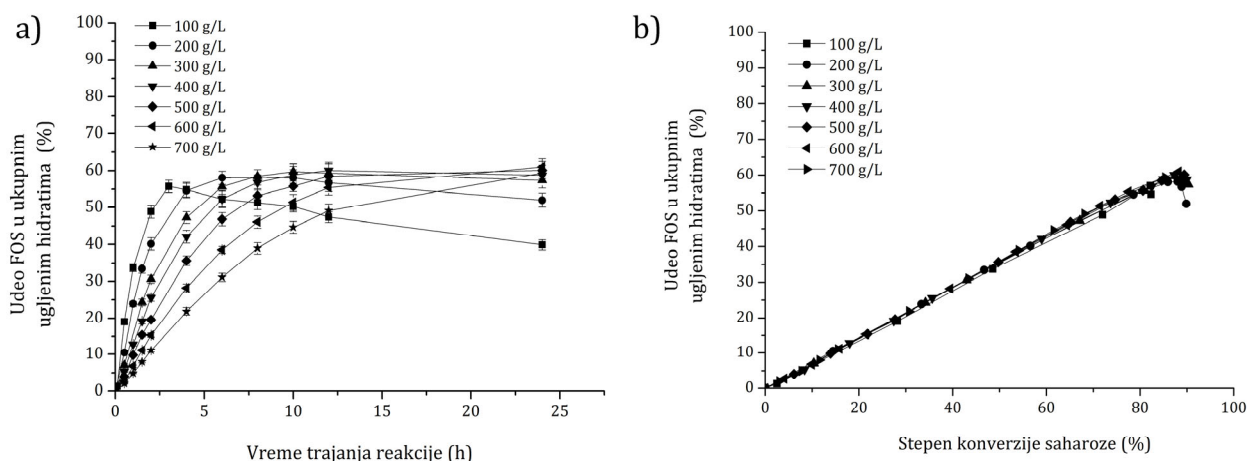
Slika 4.6. a) Uticaj različitih početnih koncentracija saharoze na koncentraciju FOS.

b) Zavisnost početne koncentracije saharoze i koncentracije FOS. c) Zavisnost početne brzine reakcije od početne koncentracije supstrata.

Da koncentracija saharoze utiče na početnu brzinu enzimske reakcije, najbolje ilustruje slika 4.6c. Naime, na osnovu Mihaelis-Mentenovog dijagrama, može se primetiti da pri nižim koncentracijama saharoze postoji linearna zavisnost početne brzine i početne koncentracije saharoze zbog manje zasićenosti aktivnih mesta enzima supstratom. Daljim povećanjem koncentracije supstrata (od 200-500 g/L) dolazi do zasićenja aktivnih mesta enzima, pri čemu

maksimalna početna brzine reakcije (0,7 g/L min) ostaje nepromenjena. Međutim, usled primene izrazito visokih koncentracija supstrata (u ovom slučaju koncentracije saharoze 600 i 700 g/L) dolazi do progresivnog pada početne brzine, a kao razlog za to može biti inhibicija supstratom.

Sa slike 4.7a je primetno da se skoro identičan maksimalan udeo FOS u ukupnim ugljenim hidratima od oko 60,0 % uočava u čitavom ispitivanom opsegu koncentracija, s tim što se u slučaju nižih koncentracija (100-300 g/L) postiže pri znatno kraćem vremenu trajanja reakcije, za razliku od upotrebljenih većih koncentracija (400-700 g/L) kod kojih se ostvaruje nakon 12 ili 24 h. Dobijeni podaci navode na konstataciju da su ostvareni udeli FOS nezavisni od početne koncentracije saharoze. Važno je istaći da i po dostizanju maksimalne vrednosti FOS, daljim trajanjem reakcije dolazi do promene sastava smeše, jer sintetisani FOS 3 koji su dominantni u momentu maksimalne konverzije deluju kao akceptori za dobijanje FOS 4, a oni dalje za FOS 5.

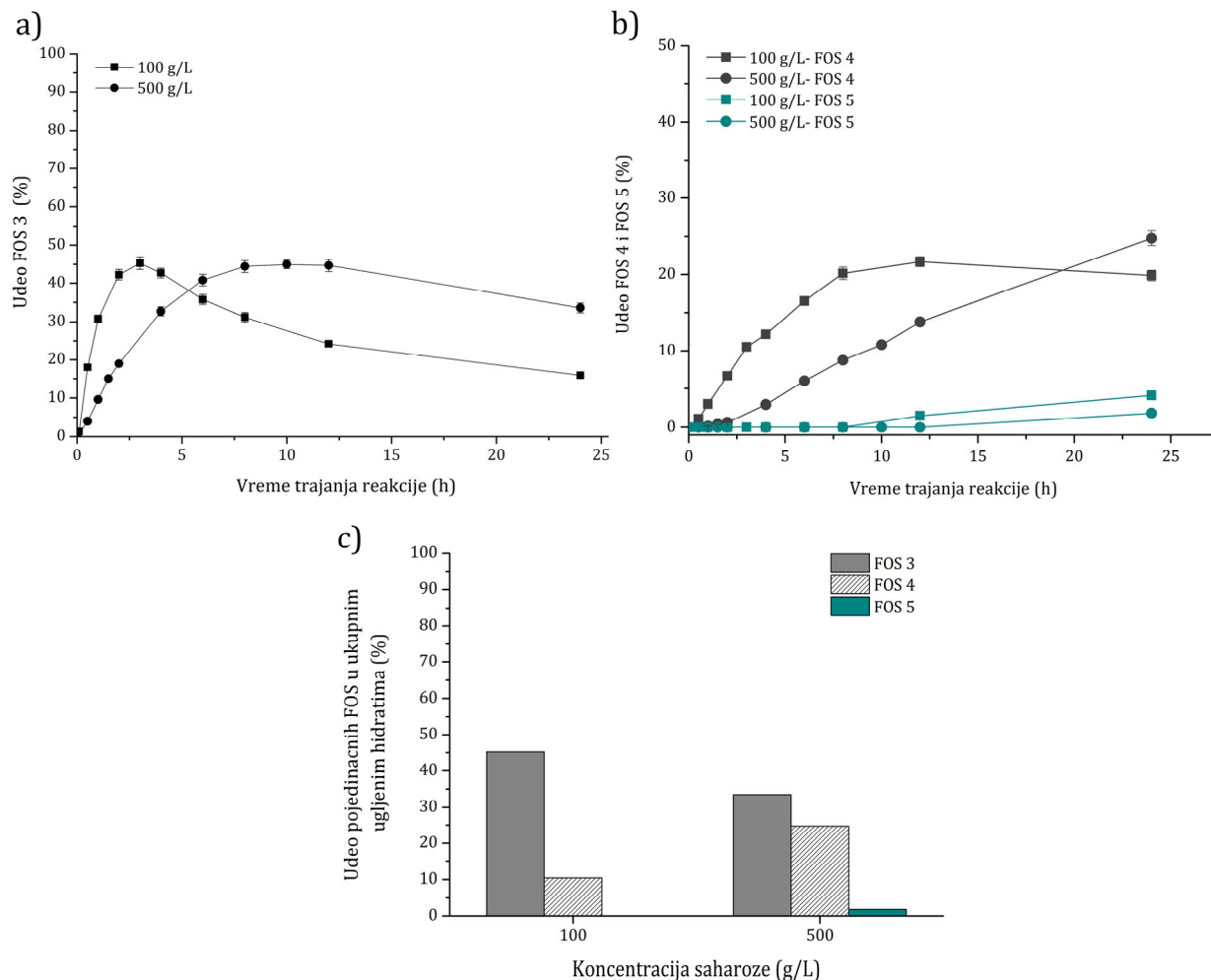


Slika 4.7 a) Uticaj različitih početnih koncentracija saharoze na udeo FOS b) Zavisnost stepena konverzije saharoze i udela FOS. Eksperimenti su izvedeni upotrebom puferskih rastvora (0,1 M, pH 5,5) različitih koncentracija saharoze (100-700 g/L) pri koncentraciji enzima od 2,55 IU/mL na 50 °C.

Kada se dobijeni rezultati predstave preko stepena konverzije saharoze (slika 4.7b), može se videti da se najbolji rezultati tj. maksimalni udeo FOS od 60,0 %, postiže pri konverziji saharoze od približno 85,0 % u svakom od izvedenih eksperimenata. Moguće objašnjenje za postojanje ove ravnotežne koncentracije FOS je da glukoza koja nastaje tokom reakcije deluje i kao kompetitivni inhibitor sinteze FOS [271]. Prema tome, može se zaključiti da nakon završetka reakcije u definisanom vremenu za svaku koncentraciju, dobijeni odnos komponenti će biti skoro konstantan. Ova doslednost je važna pri planiranju narednih eksperimenata i odlučivanju koji su proizvodi prihvatljivi za transformaciju saharoze, budući da potencijalni proizvod mora da ispunjava zahteve minimalne koncentracije da bi bio deklarisan kao funkcionalan.

Međutim, da su varijacije u sastavu individualnih FOS usko zavisne od početne koncentracije supstrata najbolje ilustruje slika 4.8. Evidentno je da pri niskim koncentracijama saharoze, nakon dostizanja maksimalne količine FOS 3, dalje odvijanje reakcije prati značajan pad u poređenju sa promenama do kojih dolazi u uslovima veće koncentracije (slika 4.8a). Izrazito smanjenje količine trisaharida je posledica akceptorske aktivnosti u produkciji jedinjenja većih molarnih masa - FOS 4. Sintetisani FOS 4 deluju dalje kao akceptori za dobijanje FOS 5 koji nastaju u većoj meri pri koncentraciji od 100 g/L (slika 4.8b). Takođe, pri nižoj koncentraciji supstrata, pad udela FOS 4 prati ne samo formiranje pentasaharida, već i značajno prisustvo fruktoznih jedinica u smeši, pa se stoga može zaključiti da daljim izvođenjem reakcije dolazi do favorizovanja hidrolize. U slučaju veće koncentracije supstrata, konstantan porast FOS 4, a posledično i FOS 5 u ispitivanom opsegu trajanja reakcije upućuje na konstataciju da je

primenom većih koncentracija saharoze favorizovana reakcija sinteze FOS. U momentu dostizanja maksimalnog udela FOS primenom pomenutih koncentracija supstrata (nakon 3 h za 100 g/L i 24 h za 500 g/L) dobijene su smeše sa evidentnim razlikama u sastavu individualnih FOS (slika 4.8c). Prema tome, može primetiti da je za dobijanje adekvatne smeše sa prebiotičkim karakteristikama vreme trajanja reakcije, koje pored primenjene koncentracije supstrata diktira sastav proizvoda, od izuzetnog značaja.



Slika 4.8. a) Profil promene prinosa FOS 3 u uslovima primene različitih početnih koncentracija saharoze. b) Profil promene prinosa FOS 4 i FOS 5 u uslovima primene različitih početnih koncentracija saharoze. c) Sastav pojedinačnih FOS u momentu dostizanja maksimalnog prinosa.

Prilikom odabira optimalnih parametara za efikasnu buduću primenu treba uzeti u obzir činjenicu da visoke koncentracije supstrata dovode do produkcije većih količina FOS što je od velike važnosti sa aspekta razvoja funkcionalnih proizvoda, tj. primene procesa sinteze FOS u različitim potencijalnim proizvodima na bazi saharoze. Konkretno, enzimski preparat bi se mogao efikasno primeniti u dostupnim prehrambenim proizvodima poput melase (oko 30 % saharoze) ili javorovog sirupa (oko 60 % saharoze) [272]. Sa druge strane, visoke koncentracije mogu dovesti do kristalizacije saharoze čime bi postojala prepreka za izvođenjem kontinualnih procesa u reaktorskim sistemima.

Imajući ovo u vidu i uzimajući u obzir ostvarene rezultate koji navode da se pri koncentraciji saharoze od 500 i 600 g/L, maksimalan udeo FOS postiže nakon 24 h, ali i da nisu ostvarene drastične razlike u koncentraciji, inicijalna koncentracija saharoze od 500 g/L je izabrana kao optimalna. Pri utvrđenim optimalnim uslovima (pH 7,0, temperatura 50 °C, koncentracija

enzima 2,55 IU/mL, koncentracija saharoze 500 g/L i vreme trajanja 24 h.) dobijena je reakciona smeša sledećeg sastava: 60,2 % FOS, 10,1 % saharoze i 29,7 % monosaharida. Koncentracija ukupnih FOS iznosi 301 g/L odakle je 170 g/L FOS 3, 126 g/L FOS 4 i 5,0 g/L FOS 5.

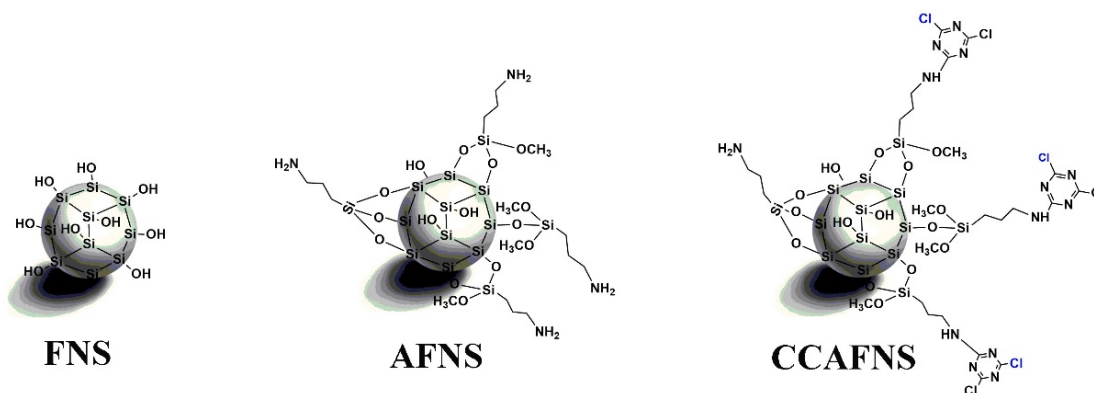
4.3. Enzimaska sinteza FOS sa imobilisanim enzimom

Nakon razvijanja efikasnog postupka sinteze FOS primenom slobodne FT iz komercijalnog preparata Pectinex® Ultra SP-L, u narednoj fazi istraživanja fokus je usmeren ka primeni imobilisanih enzima u ove svrhe. Primarni cilj ove faze je razvijanje novih enzimskih sistema koji se zasnivaju na imobilizaciji FT primenom različitih metoda (adsorpcija, kovalentna imobilizacija i umrežavanje), a potom i njihovo implementiranje u različitim reaktorskim konfiguracijama radi intenzifikacije procesa. Enzimi mogu biti imobilisani na nosače različitih veličina - od nano do makro dimenzija. Međutim, za imobilizaciju FT najpre su ispitane nanočestice koje se zbog svojih karakteristika koje uključuju biokompatibilnosti, visoku specifičnu površinu, nisku otpornost na prenos mase, smatraju odličnim izborom za unapređenje efikasnosti biokatalizatora [273]. Nanobiokatalizatori su do sada ostvarili značajnu primenu u biomedicini, farmaciji, poljoprivredi, biotehnologiji, zaštiti životne sredine, ali i u drugim oblastima [274, 275]. Pored čestica nano dimenzija, za procenu imobilizacije FT u cilju razvijanja biokatalizatora poboljšanih funkcionalnih karakteristika ali i zbog dalje potencijalne primene u reaktorskim sistemima, u okviru ove doktorske disertacije razmatrani su i nosači većih dimenzija.

4.3.1. Imobilizacija FT na nanočestice silike

Iako nanočestice (čestice prečnika 1-100 nm) [274] mogu biti sastavljene od različitih materijala, u poslednje vreme sve je češća upotreba nanočestica na bazi silicijum-dioksida. Odlikuju ih odlične fizičke karakteristike, velika kontaktna površina kao i biokompatibilnost [276]. Imajući u vidu da nisu podložne bubrenju u sredinama sa različitim pH pa samim tim i ne dovode do denaturacije enzima, pored mehaničke, termičke i stabilnost na promene pH svakako predstavljaju vodeće prednosti ovih nosača [277]. Međutim, u cilju postizanja boljih performansi, često se pristupa i njihovoj površinskoj modifikaciji korišćenjem različitih reagenasa sa ciljem uvođenja novih funkcionalnih grupa koje omogućavaju različite mehanizme imobilizacije, često i mogućnost kovalentne imobilizacije enzima [276]. S tim u vezi, za imobilizaciju FT iz enzimskog preparata Pectinex® Ultra SP-L dobijenog iz *A. aculeatus* biće primenjene neporozne nemodifikovane (FNS), amino-modifikovane (AFNS) i cijanuril-hloridom aktivirane amino-modifikovane nanočestice silike (CCAFNS) (slika 4.9).

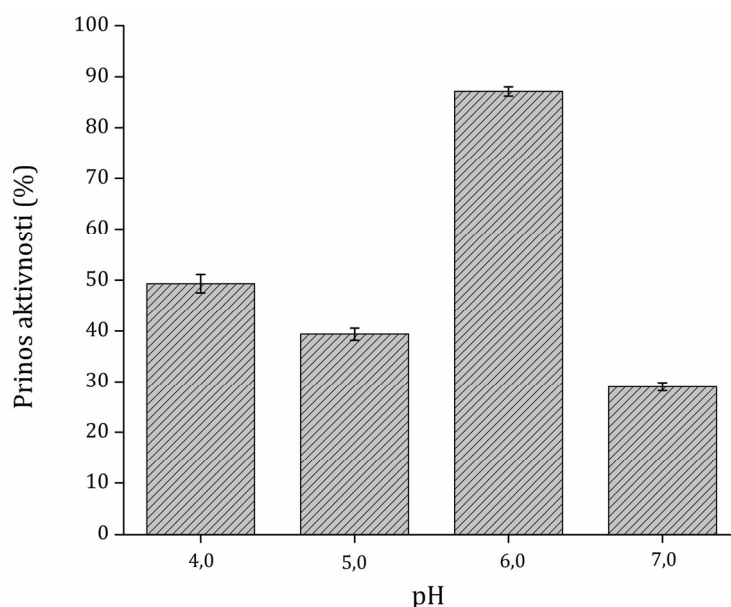
Radi stvaranja imobilisanog preparata poboljšane katalitičke aktivnosti, izvedena je detaljna optimizacija procesa imobilizacije analiziranjem uticaja ključnih parametara poput pH, koncentracije enzima i vremena imobilizacije.



Slika 4.9. Šematski prikaz dostupnih funkcionalnih grupa primenjenih nanočestica silike za imobilizaciju FT iz enzimskog preparata Pectinex® Ultra SP-L

U prvom setu eksperimenata, najpre je izvedena imobilizacija FT na nemođifikovane čestice silike (FNS). Ispitan je uticaj različitih koncentracija ponuđenih proteina (10-250 mg/g nosača) i puferkih rastvora (0,1 M, pH 4,0-7,0) pri vremenu imobilizacije od 2,5 h na vezivanje ciljanog enzima. Međutim, FT imobilisana na FNS čestice nije pokazala aktivnost. Ovakav rezultat upućuje na mogućnost formiranja odbojnih sila između negativno naelektrisanih funkcionalnih grupa enzima i negativno naelektrisanih površinskih silanolnih grupa nosača imajući u vidu da pI FNS iznosi 4,2 [278]. Da bi se prevazišla ova prepreka i omogućilo vezivanje između enzima i nosača, izvedena je modifikacija nanočestica silike sa aminopropil trimetil silanom radi dobijanja amino-funkcionalizovanih nanočestica (AFNS). Ovim pristupom uvedena je velika količina amino grupa (4,58 $\mu\text{mol/mg}$ nosača) na površini FNS.

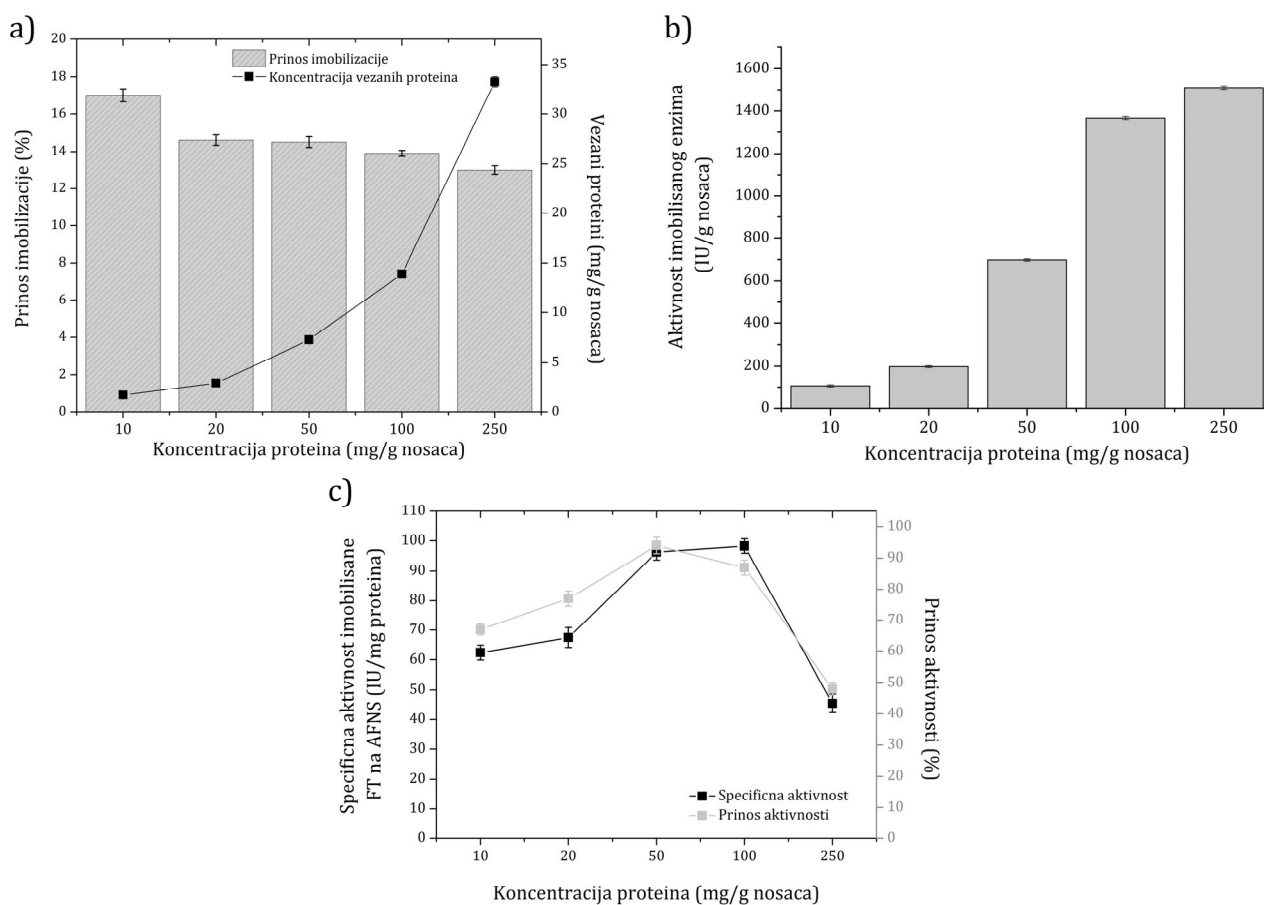
Pošto AFNS ima pozitivno naelektrisane amino grupe na površini, samo pri odgovarajućim pH vrednostima imobilizacije, moguće je favorizovanje elektrostatičkih interakcija između negativno naelektrisanih aminokiselinskih ostataka sa površine FT i funkcionalnih grupa nosača. Da bi se odredio optimalni pH za imobilizaciju FT na AFNS, određen je prinos aktivnosti za različite puferke sisteme čiji je pH u rasponu od 4,0 do 7,0 (slika 4.10). Imobilizacija je izvedena pri početnoj koncentraciji proteina od 100 mg/g nosača tokom 2,5 h. Rezultati sa grafika ukazuju na to da je imobilisana FT ispoljila najveći prinos aktivnosti od 87 % kojem odgovara aktivnost FT od 1448 IU/g nosača pri pH 6,0, dok su pri pH vrednostima nižim i višim od 6,0, prinosi aktivnosti bili niži od 50 %. Prema, tome, rastvor čiji je pH 6,0 usvojen je za dalja istraživanja kinetike vezivanja FT.



Slika 4.10. Uticaj pH na prinos aktivnosti imobilisane FT na amino-modifikovane nanošestice silike (AFNS)

Kinetika imobilizacije FT na AFNS dalje je analizirana utvrđivanjem efekata različitih koncentracija proteina (10-250 mg/g nosača) u 0,1 M fosfatnom puferu pH 6,0 pri vremenu imobilizacije od 2,5 h. Sa slike 4.11a koja ilustruje promenu koncentracije imobilisanih proteina i prinosa imobilizacije pri različitim ponuđenim koncentracijama proteina može se uočiti da se sa povećanjem ponuđene koncentracije, i koncentracija imobilisanih proteina povećava do 32 mg/g nosača pri najvišoj primenjenoj koncentraciji od 250 mg/g nosača. U slučaju prinosa imobilizacije proteina može se primetiti suprotan, ali vrlo blag, trend promene. Dakle, maksimalni prinos imobilizacije od 17 % je postignut pri najnižoj početnoj koncentraciji proteina (10 mg/g nosača), dok je u uslovima najveće početne koncentracije ostvaren najniži prinos imobilizacije od 13 %. Međutim, radi stvaranja kompletne slike o imobilizaciji FT,

neophodno je sagledati i aktivnost imobilisane FT kao i prinos aktivnosti pri ispitanim uslovima (slika 4.11b i 4.11c).

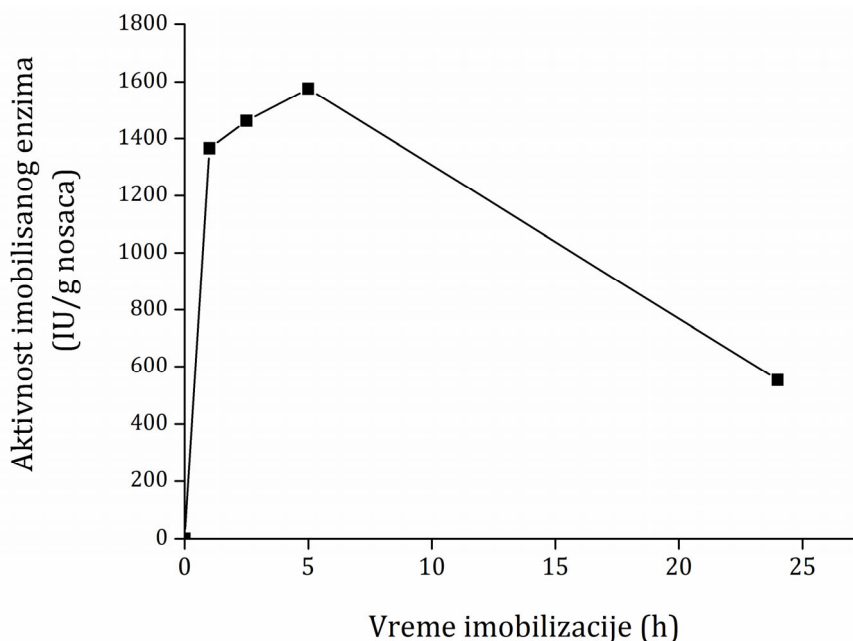


Slika 4.11. Uticaj različitih koncentracija proteina na: a) koncentraciju vezanih proteina i prinos imobilizacije b) aktivnost imobilisane FT i c) prinos aktivnosti i specifičnu aktivnost imobilisane FT na amino-modifikovane nanočestice silike (AFNS)

Sa slike 4.11b se može uočiti da se aktivnost imobilisane FT naglo povećava sa povećanjem početne koncentracije proteina do 100 mg/g nosača. Najveća aktivnost FT imobilisane na AFNS nosač iznosi 1502 IU/g nosača i odgovara najvećoj početnoj koncentraciji proteina od 250 mg/g nosača, dok je neznatno niža aktivnost od 1448 IU/g nosača dobijena primenom 2,5 puta niže koncentracije enzima (100 mg/g nosača). Važno je istaći da iako povećanje početne koncentracije proteina sa 100 na 250 mg/g nosača prati i identično povećanje koncentracije proteina (slika 4.11a), aktivnost je pri nižoj primenjenoj koncentraciji neznatno niža (primećen je pad manji od 5 %), što navodi na zaključak da je u uslovima najveće primenjene koncentracije (250 mg/g nosača) dominantnije vezivanje drugih proteina iz primenjenog komercijalnog preparata Pectinex® Ultra SP-L. Uzimajući u obzir i parametre koji opisuju katalitičku efikasnost imobilisanog preparata poput specifične aktivnosti i prinosa aktivnosti (slika 4.11c) primetno je da su najviše vrednosti dobijene izvođenjem imobilizacije pri koncentraciji proteina od 50 i 100 mg/g nosača, kao i da postoji relevantna promena u koncentraciji aktivnih imobilisanih enzima pri većim koncentracijama od 100 mg/g nosača. Pored visokih vrednosti specifične aktivnosti (96 IU/mg proteina) i prinosa aktivnosti (94 %) pri koncentraciji 50 mg/g nosača, aktivnost FT imobilisane na AFNS je bila 2 puta niža nego pri 100 mg/g nosača. Prema tome, sumirajući sve prikazane rezultate, koncentracija od 100 mg/g nosača kojom se dobija prinos aktivnosti od 87 %, specifična aktivnost od 98 IU/mg proteina, ali i aktivnost FT od 1448 IU/g nosača, je izabrana kao optimalna. Kao što je već pomenuto, može se pretpostaviti da u ovom slučaju dolazi do uspostavljanja elektrostatičkih interakcija između negativno

naelektrisanih proteinskih ostataka i pozitivno naelektrisanih amino grupa AFNS u izvedenim eksperimentalnim uslovima. Izražena visoka aktivnost imobilisane FT može se objasniti činjenicom da su negativno naelektrisane funkcionalne grupe enzima koje su uključene u adsorpciju, suprotno orijentisane od aktivnog mesta FT, što posledično omogućava lak pristup supstratu.

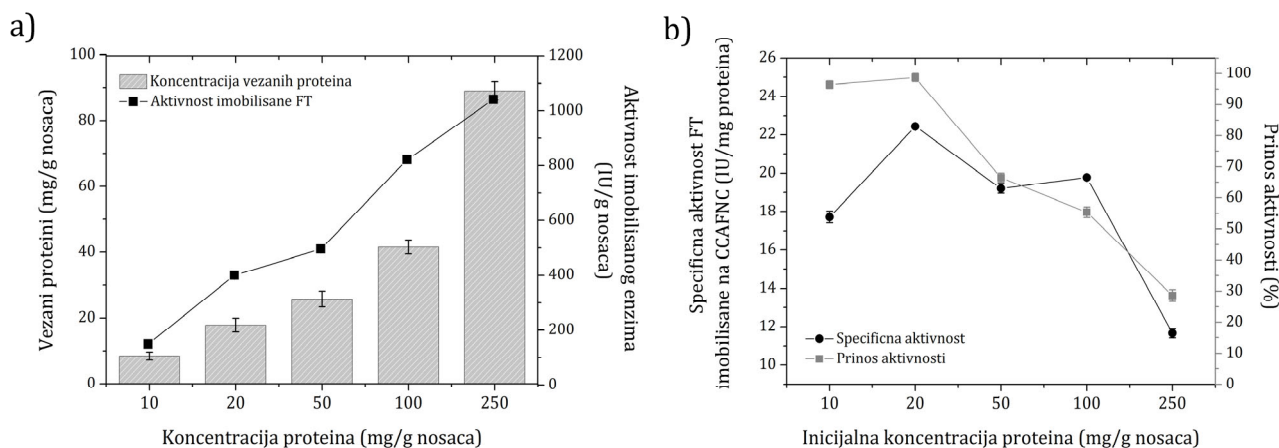
Pri izabranim optimalnim parametrima (pH 6,0 i koncentracija proteina od 100 mg/g nosača), istražen je i uticaj vremena imobilizacije na aktivnost imobilisane FT (slika 4.12). Profil promene aktivnosti pokazuje da je maksimalna aktivnost nosača od 1576 IU/g nosača dobijena nakon 5 h imobilizacije, što je neznatno više nego nakon 2,5 h. Kako je osnovni cilj razvijanje efikasnih i ekonomski isplativih postupaka, kraće vreme imobilizacije od 2,5 h je usvojeno kao optimalno za dalji rad.



Slika 4.12. Uticaj vremena imobilizacije na aktivnost imobilisane FT na amino-modifikovane nanošestice silike (AFNS)

Nakon uspešne realizacije adsorpcije FT iz komercijalnog enzimskog preparata Pectinex® Ultra SP-L na amino-modifikovane čestice silike (AFNS), u narednom setu eksperimenata pomenute nanočestice su tretirane i cijanuril-hloridom radi uvođenja hloridnih funkcionalnih grupa i stvaranja uslova za izvođenje kovalentne imobilizacije. Primenom ove tehnike koja se smatra mnogo poželjnijom u poređenju sa adsorpcijom zbog veće stabilnosti enzima, može doći do formiranja jakih i stabilnih kovalentnih veza između hloridnih grupa triazinskog prstena sa površine dodatno modifikovanih nanočestica silike (CCAFNS) i amino funkcionalnih grupa sa površine enzima. Detaljna analiza primenjivosti nosača aktiviranog cijanuril-hloridom (CCAFNS) za imobilizaciju FT, izvedena je praćenjem ključnih funkcija imobilizacije koje uključuju koncentraciju vezanih proteina, aktivnost, prinos aktivnosti i specifičnu aktivnost imobilisanog enzima. Imobilizacija FT je izvedena u 0,1 M puferskom rastvoru pH 6,0 pri vremenu imobilizacije od 2,5 h, primenom različitih početnih koncentracija proteina (10 - 250 mg/g nosača), a ostvareni rezultati su prikazani na slici 4.13. Na osnovu dobijenih rezultata može se primetiti da sa povećanjem početne koncentracije proteina dolazi do naglog povećanja koncentracije imobilisanih proteina i aktivnosti imobilisane FT. Za najveću početnu koncentraciju proteina od 250 mg/g nosača, dobijena je najveća aktivnost FT od 1041 IU/g nosača, ali i najveća koncentracija vezanih proteina od 89 mg/g nosača (slika 4.13a). Uzimajući u obzir i ostale parametre procesa pri istoj koncentraciji proteina, sa slike 4.13b se

mogu uočiti najniže vrednosti specifične aktivnosti i prinosa aktivnosti. Najveća vrednost specifične aktivnosti od 22 IU/mg proteina i prinos aktivnosti od 98 % dobijeni su izvođenjem imobilizacije FT u uslovima koncentracije proteina od 20 mg/g nosača, dok je aktivnost ovog preparata iznosila samo 400 IU/g nosača. Sagledavajući i ostale vrednosti, može se primetiti da je pri koncentraciji proteina od 100 mg/g nosača, iako je duplo manje vezanih proteina (41 mg/g nosača) u poređenju sa najvećom primenjenom koncentracijom, aktivnost neznatno niža i iznosi 822 IU/g nosača. Ovakav rezultat navodi na zaključak da su vezani proteini dobro orijentisani i dostupni supstratu.



Slika 4.13. Uticaj različitih koncentracija proteina na: a) koncentraciju vezanih proteina i aktivnost imobilisane FT i b) prinos aktivnosti i specifičnu aktivnost imobilisane FT na amino-modifikovane nanošestice silike aktivirane cijanuril-hloridom (CCAFNS)

Sa druge strane, koncentraciji 100 mg/g nosača odgovara specifična aktivnost od 19 IU/mg proteina, što je vrlo blizu maksimalne, a postignut je i zadovoljavajući prinos aktivnosti od 55 %. Stoga je koncentracija 100 mg/g nosača izabrana kao optimalna. U narednoj seriji eksperimenata ispitan je i uticaj vremena imobilizacije na aktivnost imobilisane FT na CCAFNS pri 100 mg/g nosača i pH 6,0. Dobijeni rezultati su pokazali da je maksimalna aktivnost od 1122 IU/g nosača postignuta nakon 5 h, što je 1,36 puta više od dobijene aktivnosti na 2,5 h. Prema tome, u slučaju imobilizacije FT na CCAFNS, vreme imobilizacije od 5 h je usvojeno kao optimalno za dalju primenu. Sumirani prikaz usvojenih optimalnih parametara za imobilizaciju FT na primenjene nanočestice je dat u tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Prikaz izabranih optimalnih uslova za izvođenje imobilizacije FT na modifikovane nanočestice

Nosač	pH	Vreme imob. (h)	Konc. proteina (mg/g nosača)	Aktivnost FT (IU/g nosača)
AFNS	6,0; 0,1 M	2,5	100	1448
CCAFNS	6,0; 0,1 M	5	100	1122

Uporednom analizom dobijenih rezultata za oba ispitana nosača (AFNS i CCAFNS) za imobilizaciju FT iz preparata Pectinex® Ultra SP-L, da se primetiti da je nosač CCAFNS povoljniji u pogledu koncentracije vezanih proteina, dok je sa druge strane, enzim imobilisan na AFNS pokazao skoro 1,3 puta veću aktivnost. Prikazani rezultati pružaju uvid o vezivanju FT na čestice nano dimenzija i dobijanju imobilisanih preparata visokih katalitičkih aktivnosti za produkciju FOS. Međutim, pored značajnog naučnog doprinosa, dalja implementacija

nanočestica u reaktorskim sistemima većeg kapaciteta je limitirana njihovim dizajnom, te stoga i dalje predstavlja izazov i zahteva detaljna istraživanja. Imajući ovo u vidu, dalji eksperimenti će biti usmereni ka primeni nosača većih dimenzija koji su ne samo jednostavniji za manipulaciju već se smatraju i stabilnijim usled uticaja spoljnih faktora (pH i t) čime su podložniji i dugoročnoj primeni u komercijalnim industrijskim procesima.

4.3.2. Selektivna imobilizacija FT na Purolite Lifetech™ nosače

U okviru ove doktorske disertacije, FT iz enzimskog preparata Pectinex® Ultra SP-L je imobilisana i na različite metakrilatne nosače iz Lifetech™ ERC serije čije su detaljnije karakteristike predstavljene u tabeli 4.2. Ovi biokompatibilni porozni nosači imaju odlična mehanička i hemijska svojstva, a prisustvo raznovrsnih funkcionalnih grupa im omogućava uspostavljanje različitih vrsta veza [279, 280].

Tabela 4.2. Karakteristike pojedinih nosača iz Lifetech™ ERC serije [281]

Nosač	Funkcionalna grupa	Struktura funkcionalne grupe	Prečnik pora, nm	Veličina čestica, μm
ECR8409F (Amino C6 metakrilat)	NH ₂ duga „nožica“		60-120	150-300
ECR8806M (Oktadecil metakrilat)	Oktadecil		50-70	300-700
ECR8285F (Epoksi/butil metakrilat)	Epoksi		40-60	150-300

Najpre je izveden preliminarni eksperiment gde je FT imobilisana na tri različita nosača - ECR8409F, ECR8806M i ECR8285F - koji pružaju mogućnost uspostavljanja elektrostatičkih interakcija, hidrofobnih interakcija ili kovalentnih veza, redom. Imobilizacija je izvedena u uslovima koji su optimalni za svaki od nosača (poglavlje 3.2.6.7.2.). Prema vrednostima aktivnosti imobilisane FT prikazanih u tabeli 4.3, može se primetiti da je nosač sa primarnim amino grupama (ECR8409F) najpogodniji za dalji rad. Međutim, imajući u vidu da je neznatno niža aktivnost primećena kada je primenjen nosač sa epoksidnim grupama koji omogućava formiranje jakih kovalentnih veza, a posledično i stabilnih imobilisanih derivata, metakrilatni nosači ECR8409F i ECR8285F su dalje analizirani kroz detaljnu optimizaciju procesa imobilizacije.

Tabela 4.3. Preliminarne aktivnosti imobilisane FT usled imobilizacije na različite metakrilatne Lifetech™ nosače

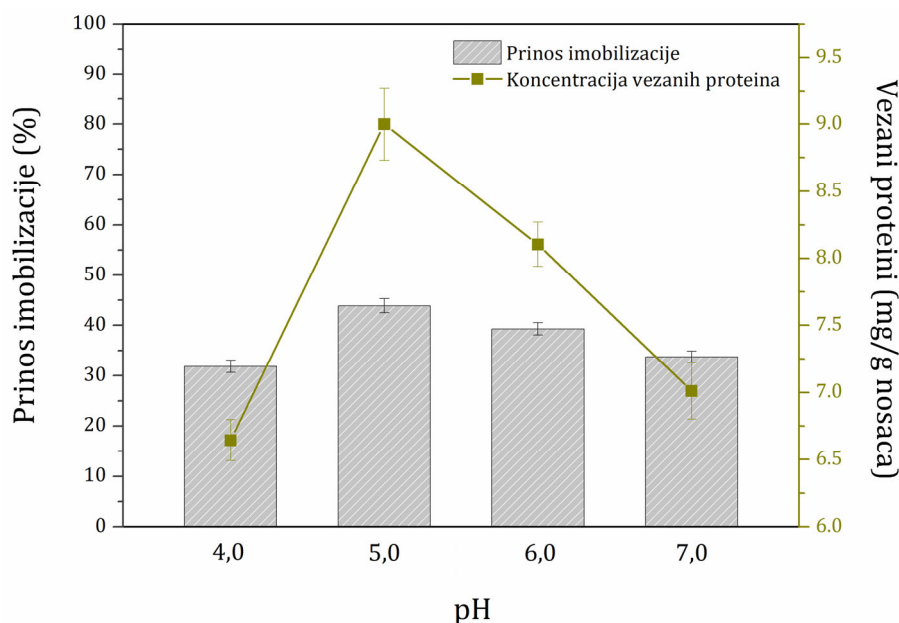
Nosač	ECR8409F	ECR8806M	ECR8285F
Aktivnost, IU/g nosača	260,01	43,00	233,03
Prinos aktivnosti, %	86,96	14,38	77,94

4.3.2.1. Optimizacija imobilizacije FT na ECR8409F Lifetech™ nosač

Prema vrednostima iz preliminarnog eksperimenta, nosač sa primarnim amino grupama ECR8409F je kvalifikovan kao pogodan za detaljniju optimizaciju procesa selektivne imobilizacije FT variranjem pojedinačnih parametara poput pH, koncentracije proteina i vremena imobilizacije.

Primena ovog nosača pruža mogućnost uspostavljanja elektrostatičkih interakcija na osnovu razlike u naelektrisanju enzima i nosača. U zavisnosti od pH sredine, može se promeniti stanje protonizacije aminokiselina koje su sastavni deo strukture enzima i favorizovati raspodela naelektrisanih površinskih grupa. Naime, ukoliko je pH sredine veći od izoelektrične tačke (pI) enzima koja je u slučaju FT u opsegu od 3,8-4,2, ukupno naelektrisanje enzima će biti negativno, jer dolazi do deprotonizacije većeg broja grupa kiselinskih aminokiselina, i obrnuto [282]. Kako je i pK kiselih aminokiselina poput asparaginske i glutaminske oko 4,0, enzim će u sredini čiji je pH veći od pKa biti negativno naelektrisan. Pored pH, i jonska jačina rastvora predstavlja parametar koji značajno može uticati na ishod imobilizacije. Međutim, favorizovanje adsorpcije je izvedeno u rastvoru niske jonske jačine (0,1 M), jer prema potvrđenim teorijama (Debye - Hückelov efekat), visoka jonska jačina rastvora tj. velika koncentracija prisutnih jona, može značajno smanjiti domet privlačnih sila i otežati adsorpciju enzima za nosač. U tom slučaju dolazi do nagomilavanja viška jona na suprotno naelektrisanu površinu čime se može neutralisati njeno naelektrisanje i dovesti do suzbijanja elektrostatičkih interakcija između enzima i nosača [283]. Dakle, izvođenjem imobilizacije u uslovima niske jonske jačine moguće je favorizovati adsorpciju, a adekvatnim izborom pH uticati i na povećanje prisustva anjonskih ili katjonskih grupa enzima.

Prema tome, preko negativno naelektrisanih karboksilnih grupa FT, koje mogu reagovati sa pozitivno naelektrisanim amino grupama metakrilatnog mikroporoznog ECR8409F nosača, može doći do adsorpcije enzima. S tim u vezi, na proces vezivanja FT za komercijalni nosač sa primarnim amino grupama, ispitan je uticaj pH u opsegu od 4,0-7,0 (0,1 M), dok su ostali parametri ostali nepromenjeni (koncentracija proteina 20 mg/g nosača i vreme imobilizacije 1 h).

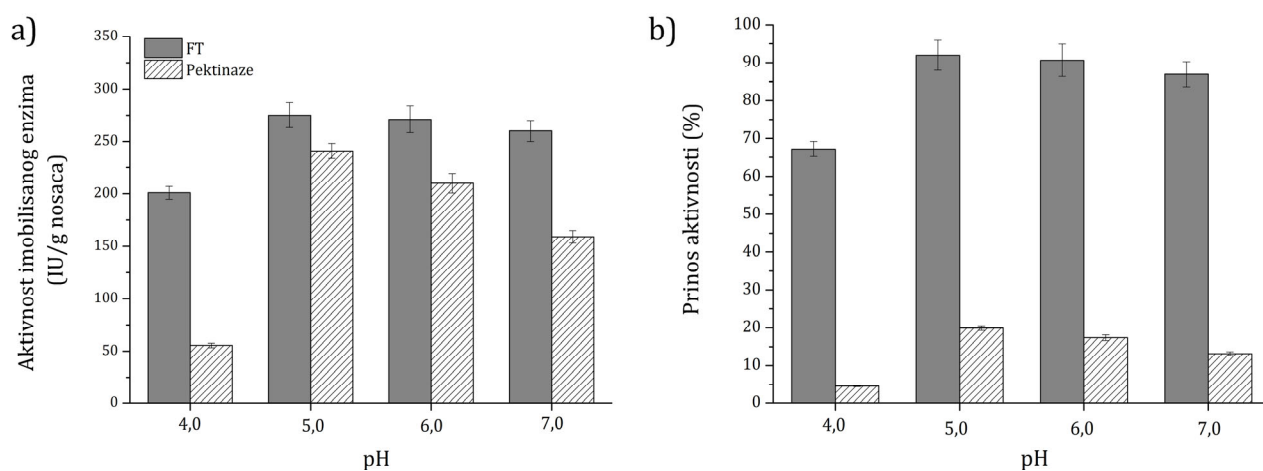


Slika 4.14. Uticaj pH na prinos imobilizacije i na koncentraciju vezanih proteina usled imobilizacije FT na Lifetech™ nosač sa amino grupama

Sa slike 4.14 je evidentno da pH znatno utiče na vezivanje enzima. Pri najnižem pH primećena je najmanja koncentracija vezanih proteina (6,6 mg/g nosača), a najveća pri pH 5,0 (9,0 mg/g nosača). Daljim povećanjem pH, uočava se nagli pad koncentracije vezanih proteina. Prinos imobilizacije prati promenu koncentracije vezanih proteina i takođe na pH 5,0 dostiže maksimalnu vrednost od 44 %. Imajući u vidu da je kao izvor FT primenjen komercijalni enzimski preparat Pectinex® Ultra SP-L, u kojem su dominantniji hidrolitički enzimi poput pektinaza, radi odabira optimalnih uslova neophodno je detaljno razmotriti sledeće funkcije

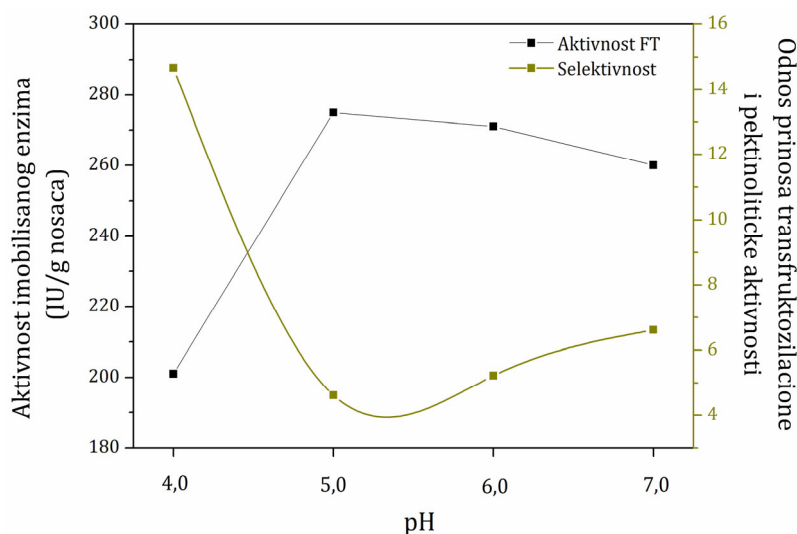
cilja: aktivnost, prinos aktivnosti i odnos prinosa transfruktozilacione i pektinoličke aktivnosti.

Posmatrajući aktivnosti imobilisane FT i pektinaza (slika 4.15a) može se uočiti veoma sličan trend promene. Maksimalne vrednosti FT i pektinoličke aktivnosti od 275 i 241 IU/g nosača, identifikovane su u istim eksperimentalnim tačkama tj. pri pH 5,0. Iako su dobijene vrednosti aktivnosti u sličnom opsegu, sa slike 4.15b se mogu uočiti značajne razlike u prinosu aktivnosti (92 % za FT i 20 % za pektinaze). Rezultati prinosa aktivnosti ispitanih enzimskih vrsta pri svim razmatranim pH, navode na zaključak da je prisutna selektivnost, odnosno da je favorizovano vezivanje FT. Takođe, visoke katalitičke aktivnosti imobilisane FT u opsegu pH od 5,0-7,0 kojima odgovaraju i prinosi aktivnosti veći od 87 % su verovatno posledica dobre orijentacije imobilisanog enzima unutar pora i na površini nosača gde je samim tim i pristupačniji prilaz supstrata aktivnom centru enzima. Takođe, ovaj rezultat može biti i posledica drastične razlike u veličini supstrata pošto je supstrat FT mnogo manji (disaharid) od supstrata pektinaze (polisaharid).



Slika 4.15. Uticaj pH na: a) aktivnost i b) prinos aktivnosti imobilisane FT i pektinaza na Lifetech™ nosač sa amino grupama

Prilikom izbora optimalne vrednosti pH, u nameri da se dobijeni imobilisani preparat dalje implementira za potrebe biokonverzije saharoze u FOS i u heterogenim sistemima, od važnosti je razmotriti i odnos prinosa aktivnosti kako bi se sagledala i selektivnost.

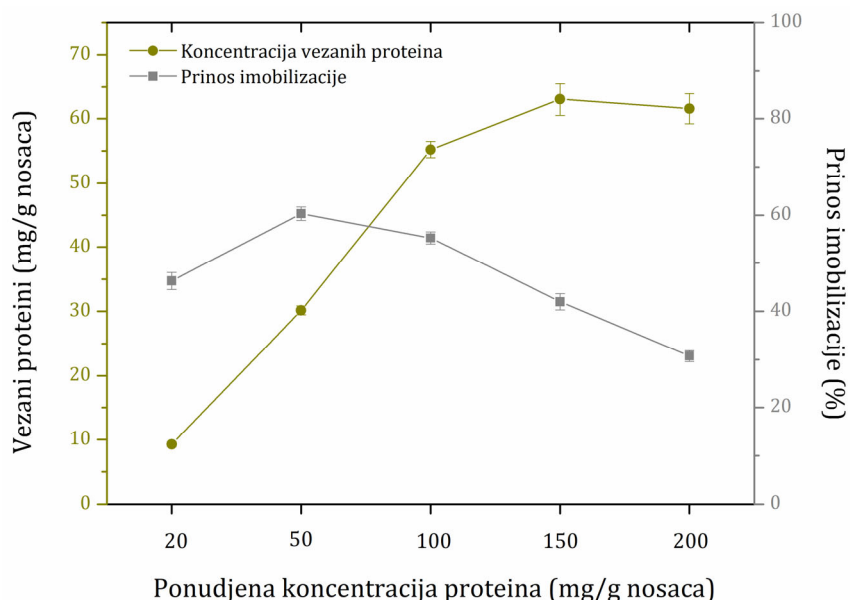


Slika 4.16. Uporedni prikaz aktivnosti imobilisane FT i selektivnosti u zavisnosti od pH

Sa slike 4.16, se može primetiti da funkcija odnosa prinosa aktivnosti dostiže svoj maksimum od 14,7 pri pH 4,0, dok pri pH 5,0 dostiže svoj minimum od 4,61. Uporednom analizom i aktivnost imobilisane FT, uočava se sasvim suprotan efekat. Kao što je pomenuto, maksimalna aktivnost od 275 IU/g nosača je dobijena pri pH 5,0, a minimalna pri pH 4,0. U ovom momentu, budući da dve funkcije cilja istovremeno dostižu svoje minimume i maksimume, dodatno je otežan izbor optimalnog pH. Kako je osnovni cilj ove doktorske disertacije dobijanje imobilisanih preparata visokih katalitičkih performansi radi primene u sintezi FOS, zbog veće aktivnosti FT, pH 5,0 je izabran kao najpovoljniji za dalji rad.

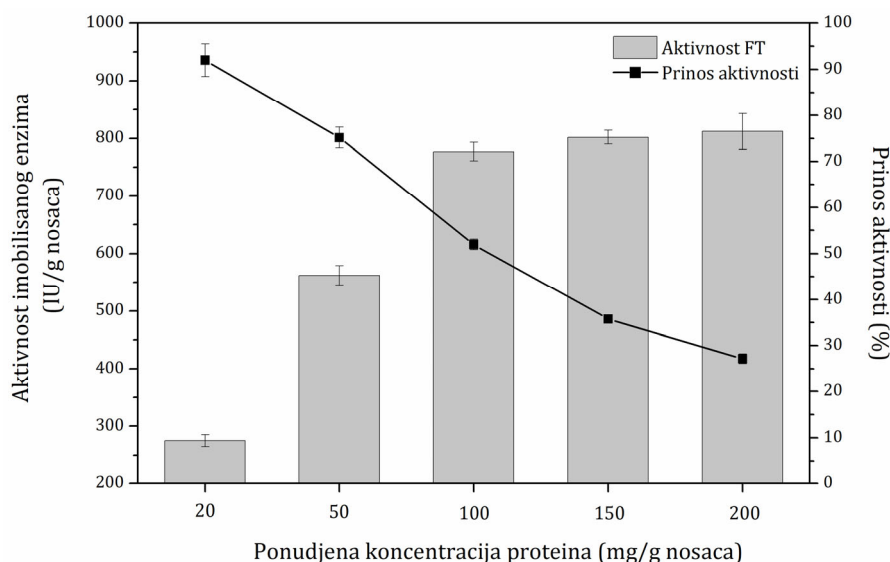
U sledećoj seriji eksperimenata, radi potpune optimizacije koja ima za cilj dobijanje imobilisanog preparata veće katalitičke aktivnosti, varirana je ponuđena koncentracija proteina kao i vreme imobilizacije. Najpre su izvedeni eksperimenti u kojima je ispitan uticaj različitih koncentracija proteina od 20-200 mg/g nosača pri pH 5,0 i dužini trajanja imobilizacije od 1 h.

Grafičkim prikazom dobijenih rezultata (slika 4.17.) može se uočiti da se sa povećanjem početne koncentracije unetog enzimskog preparata Pectinex® Ultra SP-L gde se ujedno povećava i koncentracija FT, sasvim očekivano povećava i koncentracija vezanih proteina. Maksimalna vrednost koncentracije vezanih proteina od 63 mg/g nosača dobijena je pri unetoj koncentraciji proteina od 150 mg/g nosača, dok je veća ponuđena koncentracija proteina (200 mg/g nosača) rezultirala neznatno nižom koncentracijom imobilisanih proteina (61,5 mg/g nosača). Prema tome, sasvim je izvesno da je pri koncentraciji od 150 mg/g nosača ostvaren maksimalni kapacitet za vezivanje enzima od 63 mg/g nosača na Lifetech™ ECR8409F nosač. Iako je primećen porast vezanih proteina skoro u celom ispitivanom opsegu, maksimalni prinos imobilizacije od 60 % je dobijen pri početnoj koncentraciji enzima od 50 mg/g nosača, nakon čega je usledio pad prinosa s obzirom na to da povećanje ponuđene koncentracije proteina nije dovelo do proporcionalnog porasta koncentracije vezanih proteina.



Slika 4.17. Uporedni prikaz koncentracije vezanih proteina i prinosa imobilizacije u zavisnosti od ponuđene koncentracije proteina

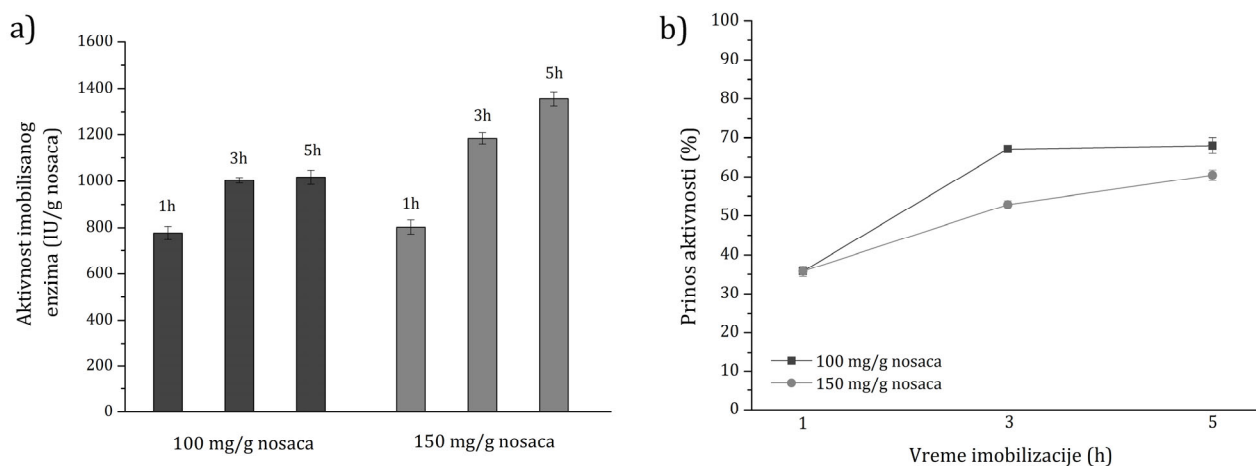
Kako je za imobilizaciju FT primenjen enzimski preparat koji predstavlja smešu različitih enzima, najvažniji kriterijumi za utvrđivanje optimalnih parametara imobilizacije FT su aktivnost i prinos aktivnosti. Uporedni prikaz promene pomenutih funkcija cilja u uslovima različitih koncentracija proteina je prikazan na slici 4.18.



Slika 4.18. Uticaj ponuđene koncentracije enzima na aktivnost i prinos aktivnosti imobilisane FT na Lifetech™ nosač sa amino grupama

Evidentno je da sa porastom ponuđene koncentracije proteina dolazi do povećanja aktivnosti imobilisane FT u celom ispitivanom opsegu, kao i da su visoke katalitičke aktivnosti u rasponu od 777 - 812 IU/g nosača dobijene pri koncentracijama ponuđenih proteina od 100 - 200 mg/g nosača. Međutim, ovim eksperimentalnim tačkama odgovaraju niži prinosi aktivnosti u poređenju sa najnižom ponuđenom koncentracijom proteina od 20 mg/g nosača gde je zabeležen izrazito visok prinos od 92 %. Iako je visoka vrednost prinosa aktivnosti, pri pomenutoj koncentraciji proteina, aktivnost imobilisane FT iznosi svega 275 IU/g nosača. U ovom momentu treba napraviti kompromis između smanjenja troškova imobilizacije i posledičnog povećanja ekonomske isplativosti procesa (srazmernog prinosu aktivnosti) ili veće proizvodne moći u cilju produkcije maksimalnih količina proizvoda (FOS) koja je srazmerna aktivnosti imobilisanog preparata. Nakon razmatranja oba parametra, s obzirom da je aktivnost FT pri većim unetim koncentracijama proteina značajno veća u odnosu na druge primenjene koncentracije, pri izboru optimalnog rešenja, dalje su detaljno sagledane koncentracije proteina 100, 150 i 200 mg/g nosača.

U ovom opsegu primenjenih koncentracija, iako su slične vrednosti aktivnosti imobilisanog enzima, značajno se razlikuje količina unetih proteina. Konkretno, pri koncentraciji proteina 100 mg/g nosača dobijena je FT aktivnost od 777 IU/g nosača, koja je niža za oko 4 % od maksimalne FT aktivnosti (812 IU/g nosača) dobijene pri duplo većoj unetoj koncentraciji proteina. Isto tako, i sa aspekta efikasnosti, koncentracija od 200 mg/g nosača se ne smatra poželjnom, jer je dobijen prinos aktivnosti od 27 % koji je u odnosu na preostale dve primenjene koncentracije dosta niži. Prema tome, da bi se napravio ispravan izbor odgovarajuće koncentracije (100 ili 150 mg/g nosača), u ovom momentu značajno je sagledati i efekat vremena imobilizacije na aktivnost i prinos aktivnosti FT. Sa slike 4.19. koja ilustruje zavisnost aktivnosti imobilisane FT pri različitim vremenima trajanja procesa u uslovima primenjenih koncentracija, jasno se uočava da vreme imobilizacije značajno može doprineti dobijanju imobilisanog preparata veće katalitičke aktivnosti.



Slika 4.19. Uticaj vremena imobilizacije na a) aktivnost i b) prinos aktivnosti imobilisane FT u uslovima različitih koncentracijama enzima

Naime, sa slike 4.19a je evidentno da duže trajanje procesa rezultira i većom aktivnošću, kao i da se maksimalne vrednosti aktivnosti od 1017 i 1355 IU/g nosača pri unetim koncentracijama proteina od 100 i 150 mg/g nosača, dobijaju nakon 5 h trajanja procesa. Dobijene rezultate aktivnosti prati i promena prinosa aktivnosti (slika 4.19b), pri čemu se sa predstavljenog grafika ne može tvrditi da je u slučaju primene veće koncentracije proteina nakon 5 h dostignut plato, već se može smatrati da produžavanjem trajanja imobilizacije, može doći do dodatnog povećanja prinosa. Sa druge strane, u slučaju koncentracije 100 mg/g nosača, primećuje se porast prinosa aktivnosti do 3 h, nakon čega prinos zadržava konstantnu vrednost. Svakako, variranjem ovog parametra omogućeno je povećanje katalitičke aktivnosti za čak 69 %, sa 802 na 1355 IU/g nosača, ali i prinosa aktivnosti sa 36 na 60,4 % za ponuđenu koncentraciju proteina od 150 mg/g nosača. Sagledavanjem i poređenjem dobijene aktivnosti FT u ovom slučaju sa ostvarenim aktivnostima FT dobijenim pod optimalnim uslovima primenom modifikovanih nanočestica (1448 IU/g nosača za AFNS i 1122 IU/g nosača za CCAFNS) sasvim je izvesno da pored toga što njihove dimenzije predstavljaju ograničavajući faktor za dalju primenu, ni ostvarene aktivnosti nisu ukazivale na njihovu superiornost.

Ovaj odličan rezultat ostvaren primenom nosača ECR8409F upućuje na mogućnost dobijanja imobilisanog preparata izuzetnog katalitičkog delovanja ukoliko se imobilizacija izvodi pri sledećim uslovima: pH 5,0, koncentracija proteina 150 mg/g nosača i vreme imobilizacije 5 h. U svrhu određivanja selektivnosti pri izabranim uslovima, određena je i pektinolička aktivnost imobilisanog preparata. Iako je sadržaj pektinaza dominantan u korišćenom preparatu Pectinex® Ultra SP-L, dobijena je niska aktivnost od svega 350,9 IU/g nosača u odnosu na FT aktivnost od 1355 IU/g nosača. Takođe i prinos aktivnosti je nizak i iznosi samo 3,9 % pa je skoro i zanemarljiv u poređenju sa prinosom aktivnosti FT od 60,4 %. Izračunavanjem odnosa prinosa aktivnosti koji odražava selektivnost procesa, dobijena je vrednost od 15,5. Ovakav rezultat koji ukazuje da je detaljnom optimizacijom moguće dobiti skoro trostruko veću selektivnost imobilisanog preparata, opravdava prethodan kompromisni izbor pH i navodi na zaključak da je i u uslovima pH 5,0 moguće postići ne samo izuzetnu aktivnost imobilisane FT već i selektivnost.

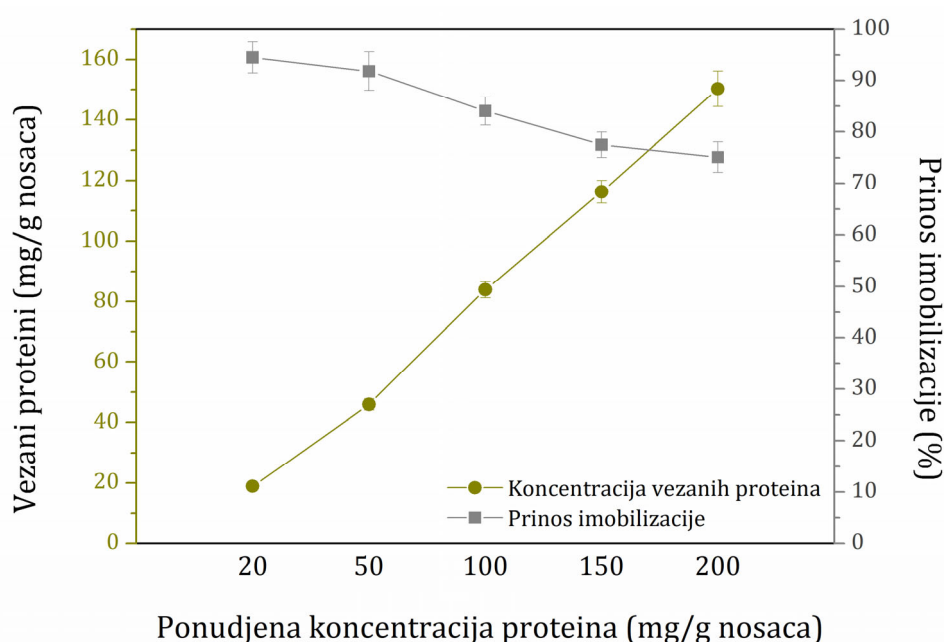
4.3.2.2. Optimizacija imobilizacije FT na ECR8285F Lifetech™ nosač

Pored nosača sa amino grupama, i nosač ECR8285F Lifetech™ se u preliminarnom eksperimentu pokazao pogodnim za procenu detaljnijeg vezivanja FT i posledičnog dobijanja imobilisanog preparata visoke katalitičke moći. Pored umereno hidrofobne površine, koja potiče od prisutnih nepolarnih butil grupa, ovaj nosač sadrži i epoksidne funkcionalne grupe, te se stoga njegovom primenom može realizovati kombinovano vezivanje u dva koraka, tj.

dolazi do adsorbovanja enzima uspostavljanjem hidrofobnih interakcija, i kasnijeg formiranja kovalentnih veza. Detaljnijom analizom uticaja ponuđene koncentracije proteina i trajanja imobilizacije, izvedena je optimizacija imobilizacije FT.

Prema literaturnim navodima, jonska jačina rastvora igra značajnu ulogu u favorizovanju hidrofobnih interakcija. Naime, u sistemima veće jonske jačine, dolazi do formiranja jačih hidrofobnih interakcija [283] između hidrofobnih funkcionalnih grupa nosača i enzima, dok je smanjena interakcija sa molekulima vode. Prema tome, u interesu podsticanja hidrofobnih interakcija, eksperimenti su izvedeni u puferском rastvoru pH 7,0 visoke jonske jačine (1 M). Iako epoksidne grupe mogu da reaguju u širokom opsegu pH sa različitim funkcionalnim grupama enzima, ovaj pH je izabran na osnovu saznanja da su u neutralnim uslovima veoma stabilne [284]. Takođe, ovaj pH je povoljan i sa aspekta hidrofobnih interakcija jer uglavnom molekuli u tim uslovima zadržavaju svoju hidrofobnu prirodu. Međutim, promena pH svakako može rezultirati i pojavom određene vrste naelektrisanja na enzimu, koja posledično mogu uticati i na intenzitet interakcija sa nosačem.

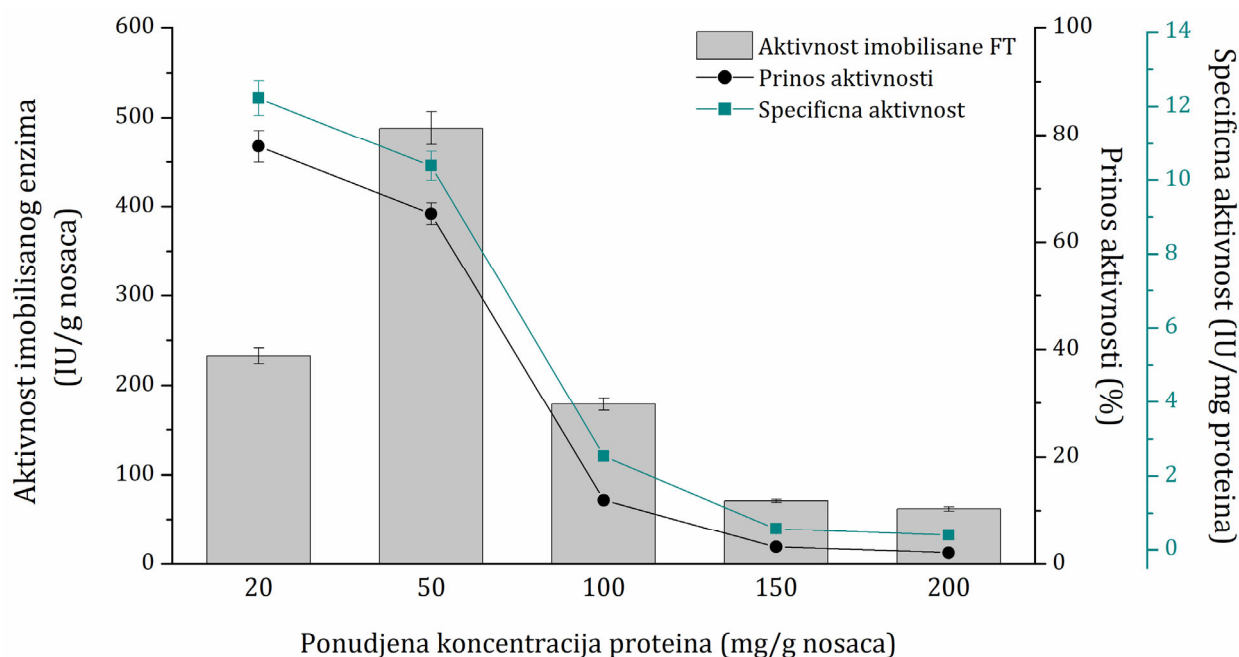
I u ovim eksperimentima, varirana je ponuđena koncentracija enzimskog preparata od 20 do 200 mg/g nosača, dok je vreme trajanja imobilizacije iznosilo 24 h. Rezultati koji opisuju proces imobilizacije enzima iz preparata Pectinex® Ultra SP-L su predstavljeni na slici 4.20. i ukazuju da sa povećanjem ponuđene koncentracije proteina skoro linearno raste i koncentracija vezanih proteina, čak do 150,2 mg/g nosača. Analizom prinosa imobilizacije može se primetiti da su veoma visoke vrednosti dobijene pri svim ispitanim koncentracijama, kao i da je najveći prinos od 94,5 % ostvaren pri najnižoj koncentraciji od 20 mg/g nosača. Pri koncentraciji od 50 mg/g nosača dolazi do zanemarljivog pada prinosa (91,8 %), dok se značajnije smanjenje uočava pri najvećoj unetoj koncentraciji od 200 mg/g nosača gde iznosi 75,1 %.



Slika 4.20. Uticaj ponuđene koncentracije enzima na koncentraciju vezanih proteina i prinos imobilizacije

Uspešnost imobilizacije FT se bliže može sagledati preko imobilisane aktivnosti, prinosa aktivnosti kao i specifične aktivnosti FT (slika 4.21). Uprkos tome što se koncentracija imobilisanih proteina linearno povećavala sa koncentracijom ponuđenih proteina, dijagram zavisnosti aktivnosti imobilisane FT i ponuđene koncentracije proteina pokazuje rastući trend aktivnosti do koncentracije 50 mg/g nosača, gde dostiže svoj maksimum od 488 IU/g nosača. U uslovima većih unetih koncentracija proteina, aktivnost opada za više od 63 %. Ova razlika u

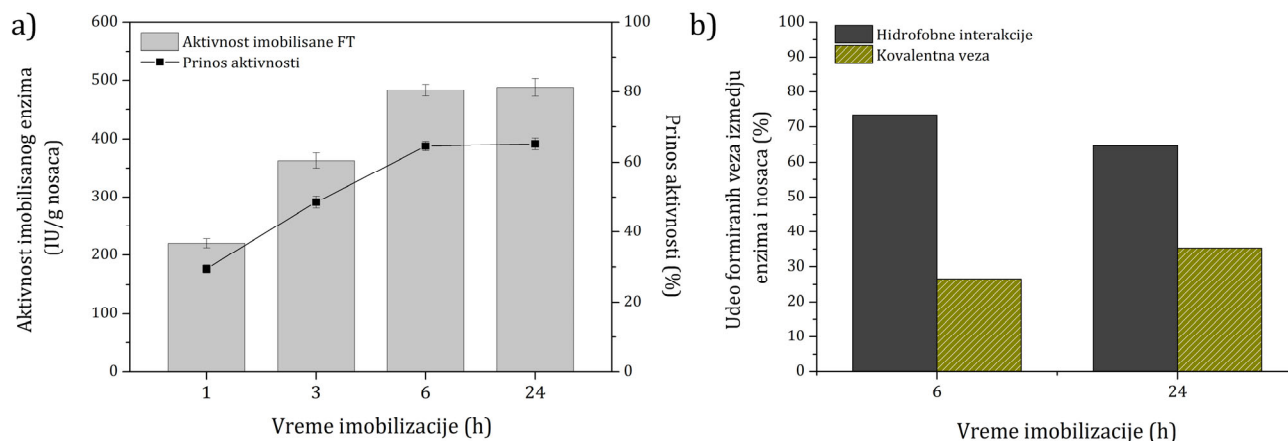
trendu promene koncentracije vezanih proteina i aktivnosti imobilisane FT ukazuje na to da je pri većim početnim koncentracijama proteina favorizovano vezivanje drugih enzima iz primenjenog preparata. Pored toga što je u ovim uslovima verovatno blokirano vezivanje ciljanog enzima za funkcionalne grupe nosača, niža katalitička aktivnost može biti i posledica otežanog prilaza supstrata aktivnom centru imobilisane FT usled postojanja sternih smetnji. Za potpuniju analizu i najadekvatniji izbor optimalne koncentracije, svakako treba sagledati i parametre koji najbolje opisuju katalitičku efikasnost imobilisanog preparata tj. prinos aktivnosti i specifičnu aktivnost. Sa slike 4.21. se može uočiti skoro identičan trend promene prinosa aktivnosti i specifične aktivnosti za ispitane koncentracije ponuđenih proteina. Najveće vrednosti prinosa aktivnosti od 77,9 %, ali i specifične aktivnosti od 12,2 IU/mg proteina su zabeležene pri koncentraciji 20 mg/g nosača, dok daljim povećanjem koncentracije dolazi do njihovog smanjenja. Konkretno, u uslovima koncentracije 50 mg/g nosača kojoj odgovara najveća aktivnost FT, vrednosti prinosa aktivnosti (65,3 %) i specifične aktivnosti (10,4 IU/mg proteina) ne odstupaju previše od maksimalnih, za razliku od 150 i 200 mg/g nosača, gde je prinos aktivnosti čak ispod 5 %, a specifična aktivnost niža za 94,5 %. Imajući ovo u vidu, koncentracija proteina od 50 mg/g nosača je izabrana za optimalnu i primenjena u narednim eksperimentima za utvrđivanje dužine trajanja imobilizacije.



Slika 4.21. Uticaj ponuđene koncentracije proteina na aktivnost, prinos aktivnosti i specifičnu aktivnost imobilisane FT na Lifetech™ nosač sa epoksidnim grupama

Sa slike 4.22a, koja ilustruje promenu aktivnosti imobilisane FT sa vremenom imobilizacije, uočava se povećanje aktivnosti sve do 6 h i iznosi 483 IU/g nosača, dok nakon toga imobilisani preparat zadržava skoro konstantnu vrednost do 24 h. Sagledavanjem prinosa aktivnosti, uočava se sasvim očekivano identičan trend promene gde je nakon 6 h prinos 64,6 %, a potom ostaje nepromenjen. Treba imati na umu cilj ove disertacije, ali i svakog biotehnološkog procesa koji je usmeren ka razvijanju ekonomičnih postupaka, ne samo sa aspekta materijalnih troškova, već i troškova energije koji zavise od dužine trajanja. Pored neznatne razlike u vrednostima aktivnosti i prinosa aktivnosti za 6 i 24 h, izborom kraćeg vremena imobilizacije, bila bi omogućena ušteda vremena od čak 18 h. Međutim, imajući u vidu da je reč o nosaču koji pruža mogućnost uspostavljanja kovalentnih veza, kao i da je za njihovo formiranje najčešće potrebno duže vreme imobilizacije, u ovom momentu pri izboru optimalnog vremena treba sagledati i zastupljenost vrsta veza u imobilisanom preparatu.

U tom kontekstu, izvedeni su dodatni eksperimenti za potrebe određivanja prisutnih interakcija između molekula FT i epoksi/butil funkcionalizovanog ECR8285F Lifetech™ nosača. Imobilisani preparat FT je tretiran rastvorom CaCl_2 radi narušavanja slabih elektrostatičkih interakcija (ukoliko postoje), a zatim i surfaktantom (Triton X-100) kako bi se iniciralo narušavanje i hidrofobnih interakcija. Zadržana aktivnost nakon korišćenja pomenutih rastvora je posledica formiranih kovalentnih veza između enzima i nosača. Dobijeni rezultati desorpcionih eksperimenata prikazani na slici 4.22b ukazuju da nakon 6 h dolazi do formiranja hidrofobnih interakcija, a verovatno i vodoničnih veza, slabih Van der Valsovih sila kao i slabih jonskih interakcija koje su zastupljene sa 73,4 %, dok je nakon 24 h, udeo ovih interakcija iznosio 64,75 %. Zapravo, na račun smanjenja pomenutih interakcija, dolazi do povećanja udela kovalentnih veza, sa 26,60 na 35,25 %. Na osnovu ostvarenog procentualnog povećanja od 32,5 %, može se konstatovati da produženje perioda inkubacije može promovisati formiranje kovalentnih veza. Usled postojanja optimalne ravnoteže prisutnih epoksidnih i butil grupa ECR8285 nosača preko kojih je omogućeno kombinovano vezivanje FT, pored formiranih stabilnih kovalentnih veza, u ovom slučaju je ipak dominantnije stvaranje hidrofobnih interakcija. Međutim, zbog većeg udela kovalentnih veza, a samim tim i dobijanja imobilisanog preparata veće stabilnosti, vreme imobilizacije od 24 h je izabrano kao optimalno vreme za dalju primenu.



Slika 4.22. Uticaj vremena imobilizacije na a) aktivnost imobilisane FT na Lifetech™ nosač sa epoksidnim grupama b) zastupljenost formiranih veza između enzima i nosača

Pod utvrđenim optimalnim parametrima imobilizacije FT iz Pectinex® Ultra SP-L na metakrilatni nosač iz Lifetech™ serije ECR8285F koji uključuju koncentraciju proteina od 50 mg/g nosača i vreme imobilizacije 24 h u 1 M puferском rastvoru pH 7,0 ispitana je i pektinolička aktivnost s namerom procene selektivnosti. Pored aktivnosti FT od 488 IU/g nosača, u pomenutim uslovima vrednost pektinoličke aktivnosti iznosi samo 68,2 IU/g nosača. Dobijenu aktivnost prati i veoma niska vrednost prinosa aktivnosti od 2,25 %. Vrednost odnosa prinosa aktivnosti ima vrednost od 29 i upućuje na izrazito vezivanje FT u poređenju sa pektinazama iz primenjenog komercijalnog preparata.

Iz priloženih rezultata može se sumirati da su detaljnim optimizacijama dobijena dva imobilisana preparata FT koje odlikuje različit tip interakcija, ali i katalitička aktivnost (tabela 4.4).

Tabela 4.4. Prikaz izabranih optimalnih uslova za izvodjenje selektivne imobilizacije FT na nosače iz Lifetech™ serije

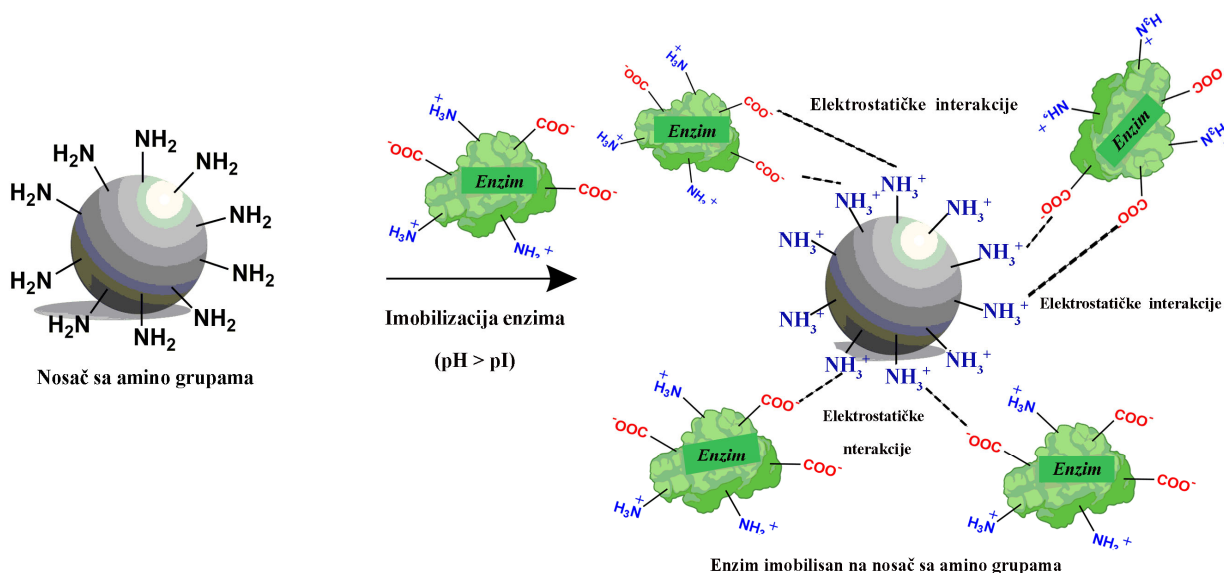
Nosač	pH	Vreme imob. (h)	Konc. proteina (mg/g nosača)	Aktivnost FT (IU/g nosača)	Selektivnost
ECR8409F	5,0; 0,1 M	5	150	1355	15,5
ECR8285F	7,0; 1 M	24	50	488	29

Naime, primena metakrilatnih nosača Lifetech™ ECR8409F i ECR8285F je rezultirala dobijanjem imobilisanih preparata aktivnosti FT od 1355 i 488 IU/g nosača, redom. Iako prvi nosač rezultira većom aktivnošću, u ovom slučaju je ostvareno vezivanje FT preko slabih elektrostatičkih interakcija za koje se pouzdano zna da su manje poželjne za industrijske procese zbog posledičnog spiranja enzima sa nosača. Drugi primenjeni nosač daje nižu aktivnost FT, ali se smatra stabilnijom varijantom zbog prisutnih hidofobnih interakcija i kovalentnih veza. Stoga, izbor imobilisanog preparata zavisi od daljih koraka primene. U ovom momentu, mikro dimenzije korišćenih nosača, ali i podatak da nosač ECR8285F odlikuje niska mehanička stabilnost čime je posledično podložniji abraziji, predstavljaju ograničavajuće faktore za dalju procenu primene u reaktorskim konfiguracijama dostupnim na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju radi dobijanja FOS. Kako je jedan od ciljeva ove doktorske disertacije razvijanje stabilnih i katalitički aktivnih imobilisanih preparata FT radi implementiranja i sinteze FOS u reaktorskim sistemima, u nastavku će polimetakrilatni nosač većih dimenzija - Purolite® A109 biti primenjen i ispitan najpre za vezivanje FT, a potom i za realizaciju reakcije u pojedinim reaktorskim konfiguracijama.

4.3.3. Imobilizacija FT na Purolite® A109 nosač

Pored čestica nano i mikro dimenzija, FT iz komercijalnog preparata Pectinex® Ultra SP-L dobijenog iz *A. aculeatus* je imobilisana i na makroporozni nosač Purolite® A109 u cilju razvijanja jednostavnog protokola selektivne imobilizacije pogodnog za industrijsku primenu. Ovu polistirensku jonoizmenjivačku smolu odlikuje odlična hemijska i termička stabilnost [285]. Takođe, postoji u formi kuglica prečnika 425-1000 μm što obezbeđuje na dobre hidrodinamičke karakteristike, a smatra se pogodnom i za primenu u različitim reaktorskim konfiguracijama [286].

Purolite® A109 sadrži primarne amino grupe pa se samim tim vezivanje FT može ostvariti uspostavljanjem elektrostatičkih interakcija između pozitivno naelektrisanih amino grupa nosača i negativno naelektrisanih karboksilnih grupa enzima (slika 4.23). Izvođenjem ovog procesa u uslovima niske jonske jačine moguće je favorizovati adsorpciju, a primenom puferskih rastvora čiji je pH veći od pI FT (3,8-4,2) može se uticati na deprotonizaciju strukturnih aminokiselina enzima i preovladavanja funkcionalnih grupa sa negativnim naelektrisanjem.

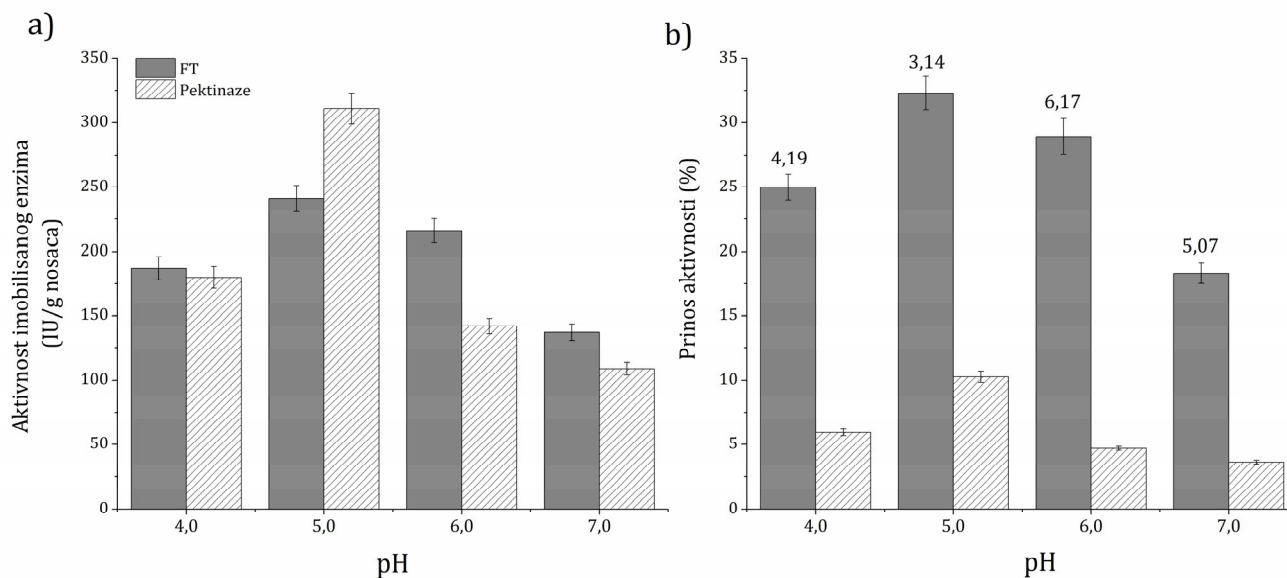


Slika 4.23. Šematski prikaz imobilizacije enzima adsorpcijom koja se ostvaruje uspostavljanjem elektrostatičkih interakcija između površinskih grupa enzima i nosača

4.3.3.1. Optimizacija selektivne imobilizacije FT na Purolite® A109 nosač

Optimizacija selektivne imobilizacije FT na komercijalni nosač Purolite® A109 je izvedena variranjem ključnih parametara imobilizacije poput pH, vremena imobilizacije i koncentracije proteina. Imajući u vidu da komercijalni preparat Pectinex® Ultra-SP-L predstavlja kompleksan enzimski preparat sa dominantnom aktivnošću pektinaza [287, 288], optimizacija je izvedena praćenjem dva ciljana izlaza koji uključuju aktivnost imobilisane FT i prinos aktivnosti za FT i pektinaze. Kao mera selektivnosti, posmatran je takođe odnos prinosa aktivnosti oba navedena enzima. Da bi se postigla selektivna imobilizacija FT, bez uvođenja dodatnih koraka prečišćavanja kao što je prethodno objavljeno u literaturi [126], neophodno je definisati najpogodniji medijum za proces imobilizacije. U tu svrhu, imobilizacija je ispitana u pH opsegu 4,0-7,0, pod pretpostavkom da će određeni enzimi imati različitu sklonost ka pozitivno naelektrisanom amino-funkcionalizovanom nosaču (Purolite® A109). Prema tome, selektivnost bi trebalo obezbediti podešavanjem pH sredine za imobilizaciju.

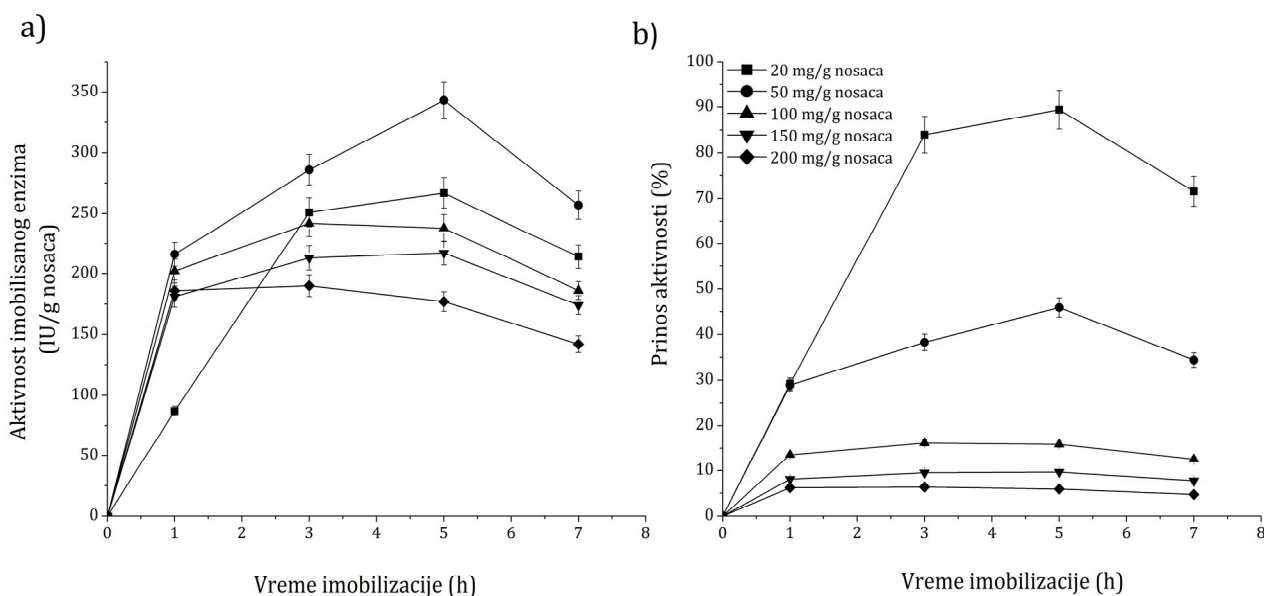
Ispitivanjem uticaja ovog parametra pri nepromenjenoj koncentraciji proteina (50 mg/g nosača) i vremena imobilizacije (1 h) i sagledavanjem ostvarenih rezultata prikazanih na slici 4.24a, može se videti da je maksimalna aktivnost imobilisane FT od 241 IU/g nosača postignuta na pH 5,0, dok je neznatno niža dobijena na pH 6,0 (216 IU/g nosača). U slučaju pektinaza, maksimalna aktivnost od 311 IU/g nosača postignuta je pri pH 5,0. Ipak, kada se uporede postignute imobilisane aktivnosti na pH 5,0 i pH 6,0, može se primetiti da u slučaju FT postoji blagi pad aktivnosti (sa 241 IU/g nosača na 216 IU/g nosača) za razliku od pektinaza, gde se može primetiti nagli pad (sa 311 IU/g nosača na 142 IU/g nosača).



Slika 4.24. Uticaj pH na: a) aktivnost imobilisane FT i pektinaza i b) prinos aktivnosti. Brojevi iznad stubičastog grafikona definišu ostvarenu selektivnost. Proces imobilizacije je izveden primenom početne koncentracije proteina od 50 mg/g nosača u trajanju od 1 h u različitim puferskim rastvorima (pH 4,0-7,0, 0,1 M) na 25 °C.

Ovi rezultati sugerišu da je pri pH 6,0, zbog primetno niže aktivnosti pektinaza u odnosu na FT, selektivnost imobilizacije dostigla svoj maksimum. U slučaju analize prinosa aktivnosti (slika 4.24b), može se primetiti da je imobilizacija FT daleko efikasnija u odnosu na imobilizaciju pektinaza. Ukoliko detaljno analiziramo ostvarene prinose u dva najpovoljnija medijuma za imobilizaciju, prinos aktivnosti FT pri pH 5,0 i pH 6,0 je 32,3 % i 28,9 %, a pektinaza 10,3 % i 4,7 %, redom. Izračunavanjem odnosa prinosa aktivnosti FT i pektinaza radi procene selektivnosti, dobijen je dvostruko veći odnos (6,17) pri pH 6,0 u poređenju sa pH 5,0 (3,14). S obzirom da je veća selektivnost ostvarena na račun malog smanjenja (10 %) aktivnosti imobilisane FT, pH 6,0 je izabran kao optimalni parametar za izvođenje daljih eksperimenata. Važno je istaći da su drugi autori prijavili veoma skromne prinose aktivnosti za adsorpciju FT [126, 185], a kao objašnjenje za takvo ponašanje navodi se uspostavljanje interakcija preko grupa koje su povezane sa aktivnim centrom enzima i onima odgovornim za održavanje tercijarne strukture enzima [126].

U narednom setu eksperimenata, u cilju unapređenja procesa imobilizacije i dobijanja imobilisanog enzima veće aktivnosti, ispitan je uticaj koncentracije proteina (20 - 200 mg/g nosača) i vremena imobilizacije (1-7 h). Profili promene aktivnosti FT pri različitim primenjenim koncentracijama proteina i vremenima trajanja imobilizacije prikazani su na slici 4.25a. Sa slike se jasno uočava da maksimalna aktivnost FT od 343 IU/g nosača odgovara koncentraciji proteina od 50 mg/g nosača i vremenu imobilizacije od 5 h.



Slika 4.25. Uticaj ponuđene koncentracije proteina i vremena imobilizacije na: a) aktivnost (IU/g nosača) imobilisane FT i b) prinos aktivnosti (%). Proces imobilizacije je izveden u puferu niske jonske jačine čiji je pH 6,0 pri različitim koncentracijama proteina i vremenima imobilizacije na 25 °C.

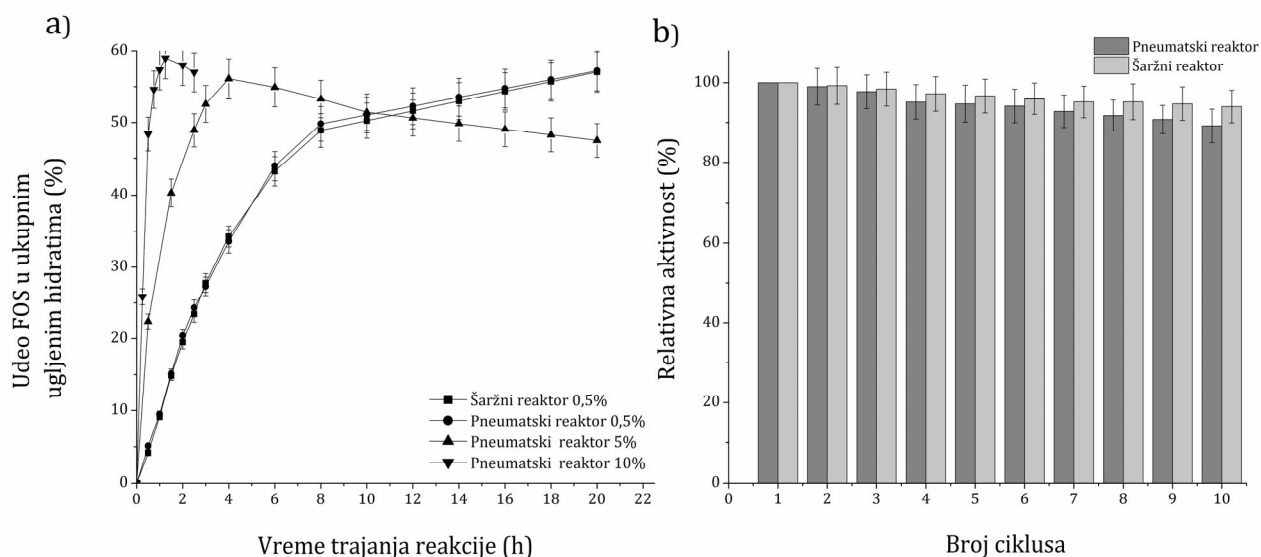
U poređenju sa maksimalnom aktivnošću iz prve eksperimentalne serije (241 IU/g nosača), evidentno je da ovim korakom dolazi do značajnog povećanja aktivnosti od čak 42 %. Posmatrajući vreme imobilizacije od 5 h, primetno je da je pri koncentraciji proteina od 20 mg/g nosača, postignuta niža aktivnost, što je i očekivano zbog manje dostupnosti enzima. Štaviše, pad FT aktivnosti primećen je i u eksperimentima gde su korišćene veće koncentracije proteina (100, 150 i 200 mg/g nosača). Naime, u slučaju koncentracija proteina 100 i 150 mg/g nosača maksimalna aktivnost je postignuta nakon 3 h, dok je u slučaju koncentracije 200 mg/g nosača ovaj efekat primećen nakon 1 h imobilizacije. Ovakav efekat veće koncentracije proteina na dobijenu aktivnost nije neočekivan i može se pripisati gusto vezanim molekulima proteina koji sprečavaju pristup supstrata aktivnom centru enzima. Pored toga, imajući na umu i heterogen sastav enzimskog preparata, vrlo je verovatno da pri visokim koncentracijama preparata, i drugi enzimi (uglavnom pektinaze) zauzimaju mesto oko nosača čime ometaju vezivanje ciljanog enzima. Ova pretpostavka je potvrđena izvođenjem dodatnih eksperimenata koji uključuju ispitivanje pektinolitičke aktivnosti. Imobilisani preparati su pokazali nepovoljnije odnose aktivnosti pri većoj ponuđenoj koncentraciji proteina od 150 mg/g nosača (109 IU/g nosača za pektinaze i 212 IU/g nosača za FT) u poređenju sa ostvarenim odnosima aktivnosti pri koncentraciji proteina od 50 mg/g nosača (70 IU/g nosača za pektinaze i 343 IU/g nosača za FT). Kako se proces imobilizacije FT na Purolite® A109 zasniva na adsorpciji, smanjenje aktivnosti pri vremenu imobilizacije od 7 h, u čitavom opsegu ispitivanih koncentracija, može se pripisati desorpciji do koje može doći tokom produženog procesa imobilizacije.

Sa druge strane, efekat ponuđene koncentracije proteina na prinos aktivnosti prikazan je na slici 4.25b. Može se uočiti da povećanje koncentracije proteina dovodi do drastičnog smanjenja prinosa aktivnosti FT kao i da je najveća vrednost prinosa aktivnosti (89,4 %) postignuta pri koncentraciji od 20 mg/g nosača nakon 5 h imobilizacije što odgovara aktivnosti od 267 IU/g nosača. Međutim, pod uslovima 50 mg/g nosača, 5 h vreme imobilizacije koji odgovaraju najvišoj aktivnosti FT od 343 IU/g nosača, dobijen je prinos aktivnosti od 45,9 %. U ovoj situaciji, pri izboru optimalnog parametra potrebno je sagledati dva aspekta. Produktivnost, sa jedne i efikasnost, sa druge strane. U pogledu produktivnosti, prednost treba

dati maksimalnoj aktivnosti, dok u pogledu efikasnog korišćenja enzimskog preparata, relevantan je prinos aktivnosti. Iako su produktivnost i efikasnost komplementarne veličine, jer se teži ka postizanju maksimalnih rezultata uz minimalne gubitke, akcenat ove doktorske disertacije je ipak na razvijanju procesa koji rezultiraju većim kapacitetom proizvodnje (dobijanje većih količina FOS), pa su stoga koncentracija 50 mg/g nosača i vreme imobilizacije od 5 h izabrani za optimalne parametre. U pomenutim optimalnim uslovima, pektinolička aktivnost iznosila je 70 IU/g nosača, dok je prinos aktivnosti iznosio samo 2,3 %. Značajne razlike u dobijenim vrednostima pektinaza, u poređenju sa vrednostima aktivnosti (343 IU/g nosača) i prinosa aktivnosti FT (45,9 %), kao i odnos prinosa aktivnosti (20), ukazuju na visoku efikasnost i selektivnost imobilizacije FT primenom makroporoznog nosača Purolite® A109. Ovim pristupom koji je imao za cilj optimizaciju procesa imobilizacije, omogućeno je delimično prečišćavanje FT iz komercijalnog preparata uz isključenje upotrebe dodatnih hemikalija i povećane potrošnje vremena, čineći proces ekonomičnijim. Od značaja je istaći da se imobilisani preparat dobijen pod prethodno utvrđenim optimalnim uslovima (pH 6,0, 50 mg/g nosača i 5 h) zbog visoke selektivnosti i niske pektinoličke aktivnosti može direktno primeniti ne samo u homogenom rastvoru saharoze radi produkcije FOS, već i u proizvodima heterogenog sastava (džem, sok, javorov sirup i dr.) sa visokim udelom saharoze, bez značajnog uticaja na inicijalne karakteristike proizvoda.

4.3.3.2. Primena imobilisanog preparata FT na nosač Purolite® A109 u šaržnom i pneumatskom reaktoru

Po utvrđivanju optimalnih uslova procesa selektivne imobilizacije FT na makroporozni nosač Purolite® A109 koja se zasniva na adsorpciji, u narednoj fazi istraživanja procenjena je efikasnost dobijenog imobilisanog preparata u reakciji sinteze FOS u dva reaktorska sistema – šaržnom (erlenmajer na tresilici) i pneumatskom (air-lift) reaktoru. Najpre je primenjen imobilisani preparat u koncentraciji od 0,5 % (w/v) koja je ekvivalentna koncentraciji rastvornog enzima od 1 % (v/v), a dobijeni profili sintetisanih FOS su prikazani na slici 4.26a. Sa slike se jasno uočava da su slične progresne krive sinteze FOS za oba primenjena reaktorska sistema, kao i da je skoro identičan maksimalni udeo ukupnih FOS od 57 % (oko 285 g/L) postignut nakon 20 h trajanja reakcije. Slične vrednosti ostvarenih udela FOS u ukupnim ugljenim hidratima (55-61 %) postignute su i u prethodnim istraživanjima [126, 174, 175]. Nakon dokazivanja visoke efikasnosti dobijenog imobilisanog preparata u pomenutim reaktorima, u sledećoj seriji eksperimenata ispitana je i njegova operativna stabilnost. Naime, ovaj parametar je ispitan u cilju procene potencijala primene imobilisanog enzima ne samo u izvođenju serijske proizvodnje koja se zasniva na izvođenju reakcija u odvojenim ciklusima, već i sa ciljem kontinualnog razvoja procesa bez značajnog gubitka aktivnosti. Sa slike 4.26b se može videti da imobilisana FT na Purolite® A109 poseduje potencijal ponovne upotrebe u oba reaktorska sistema, s obzirom na to da su nakon izvođenja deset uzastopnih ciklusa reakcija (vreme trajanja jednog ciklusa je 20 h), zadržane aktivnosti u šaržnom i pneumatskom reaktoru iznosile 94 % i 89 %, redom. Neznatan pad aktivnosti, koji je nešto izraženiji pri izvođenju reakcija u pneumatskom reaktoru, potencijalno bi se mogao pripisati curenju enzima iz nosača (zbog prisustva slabih jonskih interakcija).



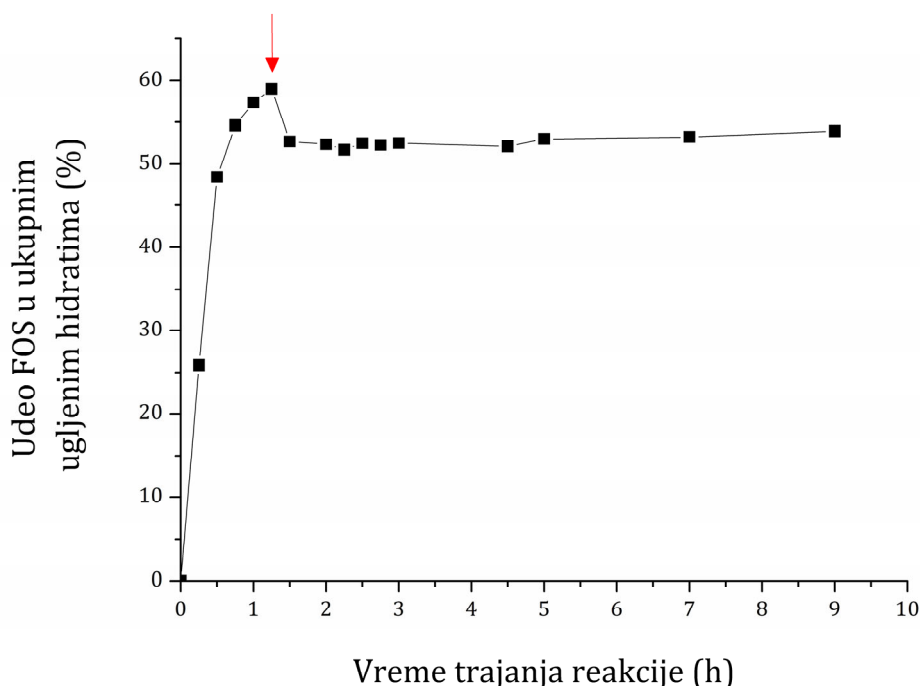
Slika 4.26. a) Uporedni prikaz sinteze FOS korišćenjem 0,5 % (w/v), 5 % (w/v) i 10 % (w/v) imobilisanog preparata FT u šaržnom i pneumatskom reaktoru. b) Operativna stabilnost imobilisanog preparata (0,5 % (w/v)) u šaržnom i pneumatskom reaktoru.

Do gubitka enzima može doći usled filtracije i ispiranja nosača puferom nakon završetka svakog ciklusa [289], pošto merljiv sadržaj proteina nije detektovan u reakcionoj smeši. Takođe, s obzirom da je Purolite® A109 makroporozan nosač, može se pretpostaviti i da su površinski vezani enzimi verovatno bili odvojeni od nosača, dok su enzimi vezani unutar pora ostali imobilisani [289]. Uprkos tome, dobijeni rezultati jasno pokazuju da primenjeni imobilisani preparat ima izuzetnu operativnu stabilnost, kao i da poseduje potencijal za kontinualnu katalizu reakcija bez značajnog gubitka aktivnosti. Poređenjem dobijenih podataka predstavljenih u ovoj doktorskoj disertaciji sa vrednostima iz naučne literature dolazi se do saznanja da je operativna stabilnost dobijenog imobilisanog enzima više uporediva sa stabilnošću kovalentno imobilisanih nego sa adsorbovanim enzimima. Na primer, FT iz *Aspergillus oryzae* IPT-301 imobilisana adsorpcijom na silika gelu zadržala je samo 33 % početne aktivnosti nakon šest reakcionih ciklusa [289], dok je FT iz Pectinex® Ultra SP-L imobilisana na jonoizmenjivačku smolu Amberlite IRA900 Cl zadržala oko 80 % početne aktivnosti nakon dvanaest ciklusa s tim da je trajanje svakog ciklusa iznosilo 2 h [185]. Sa druge strane, FT iz Pectinex® Ultra SP-L je kovalentno imobilisana na Fe₃O₄-magnetne nanočestice pri čemu je dobijen imobilisani preparat koji je zadržao 86 % početne aktivnosti nakon šestog ciklusa reakcije u trajanju od 1 h [179]. Stoga se može zaključiti da FT imobilisana adsorpcijom na Purolite® A109 ima visok kapacitet ponovne upotrebe, iako je predložena jednostavna i neinvazivna metoda imobilizacije.

Shodno prikazanim rezultatima, sasvim je opravdano ispitati i podobnost primene imobilisanog preparata u reakciji sinteze FOS u kontinualnom režimu rada. Realizacija kontinualne produkcije FOS u pneumatskom reaktoru bi najpre uključivala izvođenje sinteze FOS u šaržnom režimu rada do dobijanja maksimalnog prinosa, a potom uvođenje supstrata i odvođenje proizvoda. S tim u vezi, u cilju smanjenja vremena dostizanja maksimalnog prinosa FOS, u narednom setu eksperimenata ispitana je mogućnost korišćenja značajno većih koncentracija imobilisanog enzima (5 % i 10 % (w/v)) (slika 4.26a). Iz prikazanih rezultata može se uočiti je da je uvođenje većih koncentracija imobilisanog preparata FT rezultiralo povećanjem brzine reakcije. Tačnije, maksimalni udeo FOS u ukupnim ugljenim hidratima od 56 % je postignut nakon 4 h reakcije primenom koncentracije 5 % (w/v), dok je koncentracija imobilisanog enzima od 10 % (w/v) dala 59 % FOS nakon 1 h i 15 min. Prema tome, može se zaključiti da je primena većih koncentracija imobilisanog preparata rezultirala značajnim

smanjenjem vremena potrebnog za postizanje maksimalnih prinosa (sa 20 h u prvom eksperimentu na 1 h i 15 min). Stoga, koncentracija imobilisanog enzima od 10 % (w/v) je upotrebljena za ispitivanje mogućnosti izvođenja kontinualne proizvodnje FOS (slika 4.27).

Realizacija kontinualnog procesa je najpre podrazumevala sintezu FOS u šaržnom režimu rada u trajanju od 1,25 h, a zatim kontrolisano uvođenje supstrata i istovremeno odvođenje proizvoda pri protoku od 2,5 mL/min čime je započet kontinualni režim rada. Prelazak na kontinualni režim rada rezultirao je blagom promenom sastava reakcione smeše do uspostavljanja konstantnog toka proizvodnje u kome je zabeležen udeo FOS u ukupnim ugljenim hidratima od 53 % tokom 9 h. Po završetku procesa reakciona smeša se sastojala od FOS 3 (~29 %), FOS 4 (~20 %) i FOS 5 (~4 %). Pored toga što je zabeležen blagi pad FOS (sa 59 na 53 %), brojne prednosti kontinualne proizvodnje (veća produktivnost, smanjenje troškova i dr.) potpuno opravdavaju realizaciju ovih procesa [290].



Slika 4.27. Prikaz kontinualne proizvodnje FOS u pneumatskom reaktoru. Crvena strelica označava početak kontinualnog režima rada tj. uvođenja supstrata (rastvor saharoze koncentracije 500 g/L) u sistem.

Slične konverzije su prijavljene i od strane drugih autora u slučaju primene imobilisane FT za izvođenje kontinualne produkcije u drugim reaktorskim konfiguracijama. Na primer, FT iz Pectinex® Ultra SP-L, zarobljena u kuglicama kalcijum-alginatnog gela, veoma je uspešno korišćena za kontinualnu proizvodnju FOS u bioreaktoru sa fiksnim slojem [183] rezultirajući prinosom FOS od približno 46 %. Kada je u pitanju primena vazdušnog reaktora u ove svrhe, postoje podaci da su Lin i Li [197] izveli reakciju sinteze FOS, ali u šaržnom režimu rada korišćenjem imobilisanih celih ćelija *A. japonicus* u trajanju od 9 h i prijavili prinos FOS od 55 %. Prema tome, može se zaključiti da proces razvijen u okviru ove doktorske disertacije koji se zasniva na kontinualnoj proizvodnji FOS u pneumatskom reaktoru primenom FT imobilisane na Purolite® A109 i koji rezultira smešom sa udelom FOS od 53 %, poseduje potencijal za prenos i dalju optimizaciju procesa koji bi bili prilagođeni industrijskim uslovima.

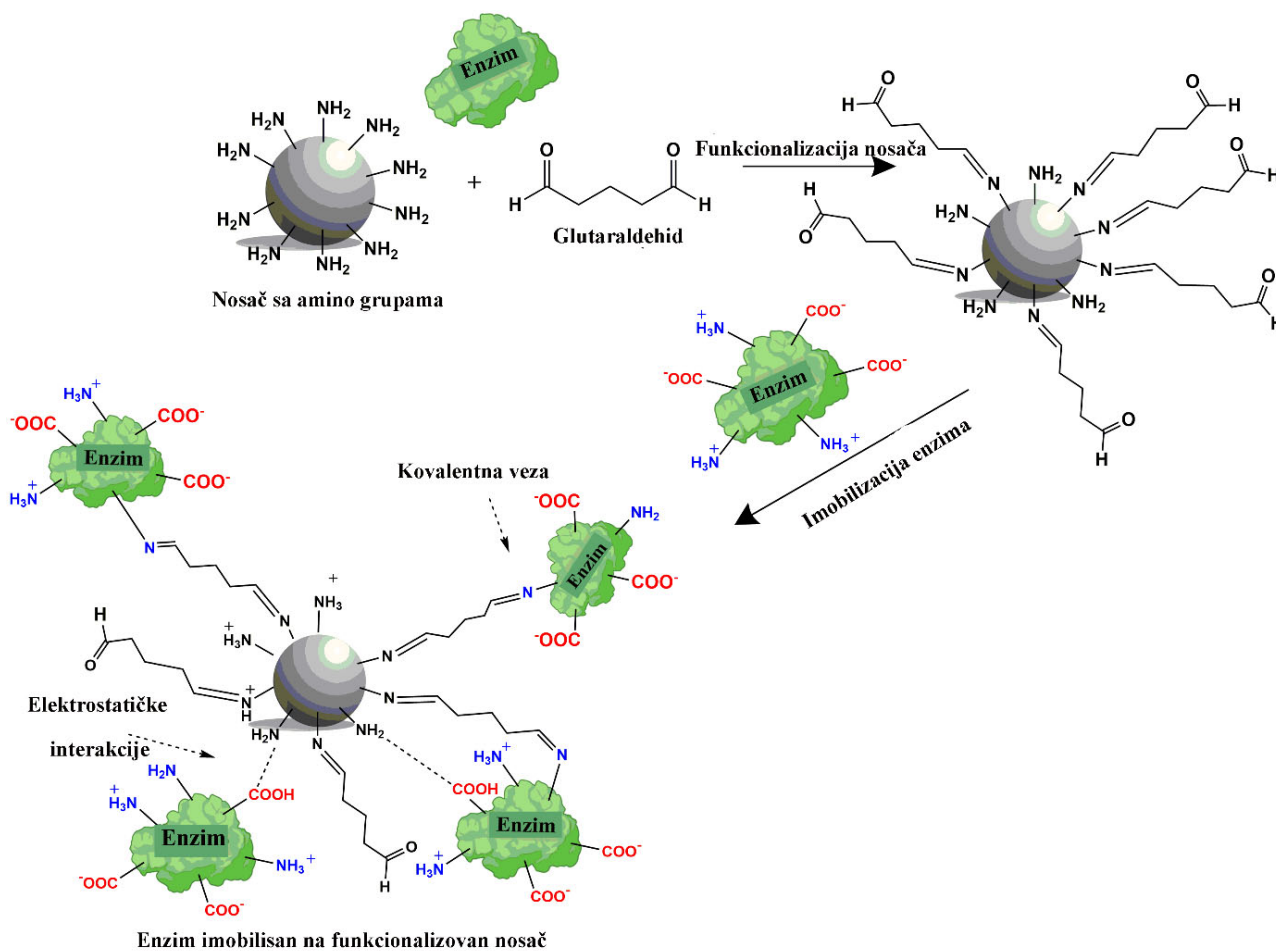
4.3.4. Imobilizacija FT na modifikovane nosače Purolite® A109

Sama priroda makroporoznog nosača Purolite® A109 pruža mogućnost uspostavljanja jonskih interakcija sa suprotno naelektrisanim grupama enzima čime je favorizovana adsorpcija. Međutim, primena različitih bifunkcionalnih agenasa može dovesti do njegove modifikacije uvođenjem novih grupa koje mogu učestvovati u formiranju kovalentne veze sa različitim funkcionalnim grupama enzima. Za razliku od adsorpcije, kovalentna imobilizacija obezbeđuje formiranje hemijske veze između enzima i nosača, te stoga ima za cilj i dobijanje veoma stabilnog imobilisanog preparata [291]. Funkcionalne grupe enzima preko kojih se uglavnom uspostavlja kovalentna veza su najčešće bočne amino grupe aminokiseline lizin, tiolne grupe koje su sastavni deo cisteina i karboksilne grupe koje potiču od asparaginske i glutaminske kiseline. Pored pomenutih, hidroksilna, fenolna, indol i imidazol grupa takođe mogu učestvovati u formiranju kovalentne veze sa nosačem [291].

Da bi se obezbedio adekvatan nosač za dobijanje aktivnog i stabilnog (kovalentnog) imobilizovanog preparata FT, izvedena je hemijska modifikacija makroporozne polistirenske jonoizmenjivačke smole sa primarnim amino grupama (Purolite® A109). U tu svrhu primenjeni su glutaraldehid (GA) radi uvođenja aldehidnih grupa i epihlorhidrin (EP) za dobijanje epoksi-funkcionalizovanih nosača. U poređenju sa komercijalnim nosačima koji su uglavnom homogene prirode (sadrže isključivo jednu vrstu funkcionalnih grupa), ovim pristupom se mogu dobiti heterofunkcionalni nosači koji potencijalno mogu i dodatno unaprediti stabilnost imobilisanog enzima. Stoga, u nastavku su prikazane detaljne optimizacije imobilizacije FT iz komercijalnog preparata Pectinex® Ultra SP-L na GA- i epoksi-heterofunkcionalne nosače Purolite® A109. Praćenjem pektinolitičke aktivnosti, procenjena je i mogućnost izvođenja selektivne imobilizacije FT.

4.3.4.1. Optimizacija selektivne imobilizacije FT na GA-aktivirane nosače Purolite® A109

Pored toga što GA odlikuje niska stabilnost pri različitim temperaturama i alkalnom pH, ovaj bifunkcionalni molekul koji sadrži aldehidnu grupu se široko koristi za modifikaciju nosača, zbog niske cene i jednostavnog izvođenja reakcije [292], iako mehanizam ove aktivacije, još uvek nije u potpunosti razjašnjen. Međutim, preciznom kontrolom uslova modifikacije nosača (koncentracije GA, vremena trajanja i pH) [293], moguće je imati ciljanu modifikaciju prisutnih amino grupa. Naime, pretpostavlja se da korišćenje niskih koncentracija GA za relativno kratko vreme modifikacije dovodi do toga da nosač poseduje samo jedan molekul GA po amino grupi (slika 4.28), za razliku od primene većih koncentracija GA koje rezultiraju posedovanjem dva molekula GA po amino grupi. Prema tome, primena GA može dovesti do stvaranja strukturno različitih aktiviranih nosača kod kojih GA može biti u formi monomera ili dimera [294]. Osim aldehidne funkcionalne grupe, dobijeni GA-aktivirani nosač još uvek ima neaktivirane amino grupe ispod svakog molekula GA, ali i hidrofoban deo koji potiče od lanca GA, pa se može smatrati heterofunkcionalnim nosačem [161, 293]. Imajući ovo u vidu, do imobilizacije enzima može doći preko različitih interakcija poput jonskih, hidrofobnih i kovalentnih, a podešavanjem uslova sredine (jonske jačine rastvora) može se uticati na njihovu dominantnost [293]. Izvođenjem imobilizacije FT u uslovima niske jonske jačine, najverovatnije će doći do uspostavljanja jonskih interakcija između pozitivno naelektrisanih primarnih amino grupa nosača i negativno naelektrisanih karboksilnih grupa enzima [295], a zatim i kovalentnih veza između funkcionalne grupe GA i enzima [293].



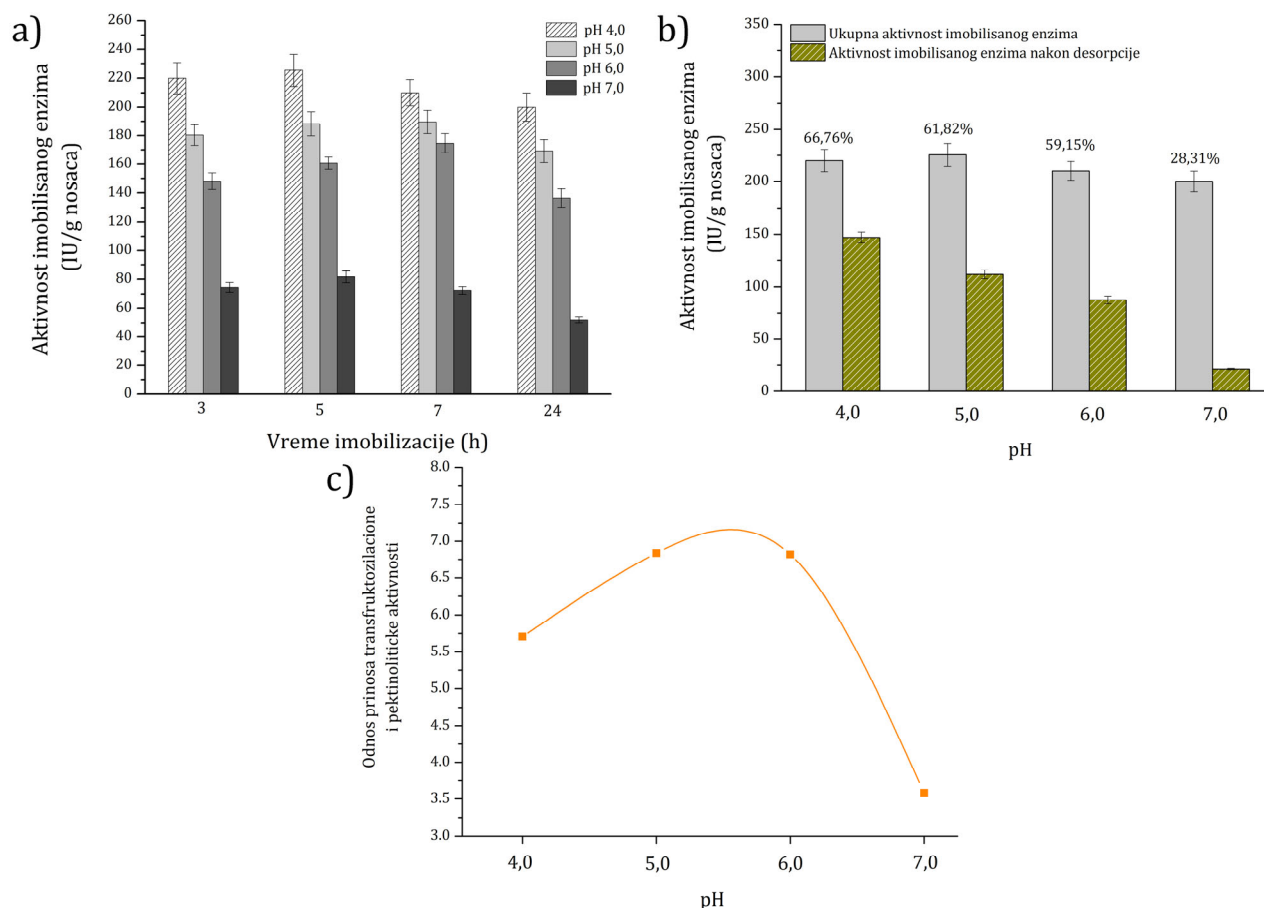
Slika 4.28. Šematski prikaz modifikacije nosača sa primarnim amino grupama - Purolite® A109 uvođenjem GA i imobilizacije FT radi uspostavljanja kovalentnih veza pored elektrostatskih interakcija.

Shodno navedenom, primena različitih koncentracija GA (0,5 % i 15 %) tokom izvođenja modifikacije nosača po opisanom protokolu (poglavlje 3.2.6.3.2) rezultirala je dobijanjem strukturno različitih GA-aktiviranih nosača sa GA u formi monomera ili dimera. Obe dobijene varijante su dalje primenjene za ispitivanje selektivne imobilizacije FT iz komercijalnog preparata Pectinex® Ultra SP-L. U nastavku su predstavljene detaljne optimizacije selektivne imobilizacije FT radi procene potencijala primene dobijenog imobilisanog preparata u sintezi FOS.

4.3.4.1.1. GA - aktivirani nosač Purolite® A109 (monomerni oblik)

Prvi korak u optimizaciji procesa imobilizacije FT na modifikovani nosač Purolite® A109 na kojem je GA u vidu monomera, podrazumevao je ispitivanje uticaja pH sredine na imobilizaciju enzima. Opseg pH imobilizacionog pufera je bio 4,0-7,0 jer u alkalnim uslovima GA-aktivirani nosači gube stabilnost. Svi eksperimenti su sprovedeni u uslovima niske jonske jačine u cilju promovisanja jonskih interakcija.

Sa slike 4.29a koja ilustruje promenu aktivnosti imobilisane FT pri različitim pH vrednostima sredine i vremenima imobilizacije uz korišćenje fiksne koncentracije enzimskog preparata (10 mg/g nosača), jasno se može videti da se najviše aktivnosti FT postižu u kiselim uslovima (pH 4,0; 0,1 M) i to najverovatnije zbog optimalne orijentacije FT za naredni korak kovalentnog vezivanja.

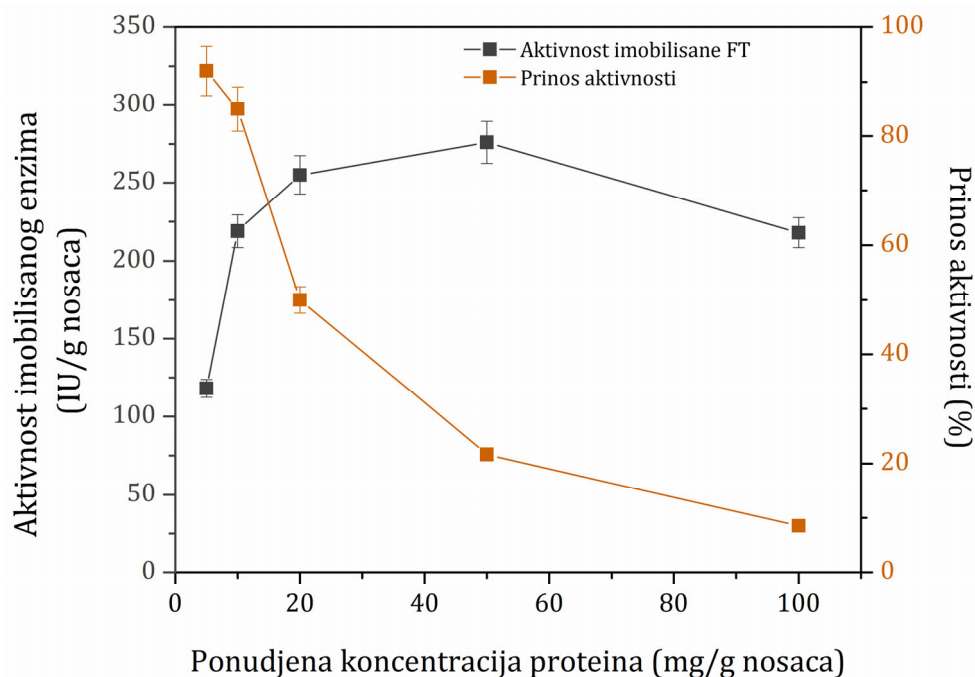


Slika 4.29. a) Uticaj vremena imobilizacije i pH na aktivnost imobilisane FT b) Uticaj pH na imobilisanu aktivnost FT pre i nakon desorpcije pri vremenu imobilizacije 3 h (brojevi iznad stubičastog grafikona definišu udeo kovalentnih veza) c) Grafik zavisnosti odnosa prinosa transfruktozilacione i pektinolitičke aktivnosti od pH imobilizacije pri vremenu imobilizacije 3 h

Primećeno je da sa porastom pH vrednosti aktivnost enzima opada, kao i da je najniža aktivnost FT izmerena pri pH 7,0 za ceo ispitivani opseg. Ovi rezultati su na neki način neočekivani pošto je preporučeni pH za imobilizaciju enzima na nosače sa aldehidnom grupom pH 7,0 (u slučaju nosača aktiviranih GA) preko α -amino grupe N-terminalnog kraja (pK 7,0-8,0) ili pod alkalnim uslovima za druge nosače preko ϵ -amino grupe lizina, (pK oko 10,0) [296]. Međutim, postoje podaci da FT iz Pectinex® Ultra SP-L povećava afinitet prema nosaču u kiselim uslovima [295] dajući najveću koncentraciju adsorbovanog enzima, što posledično može povećati verovatnoću formiranja kovalentne veze preko aktivne α -amino grupe N-terminalnog kraja sa nižim pK. Da bi se dokazala ova pretpostavka i pokazalo postojanje kovalentnih veza, izveden je dodatni eksperiment desorpcije enzima. Kako vreme nije pokazalo značajan uticaj na proces imobilizacije FT, jer se nezantno razlikuju dobijene aktivnosti, imobilisani preparati FT dobijeni nakon 3 h pri različitim pH tretirani su rastvorom CaCl_2 u cilju razaranja formiranih elektrostatičkih interakcija i utvrđivanja udela kovalentnih veza. Na osnovu aktivnosti FT pre i nakon izvođenja desorpcije (slika 4.29b), pokazalo se da je oko 67 % početne aktivnosti ostalo nakon desorpcionog eksperimenta za imobilisani preparat FT na pH 4,0. Isto tako, dobijeno je da je imobilizacija na pH 7,0 dala samo 28,31 % kovalentno vezane aktivnosti. Takođe, imobilisani preparati dobijeni nakon 3 h pri različitim pH su korišćeni za određivanje pektinolitičke aktivnosti i procenu selektivnosti. Sagledavajući odnos prinosa FT i pektinolitičke aktivnosti (slika 4.29c) može se primetiti da je najveća selektivnost (oko 6,8)

primećena pri pH 5,0 i 6,0, dok je za jedinicu niža (oko 5,8) uočena u sredini čiji je pH 4,0. Imajući u vidu prethodno navedene podatke, i pored neznatno niže ostvarene selektivnosti, vreme imobilizacije 3 h i pufer slabe jonske jačine pH 4,0, koji rezultira najvećim udelom kovalentnih veza uz najveću aktivnost imobilisanog preparata od 220 IU/g nosača, su izabrani za dalji rad.

U nastojanju da se dobije aktivniji imobilisani preparat, u sledećem nizu eksperimenata ispitan je uticaj različitih koncentracija proteina (5-100 mg/g nosača). Da bi se na odgovarajući način procenila efikasnost imobilizacije, razmatrana je i aktivnost imobilisanog preparata (IU/g nosača) kao i prinos aktivnosti (%). Kao što se jasno može videti sa slike 4.30, povećanje ponuđene koncentracije proteina u početku je davalo veće vrednosti aktivnosti imobilisanog preparata, uz konstantan pad prinosa aktivnosti.



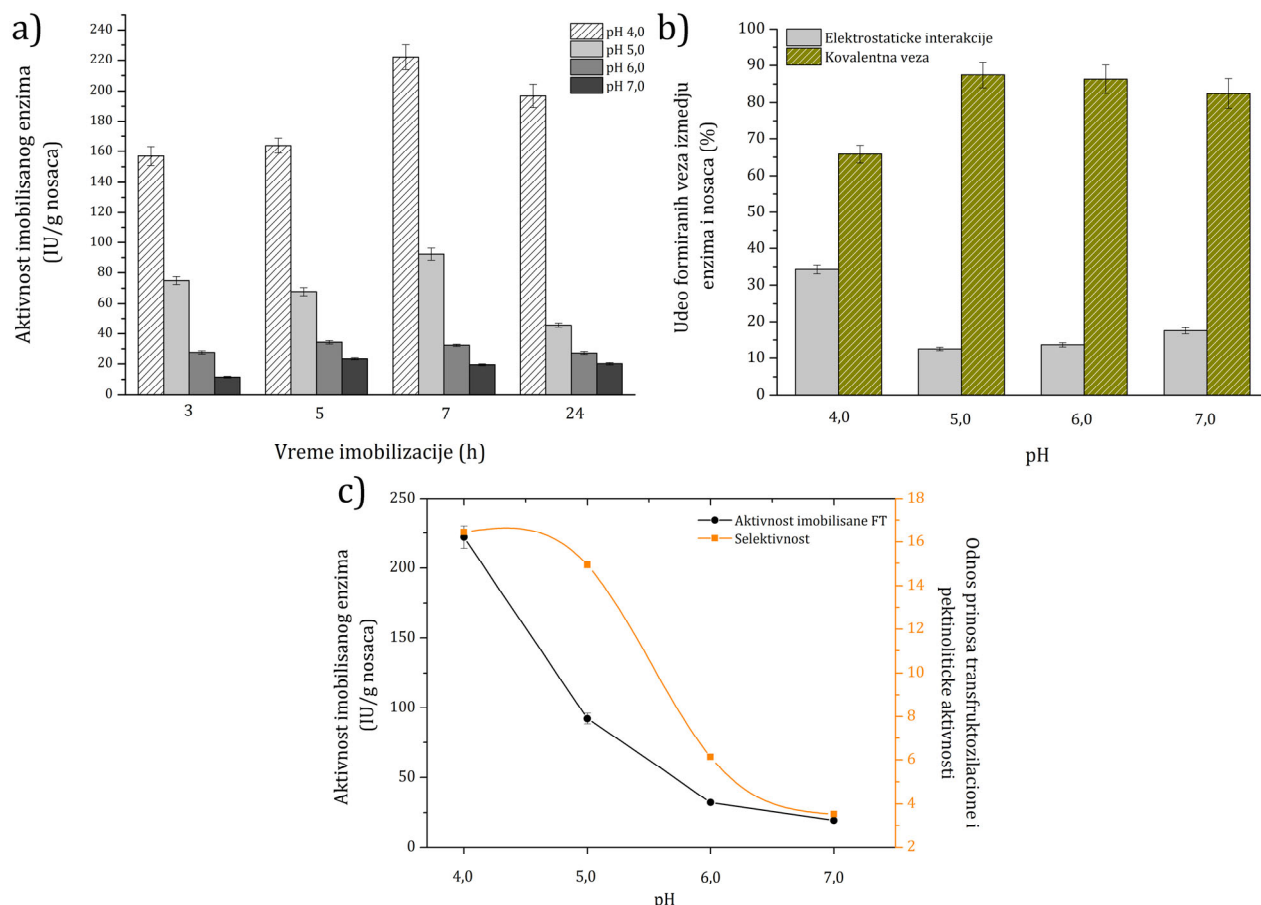
Slika 4.30. Uticaj ponuđene koncentracije proteina na aktivnost i prinos aktivnosti imobilisane FT na GA-aktiviran nosač (monomerni oblik)

Nakon ponuđene koncentracije proteina od 50 mg/g nosača, i imobilisana aktivnost i prinos aktivnosti su se smanjili, verovatno zbog zasićenja nosača. U cilju pronalazjenja kompromisa između ova dva suprotstavljena parametra, ali istovremeno uzimajući u obzir da imobilisani preparat treba da ima najveću moguću izraženu aktivnost za buduće primene, zaključeno je da optimalni parametri za imobilizaciju FT treba da budu sledeći: ponuđena koncentracija proteina od 50 mg/g nosača, pH 4,0 (0,1 M) i vreme trajanja imobilizacije 3 h. Pod ovim uslovima postignuta je aktivnost imobilisane FT od 276 IU/g nosača, što odgovara prinosu aktivnosti od 21,64 %.

4.3.4.1.2. GA - aktivirani nosač Purolite® A109 (dimerni oblik)

Pored nosača kojeg karakteriše prisustvo monomernih oblika GA, izvođenje modifikacije u prisustvu veće koncentracije GA rezultiralo je dobijanjem nosača kod kojeg je GA u formi dimera. I u ovom slučaju je izvršena detaljnija optimizacija imobilizacije FT iz preparata Pectinex® Ultra SP-L ispitivanjem uticaja ključnih parametara procesa: pH, vreme imobilizacije i koncentracija proteina. Najpre je variran uticaj pH i vremena imobilizacije, dok je koncentracija proteina bila nepromenjena (10 mg/g nosača), pri čemu su na slici 4.31a prikazane aktivnosti imobilisane FT. Kao i kod nosača sa GA u formi monomera, i ovde se

uočava identičan trend promene. Naime, sa porastom pH, primećeno je smanjenje aktivnosti imobilisanog enzima u celom ispitivanom opsegu. Najveća aktivnost FT od 222 IU/g nosača dobijena je primenom pufera čiji je pH 4,0, nakon 7 h izvođenja imobilizacije. Povećanje trajanja imobilizacije (do 24 h) rezultiralo je smanjenjem aktivnosti koje može biti posledica promene trodimenzionalne strukture enzima u slučaju kovalentnog vezivanja [297]. Izvođenjem dodatnih eksperimenata, utvrđene su vrste veza između GA - funkcionalizovanog nosača i enzima (slika 4.31b). Ostvareni rezultati navode na zaključak da u imobilisanom preparatu FT dobijenom primenom pufera pH 4,0 (0,1 M) nakon 7 h imobilizacije postoje elektrostatičke interakcije sa udelom od 34 %, dok udeo kovalentnih veza iznosi 66 %.

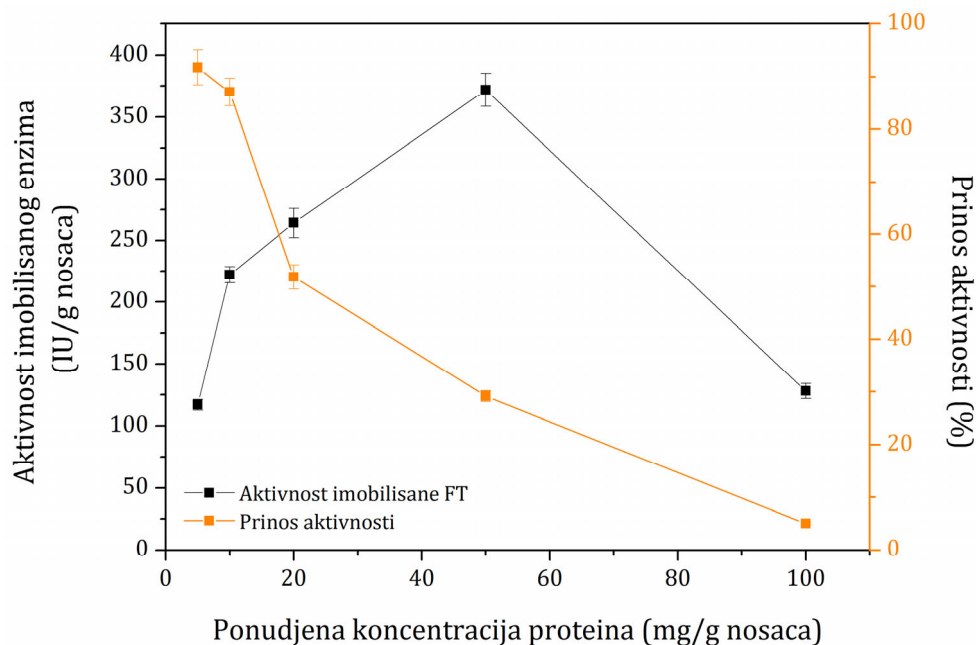


Slika 4.31. a) Uticaj vremena imobilizacije i pH na aktivnost imobilisane FT b) Zastupljenost formiranih veza pri imobilizaciji FT na različitim pH i vremenu imobilizacije 7 h c) Grafik zavisnosti transfruktozilacije aktivnosti i odnosa prinosa transfruktozilacije i pektinolitičke aktivnosti od pH imobilizacije pri vremenu imobilizacije 7 h

Ukoliko sagledamo i podatke dobijene pri ostalim pH vrednostima, možemo konstatovati da u sredini pH 4,0, dolazi do izraženijeg vezivanja FT putem elektrostatičkih interakcija. Takođe, prisutne elektrostatičke interakcije formirane između pozitivno naelektrisanih potpornih amino grupa nosača i površinskih karboksilnih grupa enzima preko kojih je enzim približen podlozi, mogu dodatno uticati i na povećanje reaktivnosti enzima sa ostalim grupama nosača u pravcu uspostavljanja kovalentnih veza. Budući da je najveća aktivnost imobilisane FT dobijena u sredini gde je veći udeo elektrostatičkih interakcija u odnosu na druge primenjene puferske sisteme, može se pretpostaviti da intenzivnije vezivanje prati i dobra orijentacija imobilisane FT tako da je aktivni centar dostupan supstratu. Uzimajući u obzir i dominantnost pektinolitičkih enzima u primenjenom komercijalnom preparatu, prema odnosu ostvarenih prinosa aktivnosti za oba enzima, izračunata je i selektivnost. Sa grafika koji ilustruje uporedni prikaz aktivnosti FT i selektivnosti (slika 4.31c), uočava se isti trend promene - sa povećanjem

pH dolazi do njihovog smanjenja. U ovom slučaju, najveću FT aktivnost prati i najveća selektivnost (16,45) što dovodi do zaključka da je u ovom sistemu favorizovana imobilizacija FT u odnosu na hidrolitičke enzime-pektinaze čime je izvedeno i delimično prečišćavanje FT. Prema prikazanim rezultatima, iako su stabilniji imobilisani preparati (zbog većeg udela kovalentnih veza) dobijeni u puferima sa nižom kiselošću (pH 5,0-7,0), svakako niske vrednosti aktivnosti (niže od 92 IU/g nosača) ali i selektivnosti, ne ističu njihov potencijal za dalju primenu. Stoga, pufer niske jonske jačine pH 4,0 i vreme imobilizacije 7 h, su korišćeni u narednim eksperimentima.

Pored fiksiranih vrednosti pH i trajanja imobilizacije, ispitan je i uticaj ponuđene koncentracije proteina (5-100 mg/g nosača) na vezivanje FT na GA-funkcionalizovan nosač radi razmatranja mogućnosti dobijanja aktivnijeg imobilizata. Na osnovu profila promene aktivnosti imobilisane FT (slika 4.32) može se primetiti da sa povećanjem koncentracije proteina od 5 do 50 mg/g nosača, aktivnost sve vreme beleži porast, nakon čega je daljim povećanjem koncentracije (100 mg/g nosač), primećen drastičan pad aktivnosti. Ovakvo zapažanje navodi na zaključak da je pri koncentraciji proteina 50 mg/g nosača, pri kojoj je maksimalna aktivnost FT 371,8 IU/g nosača, zapravo došlo do zasićenja nosača.



Slika 4.32. Uticaj ponuđene koncentracije proteina na aktivnost i prinos aktivnosti imobilisane FT na GA-aktiviran nosač (forma dimera)

Takođe, pri većim ponuđenim koncentracijama može doći i do vezivanja drugih enzima iz primenjene smeše čime je otežano vezivanje ciljanog što se reflektuje kroz pad aktivnosti. Sa druge strane, posmatrajući zavisnost prinosa aktivnosti od ponuđene koncentracije proteina, evidentno je da sa porastom koncentracije, dolazi do smanjenja prinosa aktivnosti. Izvesno je da se na osnovu najveće dobijene vrednosti prinosa aktivnosti od 91,7 % najefikasniji proces može izvoditi u uslovima najniže primenjene koncentracije proteina (5 mg/g nosača), kao i da pri 50 mg/g nosača prinos aktivnosti iznosi samo 29,2 %. Međutim, budući da je osnovni cilj primena imobilisanog preparata FT u izvođenju reakcija sinteze FOS, presudan uticaj pri odabiru optimalnih parametara se može pripisati aktivnosti. Prema tome, i pored niskog ostvarenog prinosa aktivnosti, zbog značajno veće aktivnosti (371,8 IU/g nosača) koja je variranjem ovog parametra povećana oko 1,7 puta (u odnosu na prvobitnu od 222 IU/g nosača), koncentracija proteina od 50 mg/g nosača je usvojena kao optimalni parametar.

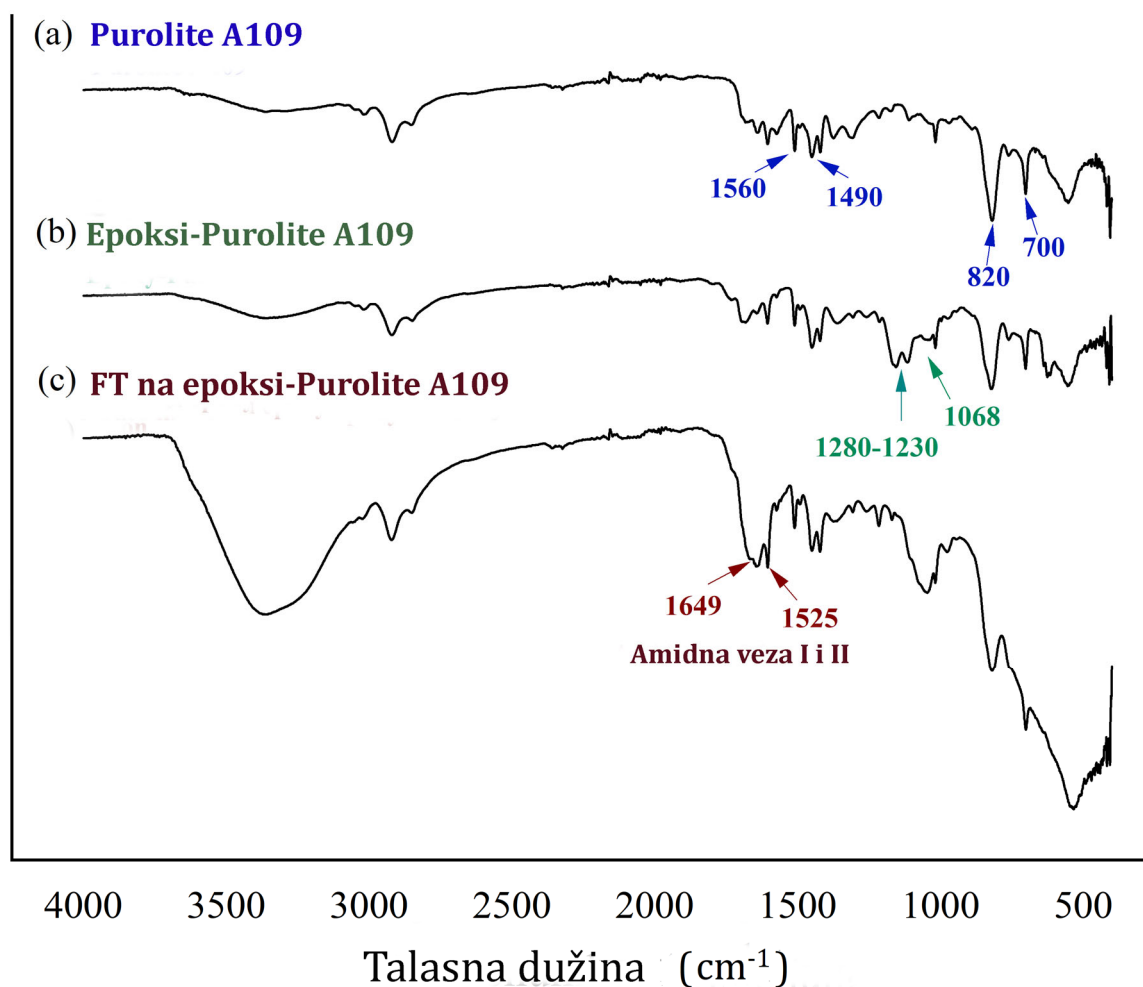
Poredeći maksimalne aktivnosti imobilisanih preparata FT sa različitom formom GA koje iznose 276 IU/g nosača (monomerni oblik - kraća „nožica“) i 371,8 IU/g nosača (dimerni oblik - duža „nožica“) možemo konstatovati da dužina „nožice“ može uticati na proces imobilizacije. Naime, objašnjenje za dobijenu nižu aktivnost u slučaju nosača sa monomernim oblikom GA, može se pripisati tome da primena nosača sa kraćom „nožicom“ rezultira većom krutošću i prenapetošću molekula enzima čineći ga manje aktivnim, u poređenju sa nosačem koji sadrži dužu „nožicu“ (dimerni oblik GA) [161]. Identično zapažanje prijavili su Lorena Betankor (Betancor) i sar. u svojoj studiji [298]. Oni su takođe izvestili da prisustvo dimera omogućava reakciju enzima sa većim brojem grupa uz postojanje manjih sternih smetnji čime je i olakšan prilaz supstratu [298]. Dakle, sasvim je očekivano što je u slučaju imobilizacije FT na GA-heterofunkcionalan nosač Purolite® A109 forme dimera dobijen imobilisani preparat veće aktivnosti u poređenju sa primenom nosača forme monomera zbog čega se ujedno smatra i pogodnijim za dalju primenu u proizvodnji FOS.

Neosporno je da razlike u prisutnim grupama (monomer/dimer) mogu izazvati i razlike u stabilnosti kao što je i prijavljeno u naučnoj literaturi [298], ali pažljivim dizajniranjem uslova aktivacije i imobilizacije, može se uticati na dobijanje imobilisanog preparata željenih karakteristika.

4.3.4.2. Optimizacija selektivne imobilizacije FT na epoksi - aktiviran Purolite® A109 nosač

Pošto je prema podacima iz literature FT iz *A. aculeatus* pokazala dobar potencijal za vezivanje i na epoksi-funkcionalizovane nosače [174, 175], nosač sa primarnim amino grupama Purolite® A109 je u narednoj fazi istraživanja tretiran rastvorom epihlorhidrina radi uvođenja ovih funkcionalnih grupa. Ovaj metodološki pristup takođe pruža mogućnost stvaranja heterofunkcionalnih nosača koji favorizuju formiranje jakih i stabilnih kovalentnih veza sa molekulima enzima. Generalno, epoksidne grupe najčešće reaguju sa površinskim delovima enzima i to sa amino grupama iz bočnih lanaca lizina, fenolnim grupama tirozina, tiolnim iz cisteina, a može doći i do reakcija sa karboksilnim iz asparaginske i glutaminske kiseline kao i sa imidazolom iz histidina [293]. Nosači aktivirani epoksidnim grupama se smatraju veoma popularnim izborom za imobilizaciju enzima i zbog dobre stabilnosti [161] u različitim uslovima, ali i zbog toga što izazivaju minimalne neželjene efekte na enzimsku aktivnost [299].

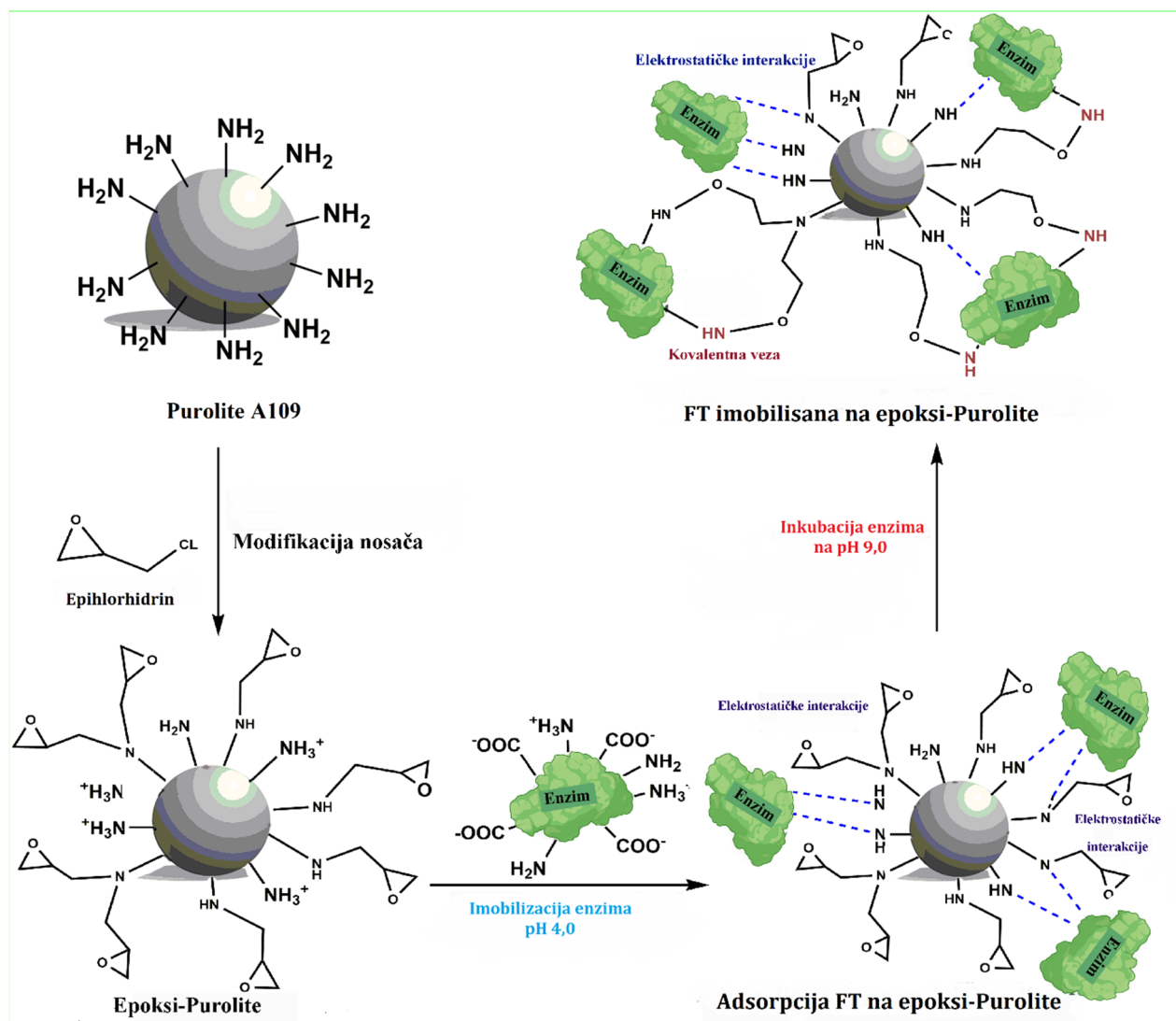
S tim u vezi, pored hemijske modifikacije makroporozne jonoizmenjivačke smole Purolite® A109 korišćenjem GA, ovaj nosač je tretiran i epihlorhidrinom. Osnovni cilj je bio da se značajna frakcija prisutnih amino grupa nosača zameni epoksidnim i dobije nova, poboljšana podloga za imobilizaciju FT koja se može smatrati heterofunkcionalnom. Izvođenjem dodatnih eksperimenata utvrđeno je da je epoksi-aktiviran nosač nakon modifikacije sadržao 525 μmol epoksidnih grupa/g nosača dok je koncentracija preostalih amino grupa iznosila 2680 μmol /g nosača. Uvođenje epoksidnih grupa je dodatno potvrđeno infracrvenom spektroskopijom (FTIR) na osnovu razlika u dobijenim spektrima nemodifikovanog i modifikovanog nosača (slika 4.33a i 4.33b). Sa snimljenog FTIR spektra za epoksi-aktiviran nosač (slika 4.33b) evidentno je prisustvo jednog oštrog ($1280\text{-}1230\text{ cm}^{-1}$) i jednog širokog pika (oko 1068 cm^{-1}) koji nastaju kao posledica simetričnih prstenastih vibracija uvedene epoksidne grupe i -CO vibracija, redom [300]. Druga dva karakteristična pika za epoksidi, koja potiču od rastezanja C-O-C ($950\text{-}810\text{ cm}^{-1}$ i $880\text{-}750\text{ cm}^{-1}$), nisu tako očigledna, pošto se rastezanje unutar primarnih amina može uočiti u istom regionu ($910\text{-}665\text{ cm}^{-1}$).



Slika 4.33. FTIR spektri dobijeni analizom: a) nemodifikovanog nosača b) epoksi-modifikovanog nosača i c) imobilisane FT na epoksi-modifikovan nosač

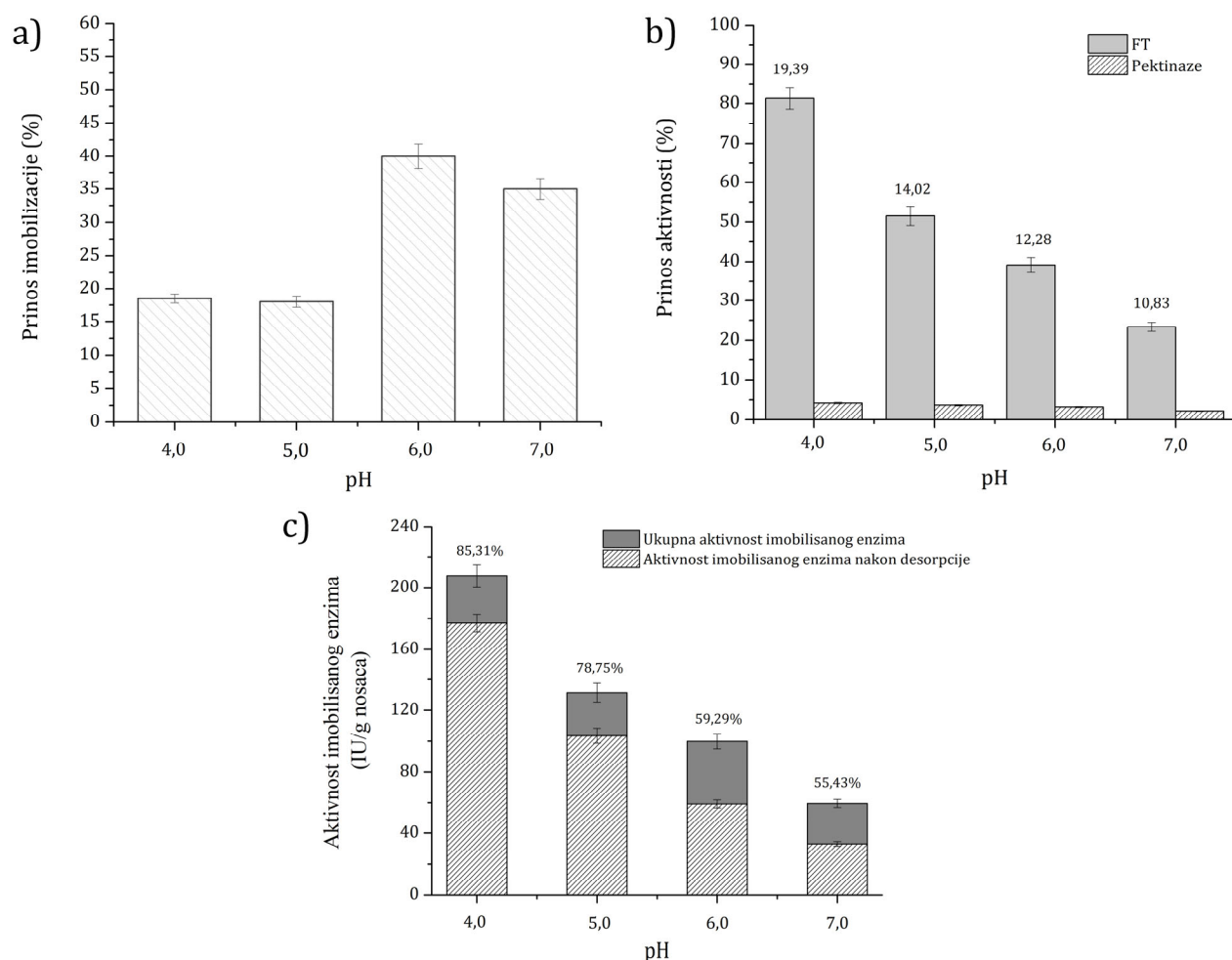
Nakon modifikacije, imobilizacija enzima primenom heterofunkcionalnog nosača je izvedena u dva koraka (slika 4.34). Imajući u vidu hemijski sastav dobijenog amino-epokidnog nosača, FT iz komercijalnog preparata Pectinex® Ultra SP-L prvenstveno je imobilisana fizičkom adsorpcijom pri blagim uslovima (kiseli ili neutralni pH i niska jonska jačina) kako bi se enzim približio funkcionalnim grupama koje obezbeđuju formiranje kovalentne veze. Zatim, u drugom koraku, promenom reakcionih uslova (pH 9,0), favorizovano je uspostavljanje kovalentnih veza [293]. Ovaj pufer je izabran kao kompromisno rešenje između stabilnosti enzima i potencijala epoksidnih grupa da stupe u reakciju sa različitim grupama enzima. Naime, pri neutralnom ili blago alkalnom pH, epoksidne grupe su sklone reakciji sa tiolnim grupama, pri pH većem od 9,0 sa amino grupama, pri pH većem od 11,0 sa fenolnim grupama tirozina, a u slabo kiseljoj sredini sa karboksilnim grupama [175].

Optimizacija imobilizacije FT je najpre izvedena variranjem uticaja pH za odigravanje adsorpcije. Efekat različitih puferkih rastvora je ispitan u opsegu pH 4,0-7,0 (50 mM) kako bi se izvela adsorpcija FT na heterofunkcionalan nosač u trajanju od 3 h, nakon čega je pufer zamenjen alkalnim puferom (pH 9,0) iste jonske jačine do 24 h. Kao parametri za identifikaciju optimalnih uslova razmatrani su: aktivnost imobilisanog preparata, prinos aktivnosti, prinos imobilizacije i selektivnost. U slučaju uticaja pH na proces imobilizacije, sa slike 4.35a se može primetiti da je do pH 5,0 prinos imobilizacije iznosio oko 20 %, dok za pH 6,0 i 7,0 iznosi 40 %, odnosno 35 %, redom. Ovaj rezultat ukazuje da je više proteina adsorbovano pri blago kiselim i neutralnim pH vrednostima.



Slika 4.34. Šematski prikaz modifikacije nosača Purolite A109 upotrebom epihlorhidrina i imobilizacija FT

Međutim, razmatrajući prinos aktivnosti (slika 4.35b) i aktivnost imobilisane FT (slika 4.35c), može se primetiti da iako je dva puta veći prinos imobilizacije pri pH 6,0 (40 %), osvarena aktivnost je duplo manja (100 IU/g nosača) u poređenju sa podacima dobijenim u uslovima pH 4,0 (20 %, 207 IU/g nosača). Ovakav efekat navodi na zaključak da je u kiseloj sredini (posebno u puferu pH 4,0) vezivanje FT intenzivnije nego u blago kiselim i neutralnim sredinama gde je očigledno dominantnije vezivanje drugih enzima iz primenjenog komercijalnog preparata Pectinex® Ultra SP-L. Adekvatnost procesa imobilizacije može se dodatno potvrditi i poređenjem prinosa aktivnosti imobilizacije FT sa pektinazama koje dominiraju u komercijalnom preparatu i potencijalno izazivaju neželjene efekte u nekim reakcijama (slika 4.35b). Može se primetiti da se najveći prinos aktivnosti imobilizacije postiže pri pH 4,0 (oko 81,36 %), ali i najveći odnos FT i pektinolitičke aktivnosti (19,39) koji odražava selektivnost vezivanja ciljanog enzima. Sa povećanjem pH vrednosti pufera za imobilizaciju, vrednost ovog odnosa se smanjuje.



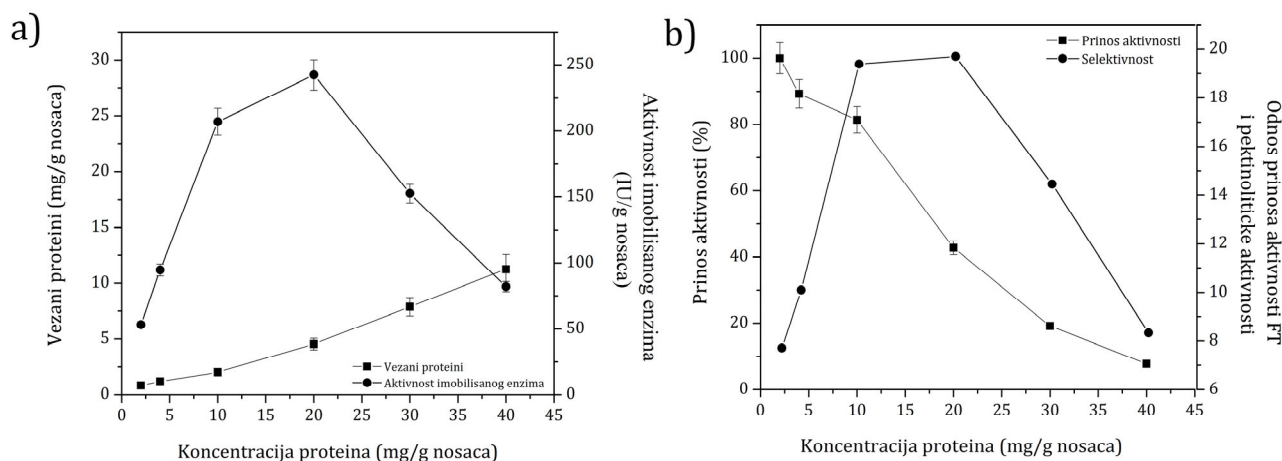
Slika 4.35. Uticaj pH u prvom koraku imobilizacije na: a) prinos imobilizacije, b) prinos aktivnosti FT i pektinaza (brojevi iznad stubičastih grafikona definišu odnos prinosa aktivnosti FT i pektinaza) i c) aktivnost imobilisanog enzima (brojevi iznad stubičastih grafikona definišu udeo kovalentnih veza).

Uspostavljanje veza između enzima i nosača i to najverovatnije preko interakcija sa amino grupama [301] potvrđeno je i FTIR spektroskopijom. Dobijen je spektar sa karakterističnim trakama na 1649 cm^{-1} i 1525 cm^{-1} (slika 4.33c) koje odgovaraju formiranim amidnim vezama [302].

Da bi se potvrdila literaturna polazna hipoteza - da promena pufera može favorizovati uspostavljanje stabilnih kovalentnih veza, izveden je i dodatni eksperiment koji je imao za cilj određivanje imobilisane aktivnosti FT nakon desorpcije enzima (slika 4.35c). Sa slike 4.35c može se primetiti da aktivnosti FT pre i posle desorpcije pokazuju stabilan pad sa porastom pH, kao i da je najveći udeo kovalentne veze od 85,31 % primećen na pH 4,0. Ovdje je zanimljivo napomenuti da je u slučaju imobilizacije putem adsorpcije na nemodifikovani nosač Purolite® A109 došlo do potpune desorpcije enzima, ali je uprkos tome imobilisani enzim bio stabilan u 10 reakcionih ciklusa, jer reakcioni uslovi ne odgovaraju uslovima „spiranja“ enzima (ne remete stabilnost interakcije). Pored toga, predstavljeni rezultati ukazuju na visoku izvodljivost imobilizacije FT na epoksi-aktivirani nosač Purolite® A109 na pH 4,0, koja je izabrana kao optimalna za dalji rad.

Po utvrđivanju efekta pH na proces imobilizacije FT, varirano je i doziranje enzima radi procene uticaja ovog parametra na efikasnost imobilizacije. Ispitan je opseg koncentracije od 2 - 40 mg/g nosača, a dobijeni rezultati su prikazani na slici 4.36. Najveća aktivnost FT od

243 IU/g nosača je zabeležena pri koncentraciji od 20 mg/g nosača, dok je dalje povećanje koncentracije dovelo do znatnog smanjenja aktivnosti. Ovakav efekat može biti posledica vezivanja većih količina drugih prisutnih enzima, zbog konstantnog povećanja granice vezanih proteina (slika 4.36a), čime je sprečeno vezivanje ciljanog. Takođe, potencijalno objašnjenje za niže aktivnosti FT može se pripisati pojavi višeslojne adsorpcije u okviru prvog koraka imobilizacije, budući da ona može ometati formiranje kovalentnih veza i ometati pristup supstrata aktivnom mestu enzima [174]. Prinos aktivnosti FT opada u celom ispitivanom opsegu, dok odnos prinosa FT i pektinolitičke aktivnosti dostiže plato (19) u opsegu koncentracija 10-20 mg/g nosača. Prema tome, po usvajanju optimalnih uslova imobilizacije koji uključuju pH 4,0 i koncentraciju enzima 20 mg/g nosača, može se postići aktivnost imobilizata od 243 IU/g nosača.



Slika 4.36. Uticaj ponuđene koncentracije proteina na: a) vezane proteine i aktivnost imobilisanog enzima b) prinos aktivnosti FT i odnos prinosa i aktivnosti FT i pektinaza.

Ovaj protokol imobilizacije koji ima za cilj stvaranje imobilisanog enzima izražajne stabilnosti, svakako je doveo do poboljšanja procesa imobilizacije.

4.3.4.3. Sinteza FOS primenom imobilisane FT na modifikovane Purolite® A109 nosače

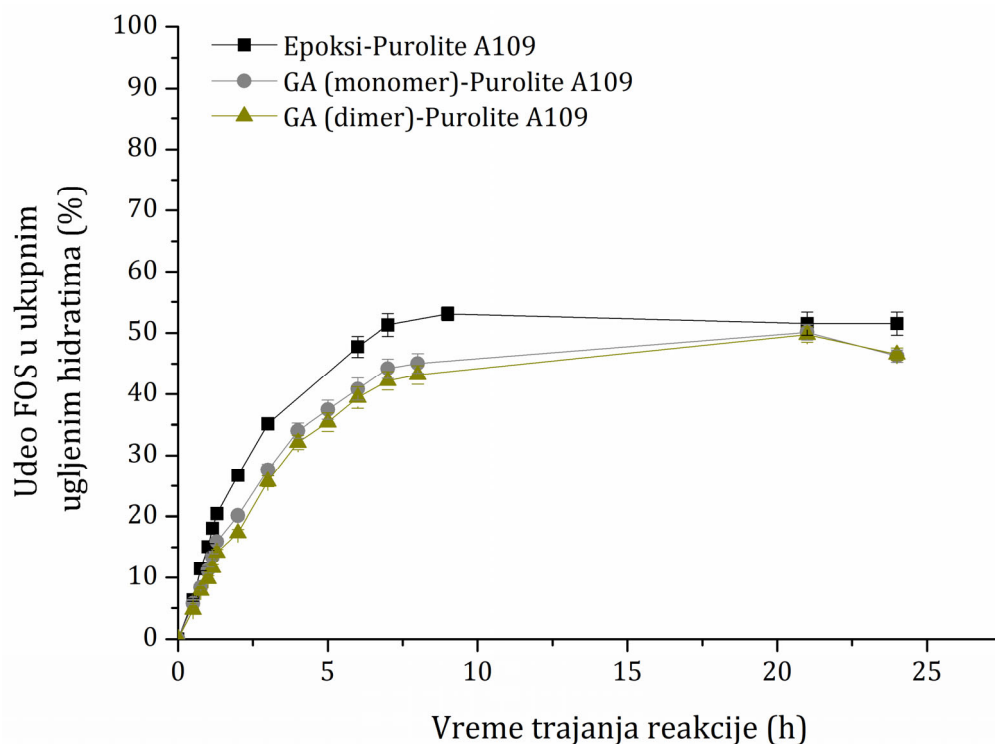
Nakon izvođenja detaljnih optimizacija selektivnih imobilizacija FT na modifikovane Purolite® A109 nosače, čiji su izabrani optimalni parametri sumirani u tabeli 4.5, u narednom eksperimentu procenjena je primena dobijenih imobilisanih preparata u reakciji sinteze FOS. Reakcija je izvedena u rastvoru saharoze koncentracije 500 g/L primenom 1% (w/v) imobilisanog preparata FT u trajanju od 24 h na 50 °C, a grafički prikaz rezultata je dat na slici 4.37.

Tabela 4.5. Prikaz izabranih optimalnih uslova za izvođenje selektivne imobilizacije FT na nosače modifikovane različitim reagensima

Nosač	pH	Vreme (h)	Konc. proteina (mg/g nosača)	Aktivnost FT (IU/g nosača)	Selektivnost
GA (monomer)-Purolite	4,0; 0,1 M	3	50	276	5,80
GA (dimer)-Purolite	4,0; 0,1 M	7	50	371	16,45
Epoksi-Purolite	4,0; 9,0	24	20	243	19,00

Posmatrajući profile promene udela FOS u ukupnim ugljenim hidratima (slika 4.37) za sva tri imobilisana preparata FT, evidentno je da trajanjem reakcije dolazi do povećanja udela FOS u

slučaju primene sva tri preparata, ali i da je ovaj efekat najizraženiji kod epoksi-funkcionalizovanog Purolite® A109 nosača. U tom slučaju dobijen je maksimalni udeo FOS od 53 % nakon 9 h, dok su niži maksimalni udeli od oko 50 % dobijeni primenom GA-aktiviranih nosača nakon 21 h. Ovi rezultati upućuju na zaključak da je nosač sa epoksidnim grupama veoma efikasan u produkciji FOS.

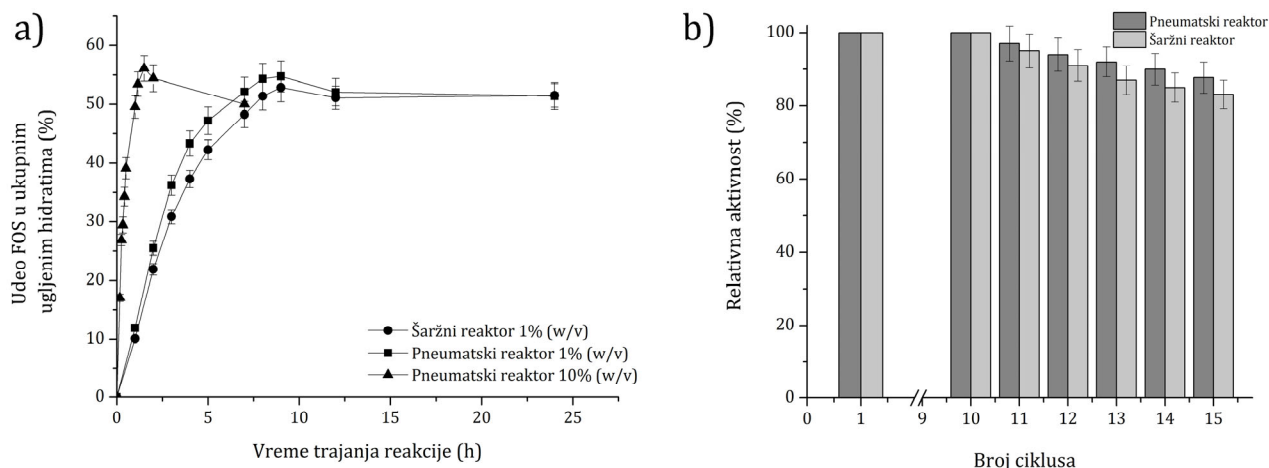


Slika 4.37. Vremenski tok reakcije sinteze FOS primenom različitih imobilisanih preparata FT

Pored toga, imobilizacijom FT na epoksi-aktivirani Purolite® A109 ostvaruje se i visoka selektivnost, ali i značajan udeo formiranih kovalentnih veza pod definisanim optimalnim uslovima (pH 4,0 i koncentracija enzima 20 mg/g nosača), što posebno izdvaja ovaj nosač od prethodno ispitanih nosača na bazi GA. Imajući ovo u vidu, u narednoj fazi istraživanja nosač aktiviran epihlorhidrinom je primenjen u reaktorskim sistemima (šaržni i pneumatski reaktor) radi procene efikasnosti izvođenja reakcije sinteze FOS, a posledično i intenzifikacije procesa.

4.3.5. Primena imobilisanog preparata FT na epoksi-aktivirani nosač Purolite® A109 u šaržnom i pneumatskom reaktoru

Po dobijanju imobilisanog preparata unapređenih karakteristika (epoksi-Purolite® A109), u narednoj fazi ispitana je njegova primena u reakciji sinteze FOS u šaržnom (u erlenmajeru na tresilici) i pneumatskom reaktoru. Kako je vodeća prednost imobilisanih enzima mogućnost njihove ponovne upotrebe, oba reaktorska sistema su takođe korišćena i za testiranje operativne stabilnosti dobijenog imobilisanog preparata. Istovremenim izvođenjem reakcije sinteze pri koncentraciji imobilisanog preparata od 1 % (w/v), ostvareni su maksimalni udeli FOS od 52,8 % i 54,7 % nakon 9 h u šaržnom i pneumatskom reaktoru, redom (slika 4.38a). Nakon produženja reakcije primećen je blagi pad udela FOS (51 % FOS nakon 24 h) za oba primenjena reaktorska sistema. Nešto veći maksimalni udeo FOS kao i početna brzina reakcije u vazdušnom reaktoru se može pripisati ravnomernijem mešanju u toku procesa pružajući veću dostupnost supstrata imobilisanom enzimu bez ikakve potrebe za opsežnijim mešanjem koje bi moglo dovesti do većih sila smicanja [303].

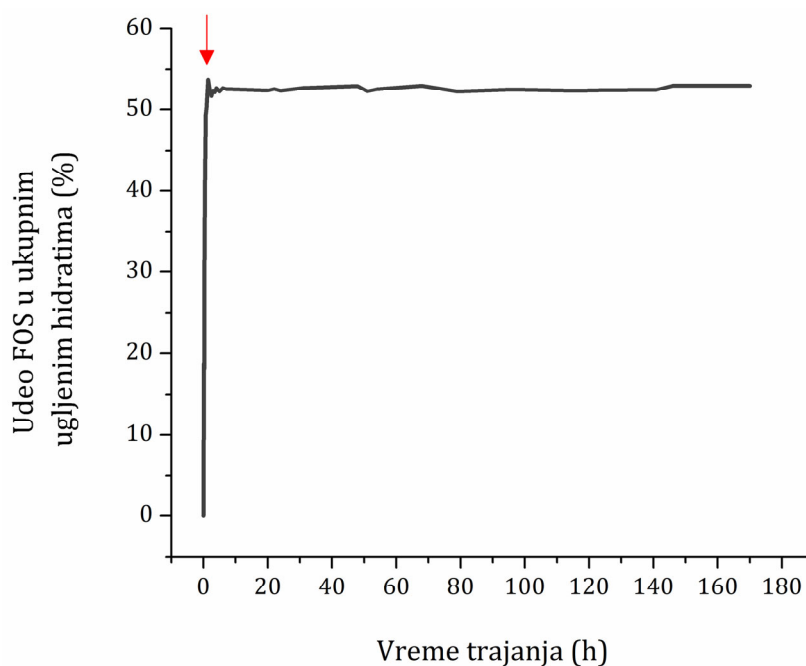


Slika 4.38. a) Poređenje dobijenog udela FOS u ukupnim ugljenim hidratima korišćenjem 1% (w/v) i 10% (w/v) imobilisanog preparata u šaržnom i pneumatskom reaktoru b) Operativna stabilnost imobilisanog preparata FT (1% (w/v)) u šaržnom i pneumatskom reaktoru.

Potom je testirana operativna stabilnost primenom identične koncentracije imobilisanog enzima izvođenjem 15 reakcionih ciklusa sinteze FOS u šaržnom i pneumatskom reaktoru. Jedan ciklus je definisan vremenom trajanja reakcije od 24 h iako su ostvareni prinosi bili neznatno niži, zbog tehničkih ograničenja pri izvođenju eksperimenata. Rezultati u vidu relativne aktivnosti su prikazani na slici 4.38b sa koje se može jasno uočiti da čak i nakon 10 ciklusa reakcije imobilisani preparat nije izgubio svoju aktivnost. Blago smanjenje aktivnosti primećeno je nakon 15 ciklusa reakcije sinteze, pri čemu je zadržana aktivnost u pneumatskom reaktoru bila 87,7%, a u šaržnom 83,1%. Dobijeni rezultati potvrđuju bolje karakteristike pneumatskog reaktora u poređenju sa konvencionalnim šaržnim reaktorom. Prema literaturnim podacima o operativnoj stabilnosti kovalentnih imobilizata FT primenom komercijalnog preparata Pectinex® Ultra SP-L, FT imobilisana na čestice hitozana je zadržala manje od 80% inicijalne aktivnosti nakon 8 reakcionih ciklusa [178], dok je FT imobilisana na Fe₃O₄-magnetne čestice hitozana zadržala manje od 90% svoje početne aktivnosti nakon 6 ciklusa [179]. Dakle, predstavljeni rezultati u ovoj disertaciji ukazuju na značajnu i izvanrednu operativnu stabilnost kovalentno imobilisane FT na epoksi-heterofunkcionalan nosač Purolite® A109 za koji se neosporno može reći da poseduje potencijal za primenu u kontinualnim procesima sinteze FOS.

Kao i u slučaju imobilizacije FT na nemodifikovani nosač Purolite® A109, i ovde je testirana veća koncentracija imobilisanog preparata jer je osnovni cilj eksperimenta bio smanjenje vremena za postizanje maksimalnog prinosa FOS, a samim tim i vremena dostizanja kraja šaržnog i početka kontinualnog režima rada. S tim u vezi, u pneumatskom reaktoru u šaržnom režimu rada, ispitana je koncentracija enzima od 10% (w/v) (slika 4.38a). Prema prikazanim rezultatima, primećen je maksimalni udeo FOS od 56%, posle 1,5 h. Dobijeni rezultat je u skladu sa prijavljenim rezultatima drugih autora koji su takođe razmatrali sintezu FOS u različitim reaktorskim konfiguracijama [126, 174].

Nakon uspešne primene imobilisanog preparata FT u koncentraciji od 10% (w/v) u šaržnom režimu rada u pneumatskom reaktoru, pomenuti preparat je potom testiran u istom reaktorskom sistemu u kontinualnom procesu (slika 4.39). Dobijen je maksimalni udeo FOS u ukupnim ugljenim hidratima od 54% nakon 1,5 h, pri čemu ovaj momenat predstavlja početak kontinuiranog dodavanja supstrata pri brzini protoka od 2,5 mL/min, ali i istovremenog kontinuiranog odvođenja proizvoda, što posledično dovodi do blagog smanjenja udela FOS.

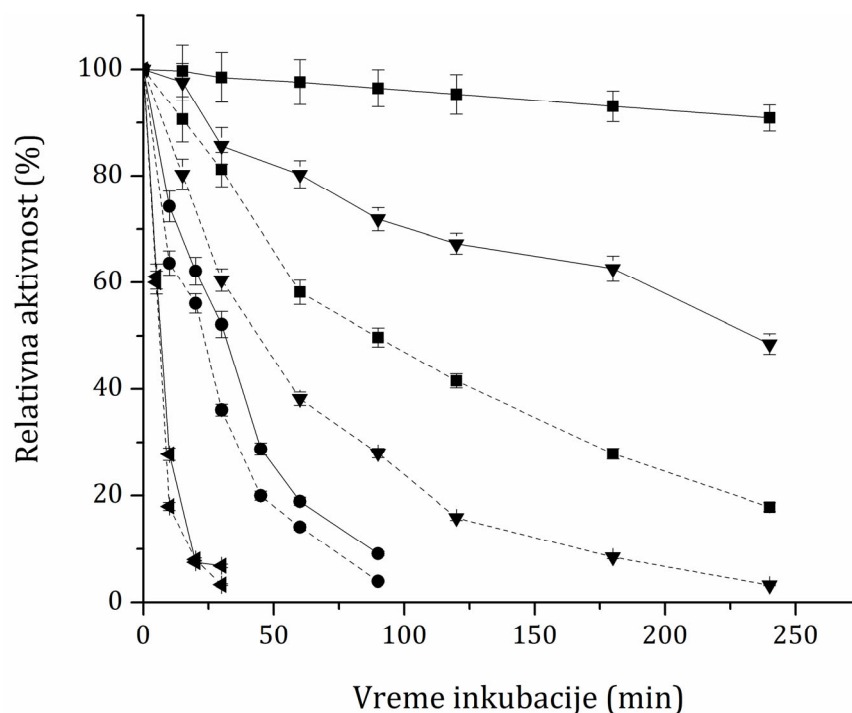


Slika 4.39. Kontinualna produkcija FOS primenom FT imobilisane na epoksi- Purolite® A109 nosač

Daljim razvojem procesa može se primetiti da je nakon 2 h došlo do stabilizacije kao i da je uspostavljeno stabilno stanje sa prosečnim udelom FOS od 52,5 %. Pored visokih ostvarenih prinosa, razvijena kontinualna proizvodnja FOS pokazala se veoma uspešnom, jer se odvijala stabilno i u kontrolisanim uslovima tokom 7 dana (170 h). Na kraju kontinualnog procesa dobijena je smeša sledećeg sastava: FOS 3 (31,06 %), FOS 4 (18,14 %), FOS 5 (3,27 %), saharoza (16,97 %) i monosaharidi (30,56 %). U poređnom analizom razvijenih postupaka kontinualne proizvodnje FOS primenom imobilisanih preparata FT korišćenjem nemodifikovanog i epoksi-modifikovanog nosača Purolite® A109 može se konstatovati da su krajnje smeše rezultirale sličnim prinosom (53 % i 52,5 % FOS u slučaju nemodifikovanog i modifikovanog nosača, redom). Uprkos tome što duže trajanje procesa (u slučaju modifikovanog nosača) ukazuje na veću procesnu stabilnost i pouzdanost, dobijeni rezultati svakako ukazuju na potencijalnu primenljivost razvijenih postupaka u industrijskom okruženju.

4.3.6. Ispitivanje termičke stabilnosti imobilisanih preparata

Izlaganje visokim temperaturama može dovesti do nepovratne inaktivacije enzima tokom dugotrajnog industrijskog procesa [178]. Prema tome, ispitivanjem termičke stabilnosti imobilisane FT i upoređujući je sa slobodnim enzimom, moguće je proceniti unapređenje stabilnosti enzima procesom imobilizacije. Kompletna analiza je izvedena određivanjem kinetičkih parametara (k_d i $t_{1/2}$) koji odražavaju uticaj temperature na denaturaciju enzima, kao i energije inaktivacije (E_d , kJ/mol). Konstanta brzine inaktivacije, vreme poluživota i energija inaktivacije su određeni jednačinama 16-18 (poglavlje 3.2.7). Sa slike 4.40 koja ilustruje termičku stabilnost slobodne i imobilisane FT iz komercijalnog preparata Pectinex® Ultra SP-L na epoksi-aktiviran Purolite® A109 može se videti da je imobilisani enzim zadržao 90 % i 48 % svoje inicijalne aktivnosti nakon 240 min inkubacije na 55 i 60 °C, redom. Isto tako, tokom inkubacije na višim temperaturama (65 i 70 °C) uočava se drastičan pad aktivnosti za oba primenjena oblika enzima. U poređnom analizom stabilnosti slobodne i imobilisane FT, kao što je i očekivano, uočena je veća termička stabilnost imobilisane. Prema dobijenim rezultatima (slika 4.40), do inaktivacije je došlo u jednom koraku, što ukazuje da u posmatranom periodu nije došlo do konformacionih promena unutar enzima i da se kinetika inaktivacije, prema tome može dobro opisati eksponencijalnim modelom.



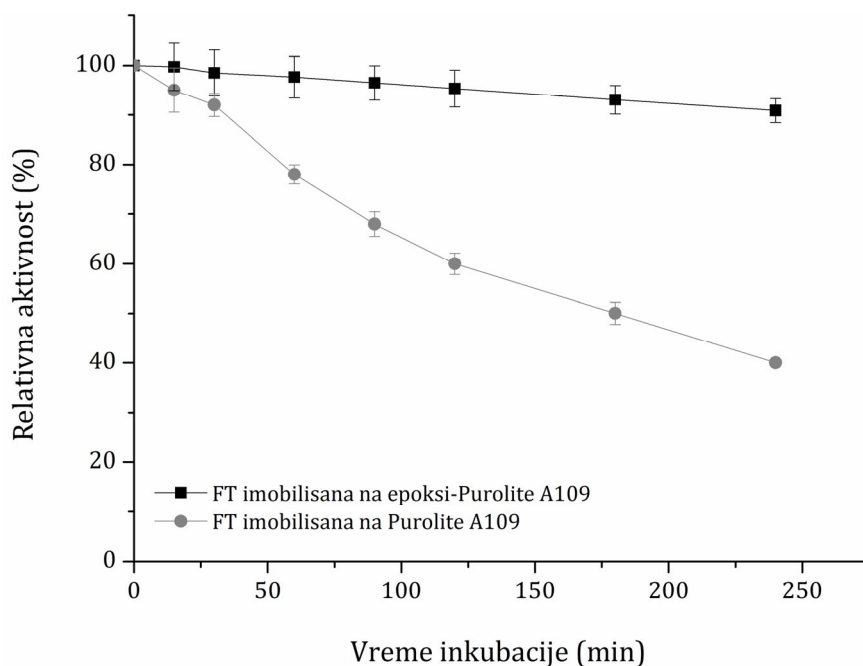
Slika 4.40. Termička stabilnost slobodne (isprekidana linija) i imobilisane FT (puna linija) na različitim temperaturama: 55 °C (■), 60 °C (▼), 65 °C (●), i 70 °C (◄)

Sagledavanjem kinetičkih parametara čije su vrednosti prikazane u tabeli 4.6 za najnižu temperaturu koja je ujedno i najbliža temperaturi reakcije (55 °C), dobijene vrednosti $t_{1/2}$ takođe ukazuju na izuzetnu termičku stabilnost imobilisane FT (1732,87 min) u poređenju sa slobodnim enzimom (95,34 min) i to sa značajnim faktorom stabilizacije od 18,17. Još važnije, i dvostruko veća energija inaktivacije za imobilisanu FT od 352,9 kJ/mol u odnosu na slobodnu FT od 174,1 kJ/mol dodatno potvrđuje termičku stabilnost imobilisanog preparata FT. Imajući u vidu i literaturne podatke o energiji inaktivacije za FT iz istog preparata na različitim nosačima koji su u opsegu od 242,2-320 kJ/mol [178, 179] možemo zaključiti da FT kovalentno imobilisana na heterofunkcionalan nosač epoksi-Purolite® A109 nesumnjivo pokazuje povećanu termičku stabilnost.

Tabela 4.6. Kinetički parametri termičke deaktivacije slobodne i imobilisane FT na modifikovani nosač

Temperatura, °C	Slobodan enzim		Imobilisan enzim	
	k_d , 1/min	$t_{1/2}$, min	k_d , 1/min	$t_{1/2}$, min
55	0,0073	95,34	0,0004	1732,87
60	0,0144	48,14	0,0030	231,05
65	0,0350	19,80	0,0270	25,67
70	0,1210	5,73	0,1040	6,66

Kako se imobilisani preparat dobijen adsorpcijom FT na nemodifikovani Purolite® A109, kojeg odlikuje katalitička aktivnost od 343 IU/g nosača, pokazao kao veoma efikasan za produkciju FOS, ispitana je i njegova termička stabilnost. Uporedni prikaz rezultata termičke stabilnosti FT imobilisane na nemodifikovani i modifikovani Purolite® A109 na temperaturi inkubacije od 55 °C, je dat na slici 4.41. Sa slike se jasno može uočiti veći pad aktivnosti za imobilisani preparat FT dobijen adsorpcijom gde je nakon 240 min inkubacije, zadržano samo 40 % početne aktivnosti.



Slika 4.41. Termička stabilnost imobilisane FT na nemodifikovani i epoksi-modifikovani Purolite® A109 na 55 °C

Takođe, za isti imobilisani preparat, vrednost $t_{1/2}$ iznosi 184,35 min za razliku od 1732,87 min u slučaju epoksi-Purolite® A109. Iako dobijena vrednost premašuje $t_{1/2}$ za slobodan enzim (95,34 min), očigledno je da dobijeni imobilisani preparat odlikuje manja termička stabilnost koja je najverovatnije posledica čiste adsorpcije enzima, dok se razvoj heterofunkcionalnog nosača prema opisanom protokolu za kovalentnu imobilizaciju pokazao potpuno opravdanim.

4.3.7. Sumiranje rezultata imobilizacije FT i dalje perspektive

U okviru ove doktorske disertacije primenjene su različite strategije imobilizacije FT koje se zasnivaju na uspostavljanju fizičkih interakcija ili kovalentnih veza između enzima i nosača. Naime, FT iz komercijalnog preparata Pectinex® Ultra SP-L imobilisana je na nosače različitih funkcionalnih svojstava, a optimizacijom procesa imobilizacije izabrani su najpogodniji uslovi čiji je sumirani prikaz dat u tabeli 4.7.

Na osnovu prikazanih rezultata može se primetiti da su u slučaju imobilizacije FT na amino-modifikovane (AFNS) i cijanuril-hloridom aktivirane amino-modifikovane nanočestice silike (CCAFNS) dobijeni imobilisani preparati izuzetno visokih katalitičkih aktivnosti (1448 i 1122 IU/g nosača, redom). Međutim, pored visoke FT aktivnosti i činjenice da nanočestice silike poseduju niz pozitivnih karakteristika (biokompatibilnost, niska toksičnost, termička stabilnost, velika specifična površina za vezivanje molekula enzima (380 m²/g), smanjena mogućnost pojave limitacija u prenosu mase i dr.) [304], zbog kojih su sklone primeni u medicini i farmaciji, [305] njihova implementacija u biotehnološkim procesima radi masovne produkcije prebiotika (FOS) je limitirana njihovom veličinom. Naime, primena nanočestica u ove svrhe i dalje predstavlja izazov i zahteva pažljiva istraživanja u pravcu razvijanja efikasnih bioreaktorskih konfiguracija prilagođenih nosačima nano dimenzija.

Pored nosača nano dimenzija, FT je imobilisana i na metakrilatne nosače mikro dimenzija iz Lifetech™ ERC serije tj. na nosač sa primarnim amino (ECR8409F) i nosač sa butil/epoksi (ECR8285F) funkcionalnim grupama. Kao i u slučaju AFNS nanočestica, visoka katalitička aktivnost imobilisane FT na amino-funkcionalizovanom nosaču ECR8409F od 1355 IU/g nosača ukazuje na snažan afinitet FT ka uspostavljanju privlačnih elektrostatičkih interakcija preko negativno naelektrisanih karboksilnih grupa enzima (asparaginska i

glutaminska kiselina) i pozitivno naelektrisanih amino grupa nosača. Prilikom imobilizacije FT na butil/epoksi ECR8285F nosač dobijen je imobilisan preparat niže katalitičke aktivnosti od 488 IU/g nosača ali uz dokazano prisustvo kovalentnih veza sa udelom od 35,25 % kao i hidrofobnih interakcija, što upućuje na dobijanje stabilnijeg imobilisanog preparata. Kao i u slučaju nanočestica, dimenzije korišćenih Lifetech™ nosača (tabela 4.2) predstavljaju takođe ograničavajući faktor njihove primene u proizvodnji FOS u postojećim reaktorskim sistemima, te stoga postoji potreba za razvojem novih reaktorskih rešenja koja će obezbediti efikasnu proizvodnju.

Tabela 4.7. Izabrani optimalni uslovi i dobijene aktivnosti imobilisanih preparata FT primenom različitih nosača

Nosač	pH i jonska jačina pufera	Vreme imob. (h)	Konc. proteina (mg/g nosača)	Aktivnost FT (IU/g nosača)
Nanočestice silike				
AFNS	6,0; 0,1 M	2,5	100	1448
CCAFNS	6,0; 0,1 M	5	100	1122
Metakrilatni nosači iz Lifetech™ ERC serije				
ECR8409F	5,0; 0,1 M	5	150	1355
ECR8285F	7,0; 1 M	24	50	488
Polistirenski makroporozni nosač				
Purolite® A109	6,0; 0,1 M	5	50	343
Polistirenski makroporozni modifikovani nosači				
GA (monomer)-Purolite® A109	4,0; 0,1 M	3	50	276
GA (dimer)-Purolite® A109	4,0; 0,1 M	7	50	371
Epoksi-Purolite® A109	4,0; 9,0	24	20	243

U nastojanju dobijanja katalitički aktivnih i stabilnih imobilisanih preparata FT sa potencijalom za primenu u dostupnim reaktorskim konfiguracijama radi proizvodnje FOS, za imobilizaciju FT primenjen je makroporozni nosač sa primarnim amino grupama Purolite® A109. Ispitivanjem uticaja pojedinačnih parametara na proces imobilizacije FT, utvrđeni su optimalni uslovi pri kojima je postignuta selektivna adsorpcija FT u odnosu na pektinaze, čime je preparat delimično prečišćen od dominantnih enzima. Maksimalna aktivnost dobijenog imobilisanog preparata FT bila je 343 IU/g nosača. Imobilisani preparat je potom primenjen u reakciji sinteze FOS u šaržnom i pneumatskom reaktoru u šaržnom režimu rada, nakon čega je u pneumatskom reaktoru ispitana i mogućnost odvijanja kontinualne proizvodnje FOS. Kontinualnim odvijanjem procesa u trajanju od 9 h, dobijen je proizvod sa udelom FOS u ukupnim šećerima od 53,0 %.

Imajući u vidu da je FT procesom adsorpcije tj. preko slabih elektrostatičkih interakcija imobilisana za makroporoznu jonoizmenjivačku smolu Purolite® A109, dalji naponi su usredsređeni ka modifikaciji nosača radi uspostavljanja kovalentnih veza i samim tim dobijanja stabilnijeg imobilisanog preparata sa potencijalom za široku industrijsku implementaciju. U vezi sa tim, Purolite® A109 nosač je modifikovan upotrebom GA i epihlorhidrina, a katalitičke aktivnosti imobilisanih preparata, u kojima je uspostavljena kovalentna veza između

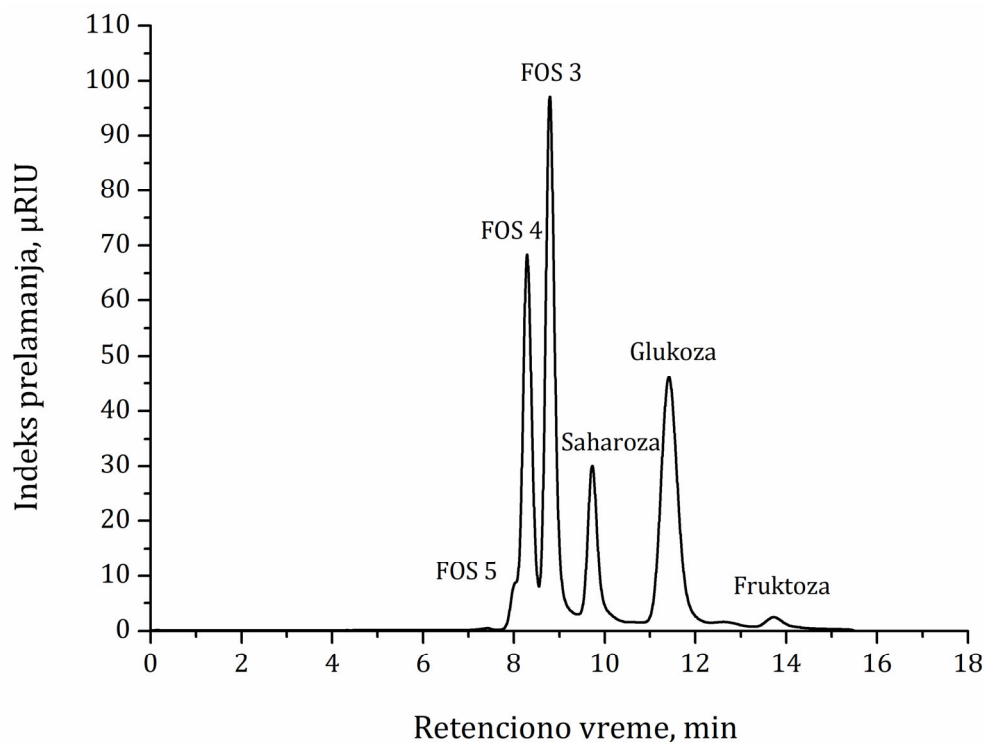
funkcionalnih grupa FT i nosača, su bile u rasponu od 243-371 IU/g nosača. Iako je među dobijenim imobilisanim preparatima najniža katalitička aktivnost od 243 IU/g nosača dobijena u slučaju epoksi-funkcionalizovanog nosača sa jedne strane, u ovom sistemu ostvarena je najveća selektivnost FT u odnosu na pektinaze, sa druge strane (tabela 4.5). Ovaj pristup kojim se obezbeđuje selektivno vezivanje ciljanog enzima je od posebnog značaja u slučaju dalje primene imobilisanog preparata FT radi biokonverzije saharoze u FOS, u proizvodima heterogenog sastava. Imobilisani preparat je takođe primenjen u reakciji sinteze FOS u šaržnom i pneumatskom reaktoru u šaržnom režimu rada, a procenom operativne stabilnosti uočeno je da je inicijalna aktivnost FT ostala nepromenjena nakon 10 reakcionih ciklusa, za razliku od imobilisanog preparata FT dobijenog primenom nemodifikovanog nosača gde je zadržana aktivnost iznosila 94 % u slučaju saržnog i 89 % u slučaju pneumatskog reaktora. Ostvareni rezultati dodatno potvrđuju potencijal epoksi-funkcionalizovanog nosača Purolite® A109 za primenu u kontinualnoj proizvodnji FOS. Realizacijom proizvodnje FOS u kontinualnom režimu rada koja se odvijala stabilno tokom 7 dana, dobijen je konačni proizvod u kojem udeo FOS iznosi 52,5%.

Nakon uspešne realizacije kontinualne proizvodnje FOS u laboratorijskim uslovima, budući koraci bi trebalo da budu usmereni ka izvodjenju ovog procesa u reaktorima većih kapaciteta, kako bi se proces sve više približio industrijskim uslovima. Takođe, priključivanje membrane za nanofiltraciju i propuštanje dobijene smeše radi odvođenja komponenti koje nemaju prebiotski karakter (mono- i disaharida) i dobijanja proizvoda veće čistoće FOS, može predstavljati efikasno rešenje za unapređenje postojećih procesa.

U vezi sa tim, u cilju procene mogućnosti prečišćavanja dobijene smeše FOS od sporednih proizvoda na laboratorijskom nivou, u narednim poglavljima ove doktorske disertacije biće prikazani rezultati primene nanofiltracije u ove svrhe.

4.4. Prečišćavanje dobijene smeše FOS nanofiltracijom

Nakon razvijanja efikasnih procesa enzimske sinteze FOS upotrebom slobodne i imobilisane FT koji imaju za cilj dobijanje smeše određenog udela FOS, izvedeni su eksperimenti prečišćavanja radi uklanjanja prisutnih sporednih proizvoda i dobijanja proizvoda što veće čistoće. Naime, smeša dobijena pod optimalnim uslovima enzimske sinteze primenom slobodne FT koju definiše sledeći sastav: 60,2 % FOS, 29,7 % monosaharida (glukoze i fruktoze) i 10,1 % saharoze u ukupnim ugljenim hidratima (slika 4.42) je podvrgnuta procesu prečišćavanja upotrebom tankoslojnih kompozitnih nanofiltracionih membrana sa različitom distribucijom pora.



Slika 4.42. Sastav sintetisane smeše određen HPLC sistemom.

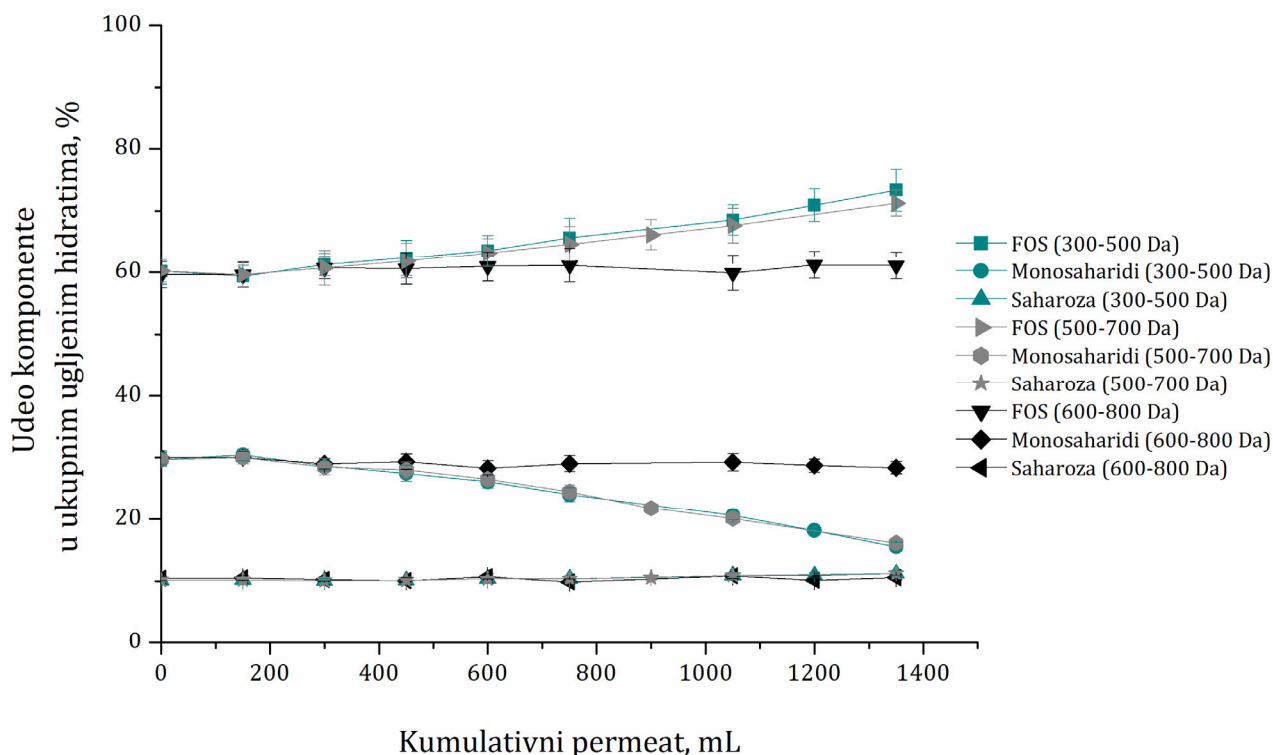
Proces nanofiltracije je izveden u režimu rada tangencijalne filtracije (cross-flow) i ima za cilj koncentrovanje i prečišćavanje sintetisane smeše, a zbog akumulacije šećernih komponenti na površini membrane, realizovan je u kombinaciji sa dijafiltracijom uz održavanje konstantne zapremine sistema. Dijafiltracija se smatra posebno pogodnom za primenu, jer pored toga što pospešuje proces prečišćavanja, poseduje i potencijal za implementiranje u industrijskim uslovima [234].

Kako je i u teorijskom delu pomenuto da određene operativne promenljive poput temperature, protoka i koncentracije mogu ostvariti različite uticaje na difuziju rastvornih supstanci, u okviru ovog poglavlja je prikazano ispitivanje uticaja pojedinačnih parametara u cilju optimizovanja propusnosti i efikasnosti prečišćavanja FOS. Najpre je izvršena selekcija najpodobnije membrane za izvođenje procesa, a nakon toga i detaljna optimizacija radnih parametara.

4.4.1. Selekcija membrane za nanofiltraciju FOS

Karakteristike membrane su od izuzetne važnosti zbog uske povezanosti sa funkcijom koja se ogleda kroz selektivnost i permeabilnost membrana [306]. Zbog odličnih svojstava koja obuhvataju mehaničku čvrstoću, kao i termičku i fizičku stabilnost, za prečišćavanje smeše u

ovom radu upotrebljene su membrane čiji je aktivni sloj sastavljen od poliamida [219]. Stoga, ispitan je uticaj propustljivosti tankoslojnih kompozitnih membrana, izražene različitim nominalnim MWCO, NFW (300-500 Da), NDX (500-700 Da) i NFG (600-800 Da) na proces prečišćavanja pri koncentraciji napojne smeše od 0,01 g/mL, protoku 22 mL/min na temperaturi od 35 °C, a dobijeni rezultati prikazani su na slici 4.43. Sa slike se može primetiti da je do selektivnog odvajanja komponenti došlo u slučaju upotrebe membrana NFW i NDX. Naime, primećen je porast sadržaja FOS sa 60,2 % na 73,3 % za NFW i 71,3 % za NDX membranu, ali i smanjenje udela monosaharida sa 29,7 % na 15,5 % i 16,2 %, redom. Takođe, jasno se može uočiti da je u slučaju upotrebe membrane sa većim porama NFG (600-800 Da) udeo ukupnih FOS, monosaharida i saharoze konstantan u ispitivanom vremenskom periodu, što upućuje na činjenicu da je otpor pri prelasku svih komponenti sistema kroz membranu gotovo zanemarljiv.



Slika 4.43. Uticaj veličine pora na proces nanofiltracije.

Pomenute promene dodatno potvrđuju i koeficijenti odbijanja koji definišu efikasnost membrane u separaciji određene komponente. Dobijeni su korišćenjem jednačina za određivanje iz retentata, ali i permeata, i prikazani u tabeli 4.8. Iz tabele se može videti da su koeficijenti odbijanja dobijeni iz retentata izostavljeni u slučaju upotrebe membrane NFG radi nelinearne raspodele podataka, i upravo iz tog razloga su u nastavku prikazani i razmatrani isključivo koeficijenti dobijeni iz permeata. Analizom dobijenih podataka, primetno je da su veoma niske vrednosti koeficijenata odbijanja za željene FOS (od 0,35 za FOS 3 do 0,55 za FOS 5) dobijene u slučaju membrane sa najvećim porama (NFG) što direktno navodi na izrazitu propusnost bioaktivnih jedinjenja pored saharoze i monosaharida, pa se prema tome ovaj membranski modul smatra neodgovarajućim za dalji rad. Razmatrajući dobijene vrednosti u slučaju membrane sa manjim porama (NFW i NDX), primetno je da postoje značajne razlike u koeficijentima za različite komponente. Sa jedne strane uočava se visoko odbijanje saharoze (0,96) i FOS (oko 1,00), a sa druge visoka propusnost monosaharida (oko 0,30).

Tabela 4.8. Koeficijenti odbijanja pojedinačnih komponenti iz smeše za prečišćavanje

Komponente	NFW (300-500 Da)		NDX (500-700 Da)		NFG (600-800 Da)	
	Retentat	Permeat	Retentat	Permeat	Retentat	Permeat
Saharoza	0,91±0,04	0,96±0,05	0,96±0,03	0,96±0,02	0,14±0,01	0,32±0,01
Monosaharidi	0,30±0,01	0,28±0,01	0,32±0,02	0,30±0,02	/	0,31±0,02
FOS 3	0,97±0,04	0,99±0,04	0,98±0,02	0,98±0,04	/	0,35±0,02
FOS 4	1,00±0,05	1,00±0,04	0,99±0,02	0,99±0,03	/	0,45±0,01
FOS 5	1,00±0,04	1,00±0,03	0,99±0,03	1,00±0,03	/	0,55±0,02

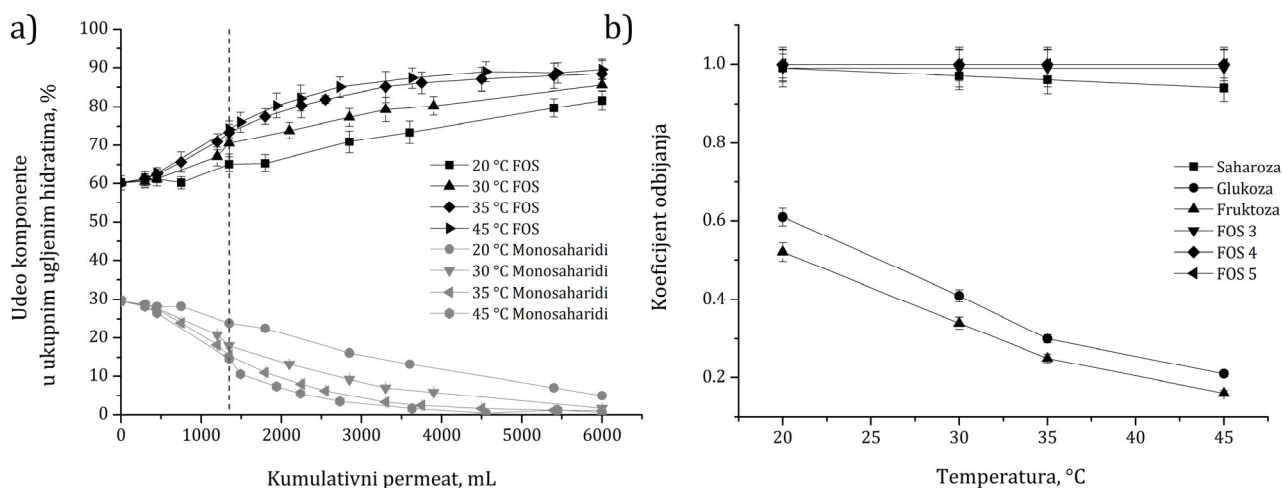
Vodeći se time da je osnovni cilj upotreba membrane koja obezbeđuje visoko zadržavanje jedinjenja većih molarnih masa i veću propusnost jedinjenja manjih molarnih masa, membrana sa najmanjom raspodelom pora NFW (300-500 Da), kod koje je propusnost monosaharida viša, je izabrana za dalji rad. Dobijene vrednosti koeficijenata odbijanja su veoma slične vrednostima koje je prijavio Kun (Kuhn) sa sar. u slučaju upotrebe poliamidne membrane NF270 sa MWCO od 400 Da [211]. Isti autori su koristili različite membrane za prečišćavanje FOS, a kao najpogodniju za separaciju izabrali su membranu sa aktivnim slojem polietersulfona (NF030, 400 Da). Naime, u poređenju sa rezultatima prikazanim u ovoj doktorskoj disertaciji, prijavili su znatno niži koeficijent odbijanja saharoze (0,58), ali i FOS (0,87) pa stoga dobijene vrednosti navode na zaključak da i pored veće propusnosti saharoze, dolazi do većih gubitaka ciljanih jedinjenja. Pored toga, membrane na bazi poliamida se smatraju i pogodnijim za upotrebu u poređenju sa polietersulfonskim membranama koje se deklarišu kao hidrofobne pa stoga otežano vezuju vodu i imaju veću sklonost ka adsorpciji rastvornih supstanci dovodeći do većeg zaprljanja i posledično kraćeg roka trajanja [205, 219]. Takođe, prečišćavanje FOS procesom nanofiltracije su izveli i Mariana i sar. upotrebom membrana sa širokom raspodelom pora (150 - 1000 Da) i izvestili da je poliamidna membrana NF270 sa jako malom veličinom pora (150 - 300 Da) zbog visokog zadržavanja FOS pogodna za upotrebu. Međutim, prijavili su i da pored FOS, u velikoj meri zadržana i jedinjenja manjih molarnih masa, čime je omogućeno jedino koncentrovanje smeše, ali ne i prečišćavanje [307].

4.4.2. Uticaj temperature na proces prečišćavanja FOS

Nakon izbora najpodobnije membrane za dalji rad, u narednom setu eksperimenata ispitan je uticaj temperature, jednog od ključnih faktora za uspešno odvijanje prečišćavanja smeše zbog uske povezanosti sa selektivnošću membrane [218]. Proces unakrsne nanofiltracije u kombinaciji sa dijafiltracijom je izveden na četiri različite temperature (20, 30, 35 i 45 °C) pri inicijalnoj koncentraciji smeše od 0,01 g/mL i protoku permeata od 22 mL/min, a dobijeni rezultati su prikazani na slici 4.44.

Profil promene čistoće FOS u retentatu (slika 4.44a) ilustruje da sa porastom temperature dolazi do porasta udela FOS, i smanjenja udela monosaharida u celom ispitivanom opsegu. Međutim, efikasnost razdvajanja se najbolje može sagledati na osnovu dobijenih koeficijenata odbijanja određenih tokom izvođenja procesa nanofiltracije. Sa grafika (slika 4.44b) se može primetiti da se najveće promene koeficijenata odbijanja dešavaju kod monosaharida i da sa porastom temperature dolazi do evidentnog smanjenja koeficijenata odbijanja. U slučaju glukoze i fruktoze primetan je nagli pad u dobijenim vrednostima, dok je kod saharoze zabeleženo blago smanjenje za razliku od FOS kod kojih su vrednosti koeficijenata ostale konstantne u ispitivanom temperaturnom opsegu. Identičan efekat promene su prijavili

Grandison i Gulas sa sar. u svojim studijama [239, 308]. Gulas i sar. su izveli prečišćavanje GOS i izvestili da sa porastom temperature ne dolazi do veće propusnosti trisaharida (rafinoze) što se može i objasniti činjenicom da porast temperature dovodi do povećanja dostupne, ali ne i stvarne veličine pora [239]. Na osnovu pomenute hipoteze mogu se objasniti i prikazane vrednosti koeficijenta odbijanja FOS u ovoj doktorskoj disertaciji. S obzirom na to da je najveća permeabilnost membrane primećena na temperaturi procesa od 45 °C zbog ostvarenih najnižih vrednosti koeficijenta odbijanja glukoze (0,21) i fruktoze (0,16), radi izbora optimalnog parametra neophodno je sagledati i celokupan proces prečišćavanja sa aspekta čistoće i ostvarenog prinosa za dobijenu smešu.



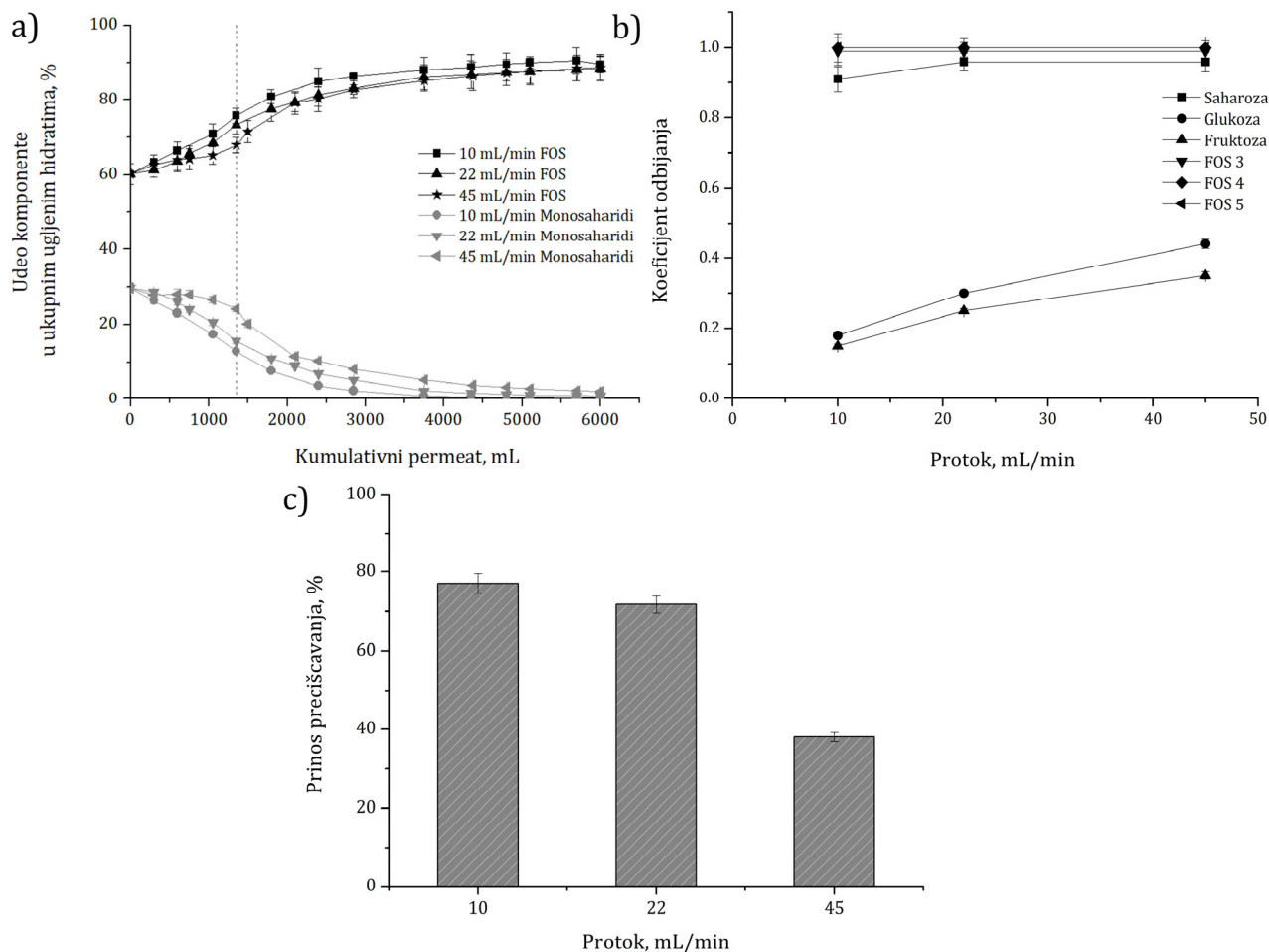
Slika 4.44. Uticaj temperature na: a) tok procesa prečišćavanja FOS b) koeficijente odbijanja

Tok prečišćavanja ilustrovan na slici 4.45a ukazuje da je najveća i skoro identična čistoća proizvoda od 73,0 % na kraju nanofiltracije i 88 % na kraju nanofiltracije sa dijafiltracijom uočena ne samo pri temperaturi 45 °C, već i 35 °C. Sagledavajući i dobijene vrednosti prinosa prečišćavanja koje iznose 71,9 % za 35 °C i i 65 % za 45 °C, može se zaključiti da pored skoro identične čistoće od 88,0 % FOS, izvođenje prečišćavanja na 35 °C zahteva nižu potrošnju energije, a ima i značajnu prednost zbog realizacije procesa sa manjim gubicima. Takođe, uzimajući u obzir i podatak proizvođača da je granična temperatura za rad sa membranom NFW (300-500 Da) 50 °C, pri čemu se i 45 °C može smatrati visokom, zbog duže funkcionalnosti membrane temperatura 35 °C predstavlja pogodniji izbor. Čao i sar. su takođe prečišćavali smešu FOS korišćenjem NF 5 membrane i prijavili visoku čistoću proizvoda od 92,3 % FOS, ali i znatno niži prinos prečišćavanja od 58,8 % izvođenjem nanofiltracije na 45 °C [243]. Prema tome, kako je osnovni cilj razvijanje ekonomski opravdanog i efikasnog procesa prečišćavanja, temperatura procesa od 35 °C je izabrana za dalji rad.

4.4.3. Uticaj protoka permeata na proces prečišćavanja FOS

Brzina kojom se odvija proces prečišćavanja je od velikog značaja za razvoj efikasnih i ekonomski održivih procesa. Prema tome, prečišćavanje FOS je izvedeno pri različitim protocima permeata (10-45 mL/min) na temperaturi od 35 °C i pri inicijalnoj koncentraciji smeše od 0,01 g/mL, a dobijeni rezultati su prikazani grafički na slici 4.45. Sa grafika koji ilustruje promenu udela komponenti trajanjem procesa, može se primetiti da izvođenjem nanofiltracije u unakrsnom režimu rada kojom se postiže i koncentrovanje i prečišćavanje dolazi do vidnih promena u sastavu smeše koja se prečišćava. Naime, primetno je da pri najnižem protoku (10 mL/min) kome odgovara i najniži pritisak (od 0,6 do 1,6 bar) dolazi do najvećih promena u udelu FOS (od 60,2 % do 75,7 % FOS), dok je neznatno niži udeo od 73,35 % FOS primećen pri protoku 22 mL/min (promena pritiska od 1,0 do 1,8 bar), a najniži od 67,9 % FOS pri najvećem ispitanom protoku od 45 mL/min (promena pritiska od 2,0 do

3,7 bar). Ostvarene rezultate potvrđuju i dobijeni koeficijenti odbijanja za ovu fazu procesa (slika 4.45b).



Slika 4.45. Uticaj protoka permeata na: a) tok procesa prečišćavanja FOS b) koeficijente odbijanja c) prinos prečišćavanja.

Naime, primetno je da sa porastom protoka dolazi i do linearnog porasta koeficijenata odbijanja monosaharida (glukoze i fruktoze). U slučaju disaharida (saharoze) je primećen blagi porast nakon čega je postignuta stagnacija, dok koeficijenti odbijanja FOS zadržavaju konstantnu vrednost duž celog ispitivanog opsega. Ovakav efekat je bio i očekivan s obzirom na to da sa porastom protoka (koji je u linearnoj zavisnosti sa pritiskom), dolazi do značajnog povećanja pritiska, a ujedno i do kompresije same membrane posledično dovodeći do smanjenja prisutnih pora i povećanja koeficijenata odbijanja propusnih molekula [308]. Identičan trend promene koeficijenata odbijanja su prijavili i Gulas i sar. nakon izvođenja unakrsne filtracije smeše fruktoze, saharoze i rafinoze upotrebom celulozno-acetatne membrane (NF-CA-50) i tankoslojnih kompozitnih membrana (DS-5-DL i DS-GE) [239].

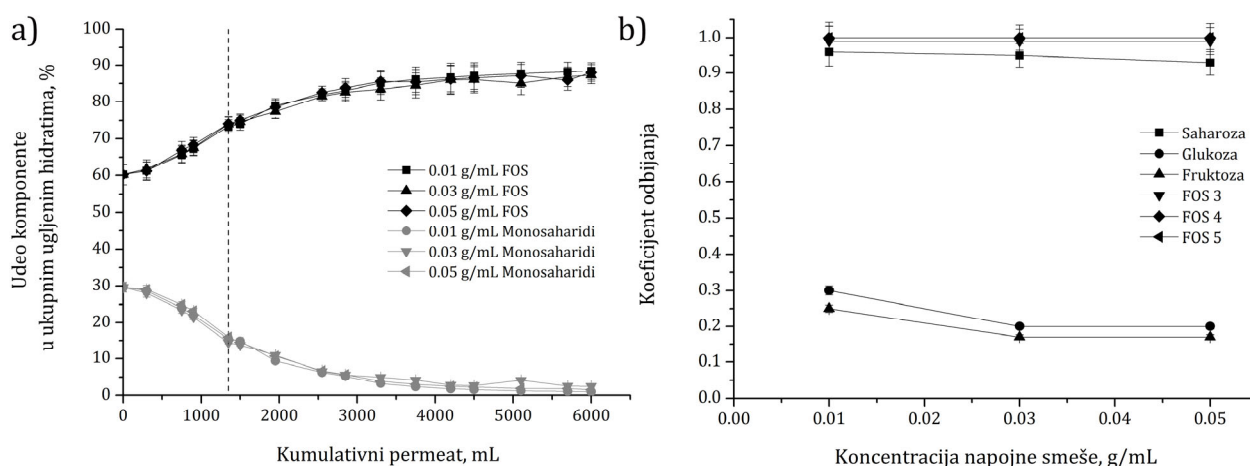
Posmatrajući čitav tok procesa prečišćavanja FOS koji nakon izvođenja nanofiltracije uključuje i dijafiltraciju (slika 4.46a), primetno je da je najveća čistoća od 89,6 % FOS dobijena pri protoku 10 mL/min, dok su smeše sa neznom razlikom u čistoći od 88,4 % FOS i 88,7 % FOS dobijene u slučaju primene protoka od 22 i 45 mL/min, redom. Efikasnost pomenutih procesa bliže određuje i vreme trajanja procesa prečišćavanja. Iako je najčistiji proizvod dobijen pri najnižem protoku sistema (10 mL/min), vreme trajanja procesa (10 h) je 1,5 puta duže u poređenju sa trajanjem prečišćavanja pri 22 mL/min čime su i operativni troškovi znatno viši.

Proces najkraćeg trajanja je izveden pri najvećem primenjenom protoku (dužina trajanja 2 h i 13 min), ali pri izboru optimalnog parametara izuzetno je važno sagledati i prinos prečišćavanja (slika 4.45c). Prinos prečišćavanja pri protoku od 45 mL/min je dvostruko niži u poređenju sa ostvarenim prinosima od 77 % (10 mL/min) i 71,75 % (22 mL/min), i iznosi 38 %. Prema tome, protok permeata od 22 mL/min, kojim se ostvaruje i visoka čistoća proizvoda i prinos prečišćavanja uz umereno vreme trajanja procesa, je izabran za dalji rad.

4.4.4. Uticaj koncentracije napojne smeše na proces prečišćavanja FOS

Koncentracija ukupnih komponenti koje su sastavni deo smeše za prečišćavanje utiče na permeabilnost i selektivnost membrane, kao i na rok upotrebe membranskog modula, pa stoga ovaj parametar takođe treba pažljivo razmotriti kako bi se obezbedilo što efikasnije prečišćavanje [218]. Izvedeni su eksperimenti u kojima su testirane različite početne koncentracije ukupnih ugljenih hidrata u početnoj smeši (0,01, 0,03 i 0,05 g/mL) pri protoku permeata od 22 mL/min na temperaturi od 35 °C, a profil promene čistoće proizvoda odvijanjem procesa prečišćavanja je prikazan na slici 4.46.

Razmatrajući tok celokupnog procesa separacije (slika 4.46a) uočavaju se neznatne promene u sastavu FOS i monosaharida. Detaljnijim razmatranjem koeficijenata odbijanja može se jasnije sagledati proces nanofiltracije upotrebljenih smeša. Dakle, sa grafika koji ilustruje promenu koeficijenata odbijanja pojedinačnih komponenti odvijanjem nanofiltracije primetno je da sa porastom unete koncentracije dolazi do blagog smanjenja koeficijenata odbijanja saharoze, glukoze i fruktoze. U slučaju FOS, uočava se da promene koncentracije inicijalne smeše nemaju značajan uticaj. Pomenuto zapažanje je u skladu sa prijavljenim podacima Atanasija Gulas i sar. koji su izveli prečišćavanje komercijalne smeše Vivinal®GOS upotrebom širokog spektra početnih koncentracija i prijavili izraženije smanjenje propusnosti molekula manjih molarnih masa poput glukoze i laktoze [239]. Prema podacima sa grafika (slika 4.46b) prikazanim u ovoj disertaciji uočava se da povećanje koncentracije saharoze od 0,01 do 0,03 g/mL rezultira smanjenjem koeficijenata odbijanja glukoze (sa 0,30 na 0,17) i fruktoze (sa 0,25 na 0,17), kao i da daljim povećanjem koncentracije, vrednosti koeficijenata ostaju nepromenjene. Ova stagnacija može biti posledica fenomena koji je poznat kao koncentraciona polarizacija tj. akumulacija komponenti iz smeše na samoj površini membrane u vidu graničnog sloja koji stvara dodatni otpor prilikom strujanja [219, 309].



Slika 4.46. Uticaj početne koncentracije ukupnih ugljenih hidrata početne smeše na: a) tok procesa prečišćavanja FOS b) koeficijente odbijanja. Eksperimenti su izvedeni korišćenjem smeša različitih početnih koncentracija ukupnih ugljenih hidrata (0,01-0,05 g/mL) pri protoku permeata od 22 mL/min na temperaturi od 35 °C.

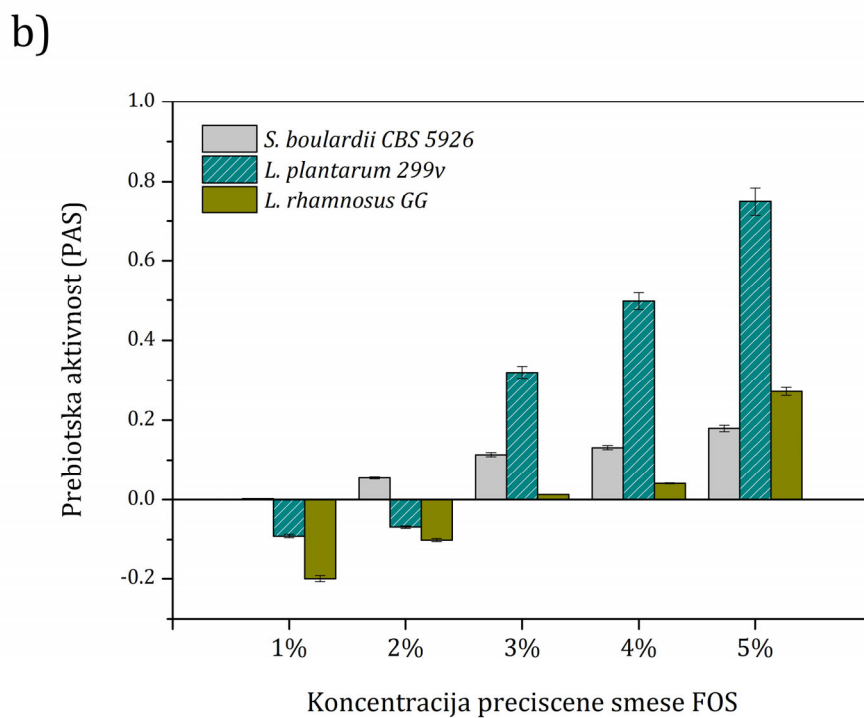
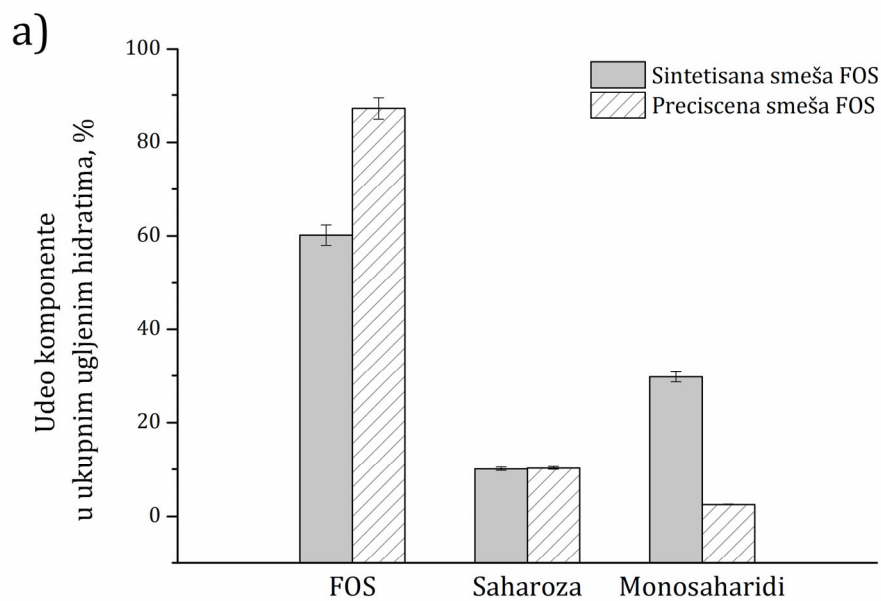
Sagledavajući tok celokupnog procesa prečišćavanja (slika 4.46) uočava se identičan trend promene sastava smeše pri različitim početnim koncentracijama. Naime, na kraju procesa nanofiltracije u retentatu su pri koncentraciji 0,01, 0,03 i 0,05 g/mL dobijene smeše čistoće FOS iznad 73 %. Daljim odvijanjem procesa tj. uvođenjem i dijafiltracije dobijene su takođe smeše slične čistoće (88,4 % za 0,01 g/mL, 87,2 % za 0,03 g/mL i 87,3 % za 0,05 g/mL). Pored skoro identičnih faktora prečišćavanja (1,47 za 0,01 g/mL i 1,46 za preostale dve koncentracije) dobijeni su i prinosi prečišćavanja oko 70 % za sve testirane koncentracije. Uzimajući u obzir primarni cilj ove doktorske disertacije koji podrazumeva razvoj održivog procesa sa minimalnim gubicima, prema dobijenim podacima koji su gotovo identični za sve tri koncentracije sa aspekta čistoće i prinosa, koncentracija 0,03 g/mL je izabrana kao optimalni parametar. Izbor pomenute koncentracije je rezultat dosadašnjih saznanja koja navode da pored toga što izvođenje procesa upotrebom veće koncentracije dovodi do većeg proizvodnog kapaciteta, dovodi i do zaprljanja membrane (pojava graničnog sloja) koje je praćeno i pojavom visokih pritisaka koji posledično mogu dovesti do oštećenja membrane.

Dakle, pod utvrđenim optimalnim uslovima koji uključuju temperaturu od 35 °C, protok permeata od 22 mL/min i inicijalnu koncentraciju ukupnih ugljenih hidrata napojne smeše od 0,03 g/mL, po završetku procesa prečišćavanja upotrebom tankoslojne kompozitne poliamidne membrane NFW (MWCO 300-500 Da), dobijena je smeša sledećeg sastava: 87,2 % FOS, 10,3 % saharoze i 2,5 % monosaharida. Kun (Kuhn) i sar. [231] su izvođenjem separacije oligosaharida, prijavili nižu čistoću proizvoda (80,0 % FOS), dok je dobijena vrednost čistoće FOS u ovoj disertaciji u skladu sa drugim prijavljenim literaturnim vrednostima [198, 211].

4.4.5. Prebiotski potencijal prečišćene smeše

Primenom sintetisane smeše FOS (slika 4.42) i nakon detaljne optimizacije procesa prečišćavanja dobijena je prečišćena smeša definisanog sastava (87,2 % FOS, 10,3 % saharoze i 2,5 % monosaharida)(slika 4.47a) koja je dalje upotrebljena za procenu prebiotskog potencijala. U tu svrhu, korišćene su probiotske kulture poput *L. plantarum* 299v, *L. rhamnosus* GG i *S. boulardii* CBS 5926, ali i kulture komensalne bakterije *E. coli* ATCC 25922, koja je u ovom radu korišćena kao indikatorski soj patogenih vrsta. Testirane su različite koncentracije prečišćene smeše (1,0-5,0 % (w/v)) na rast pomenutih mikroorganizama, a ostvaren rezultat prebiotske aktivnosti (PAS) je prikazan na slici 4.47b.

Sa slike 4.47b se može uočiti da je primenom probiotskih sojeva *L. plantarum* 299v i *L. rhamnosus* GG prebiotski efekat registrovan jedino kod većih ponuđenih koncentracija prebiotika (3,0-5,0 %), dok u slučaju primene *S. boulardii* CBS 5926 postoji u celom ispitivanom opsegu. Dobijene vrednosti navode na zaključak da je izraženiji prebiotski efekat primećen u slučaju bakterijskog soja *L. plantarum* 299v u poređenju sa korišćenim sojem kvasca. Najbolji rezultati prebiotske aktivnosti za bakterijske sojeve *L. plantarum* 299v i *L. rhamnosus* GG iznose 0,75 i 0,27 i ostvareni su pri najvećoj ponuđenoj koncentraciji (5,0 %), dok pri identičnim uslovima vrednost prebiotske aktivnosti za *S. boulardii* CBS 5926 iznosi 0,18. Ostvaren negativan efekat pri niskim koncentracijama prečišćene smeše FOS na probiotske bakterijske kulture su takođe prijavili i Hubner (Huebner) i sar. u svojoj naučnoj studiji [310]. Oni su ispitivali funkcionalnu aktivnost dostupnih komercijalnih smeša (NutraFlora P-95 i Raftilose P95) koje u svom sastavu imaju više od 95 % FOS, na rast specifičnih bakterijskih sojeva laktobacila i bifidobakterija i izvestili da je primenom pomenutih smeša u koncentraciji od 1,0 %, primećen negativan efekat kod soja *L. plantarum* 12006, ali i pozitivan za soj *L. plantarum* 4008 i zaključili da se rast sojeva unutar iste vrste značajno može razlikovati za isti prebiotik [310].



Slika 4.47. a) Sastav sintetisane i prečišćene smeše FOS b) Prebiotska aktivnost probiotskih kultura gajenih pri različitim koncentracijama prečišćene smeše FOS

4.5. Procena prebiotskog potencijala prečišćene smeše u *in vitro* TIM-2 modelu

Ispitivanja visokoprečišćene smeše kratkolančanih FOS (87,2 %) na rast pojedinačnih predstavnika probiotskih mikroorganizama u prethodnim mikrobiološkim eksperimentima (poglavlje 4.4.5) ukazala su na prebiotski potencijal FOS. Sa ciljem pouzdanije procene prebiotskog potencijala pomenute smeše ispitivanja su izvedena u kompjuterski kontrolisanom *in vitro* TIM-2 modelu koji simulira okruženje ljudskog debelog creva.

U dinamičkom TIM-2 sistemu ispitivane su promene u sastavu i aktivnosti bakterija primenom fekalnih uzoraka zdravih osoba nakon dodatka testiranih supstrata. Hranljiva podloga suplementirana sa 7,5 g smeše FOS (52,2 % FOS 3, 33,6 % FOS 4 i 1,3 % FOS 5) i kontrolna podloga su dodavane u jedinice TIM-2 modela svaka 24 h tokom 72 h trajanja fermentacionog eksperimenta. Kontrolna hranljiva podloga sastojala se iz standardog medijuma SIEM, kompleksne smeše ugljenih hidrata (pektina, arabinogalaktana, amilopektina, ksilana i skroba), proteina, vitamina i minerala neophodnih za rast crevnih bakterija [311]. Modifikovani SIEM koji ne sadrži ugljene hidrate korišćen je za pripremu hranljive podloge u uzorcima suplementiranim smešom FOS. Efekat FOS na bakterije procenjen je ispitivanjem longitudinalnih promena u diverzitetu, zastupljenosti i aktivnosti bakterija i poređenjem rezultata sa kontrolnim uzorkom.

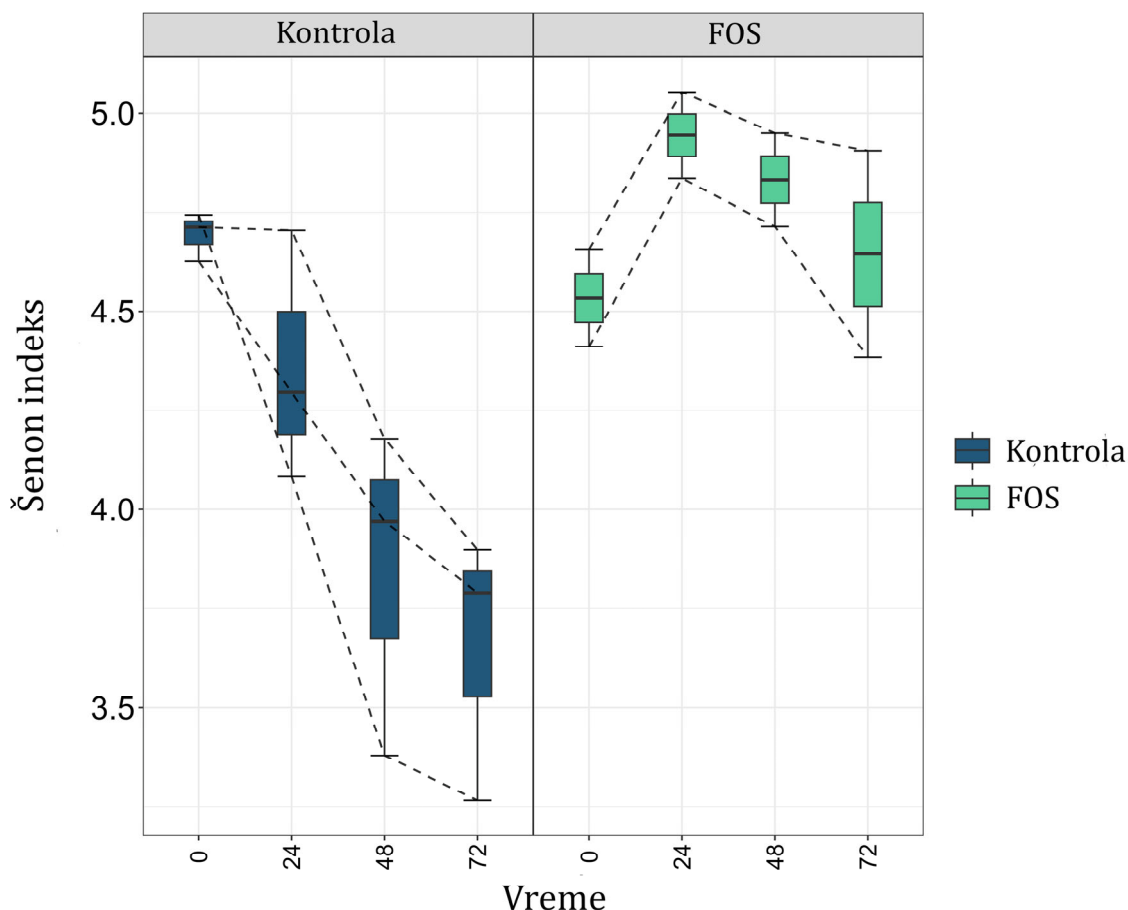
Za procenu sastava mikrobiote, DNK je ekstrahovana iz uzoraka lumena koji su prikupljeni svaka 24 h iz TIM-2 jedinica. Korišćenjem dobijenih uzoraka DNK, umnožen je i sekvenciran V₃-V₄ region 16S rRNK kodirajućeg gena na Illumina MiSeq uređaju. Dodatno, aktivnost crevnih mikroorganizama procenjena je ispitivanjem proizvodnje masnih kiselina kratkog lanca (SCFA), razgranatih masnih kiselina (BCFA) poput izo-buterne i izo-valerijanske kiseline, a procenjena je i produkcija valerijanske i kapronske kiseline.

Uzorci sa smešom FOS ispitivani su u duplikatu, dok su kontrolni uzorci analizirani u triplikatu. Tokom 72 h eksperimenta analizirano je 20 uzoraka, u kojima je identifikovano ukupno 2.081.732 sekvenci, sa medijanom od 72.032 sekvenci po uzorku. Identifikovane sekvence su klasifikovane u 1569 ASV jedinica koje su identifikovane i poređene sa SILVA bazom [257]. Rezultati su pokazali da su u ispitivanim uzorcima detektovane bakterije koje se mogu svrstati u 227 rodova iz 81 bakterijske porodice.

Mikrobiota je ispitivana analiziranjem diverziteta i promena relativnih zastupljenosti bakterija na više taksonomskih nivoa. Za ispitivanje razlika u diverzitetu i sastavu mikrobiote među testiranim grupama korišćen je linearni model za analizu diferencijalne zastupljenosti (*eng. Linear model for Differential Abundance analysis, LinDA*) iz *MicrobiomeStat* R paketa. Takođe izvršena je Spearmanova korelaciona analiza kako bi se utvrdila povezanost između određenih pripadnika mikrobiote sa produkcijom organskih kiselina.

4.5.1. Alfa i beta diverzitet

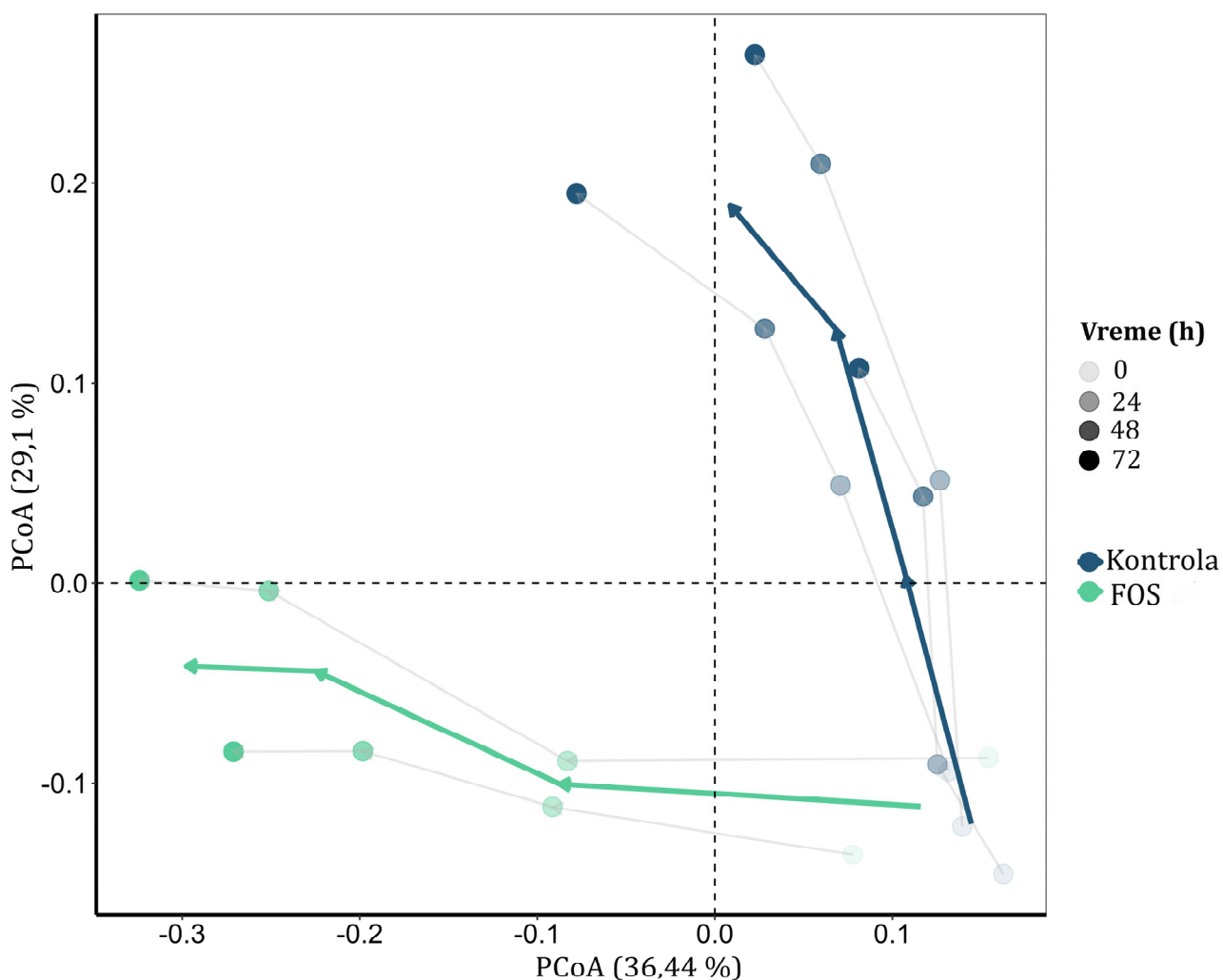
Za ispitivanje strukture mikrobog ekosistema određivani su različiti parametri za procenu alfa i beta diverziteta. Alfa diverzitet je analiziran računanjem Šenon (*eng. Shannon*) indeksa (poglavlje 3.2.16.4.1, jednačina 26), koji uzima u obzir raznovrsnost i ravnomernost distribucije taksona u okviru mikrobni zajednica [260]. Uticaj suplementacije FOS na alfa diverzitet ispitivan je upoređivanjem razlika u vrednostima Šenon indeksa u pojedinačnim vremenima između grupa (slika 4.48).



Slika 4.48. Longitudinalni prikaz promene alfa diverziteta (Šenonov indeks) kontrolnog i uzorka suplementiranog sa FOS pri različitim vremenima uzorkovanja (0-72 h)

Dobijeni rezultati ukazuju na veći alfa diverzitet mikrobnih zajednica uzoraka kojima je dodata smeša FOS, u odnosu na kontrolne uzorke. U uzorcima sa FOS dobijene su veće vrednosti Šenon indeksa nakon 48 i 72 h, na granici statističke značajnosti ($p=0,054$ i $p=0,052$, redom). Kod kontrolnih uzoraka zabeležen je konstantan pad vrednosti alfa diverziteta tokom trajanja eksperimenta (0-72 h), dok su uzorci suplementirani smešom FOS pokazali inicijalan rast alfa diverziteta (24 h) koji je praćen blagim padom u daljem toku eksperimenta. Pad vrednosti alfa diverziteta tokom trajanja eksperimenta može se objasniti uticajem samog *in vitro* sistema, kao pojednostavljenog modela gastrointestinalnog okruženja [311].

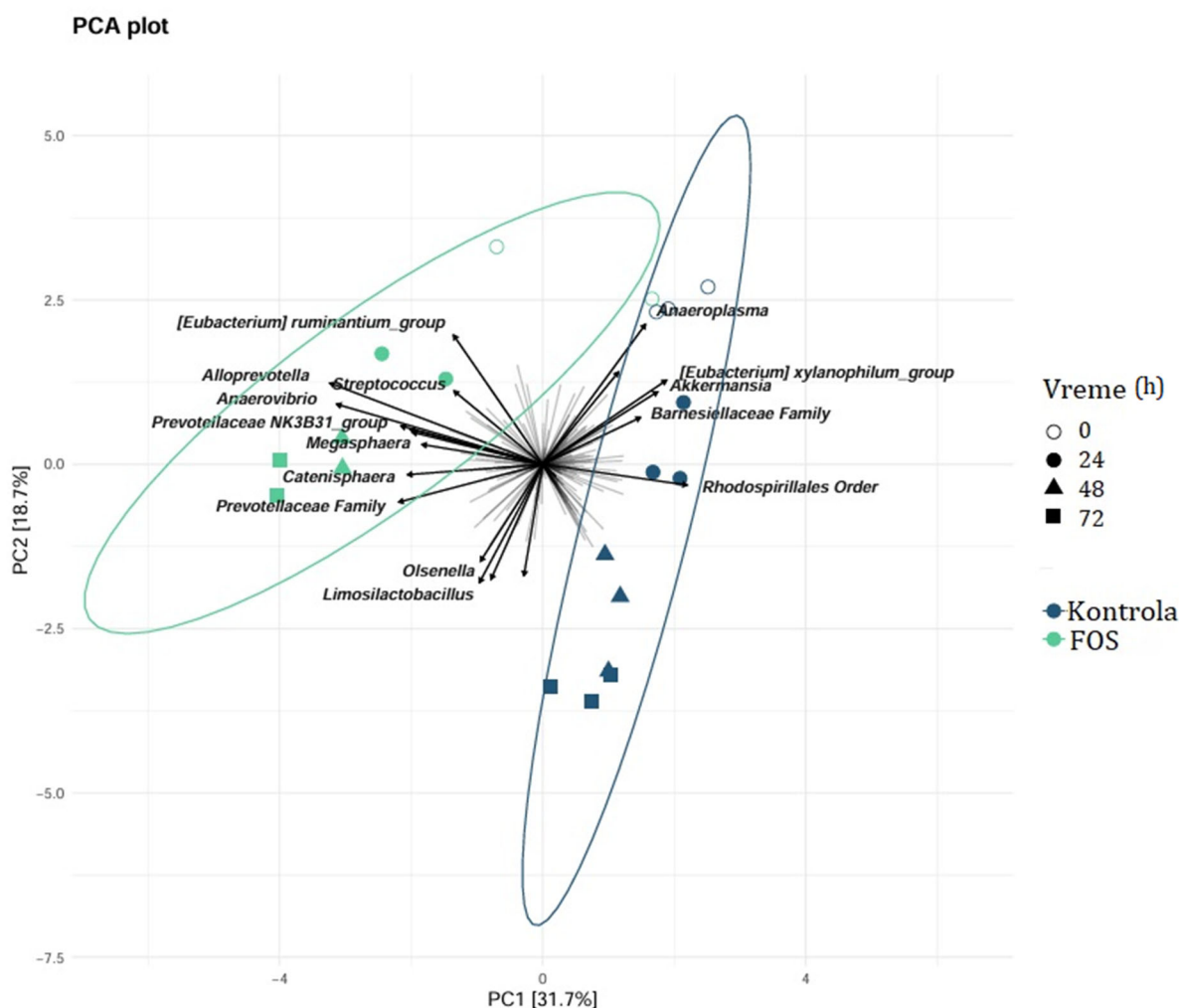
U okviru ove doktorske disertacije određen je i beta diverzitet, kao mera razlike sastava mikrobnih ekosistema. Beta diverzitet testiranih uzoraka je procenjen na osnovu izračunavanja ponderisanih UniFrac distanci (*eng. Weighted UniFrac*). Procenom beta diverziteta pomoću UniFrac distanci uzima se u obzir i filogenetski odnos između bakterija [312]. Promene u vrednostima ponderisanih UniFrac distanci tokom vremena grafički su predstavljene pomoću analize glavnih koordinata (*eng. Principal Coordinate Analysis, PCoA*) i prikazane na slici 4.49. Sa grafika se može uočiti da su uzorci u nultom trenutku relativno bliski, kao i da trajanjem eksperimenta dolazi do značajne razlike između ispitivanih uzoraka.



Slika 4.49. Longitudinalni prikaz promene beta diverziteta (Weighted-UniFrac) kontrolnog i uzorka suplementiranog sa FOS

Razlika u beta diverzitetu između testiranih uzoraka ispitana je primenom permutacione multivarijantne analize varijanse (eng. *Permutational multivariate analysis of variance*, PERMANOVA). Rezultati PERMANOVA testa ukazuju na postojanje statistički značajne razlike u beta diverzitetu između FOS i kontrolnih uzoraka ($p=0,001$). Takođe, uočena je i značajna razlika u beta diverzitetu između ispitanih vremenskih tačaka ($p=0,001$).

Značajna diferencijacija u distancama beta diverziteta između uzoraka uočava se i grafičkom vizuelizacijom pomoću analize glavnih komponenti (PCA) sa CLR (eng. *Centered Log-Ratio*) transformisanim relativnim zastupljenostima rodova (slika 4.50). Uočavanje jasno diferenciranih klastera između testiranih uzoraka ukazuje na razlike u strukturi mikrobne zajednice između kontrole i prečišćene smeše FOS, čime je dokazan efekat suplementacije FOS, saharoze i monosaharida, koji su takođe deo prečišćene smeše, ali i efekat nedostatka drugih ugljenih hidrata, koji su deo kontrolnog uzorka (SIEM), u uzorku sa prečišćenom smešom FOS. Slične zaključke izneli su i Migez (Míguez) i sar. u svojoj studiji i izvestili da je suplementacija FOS, kao i POS podstakla slične promene u strukturi mikrobne zajednice u odnosu na kontrolni uzorak (SIEM) koji je rezultirao drugačijom mikrobnom strukturom [311].



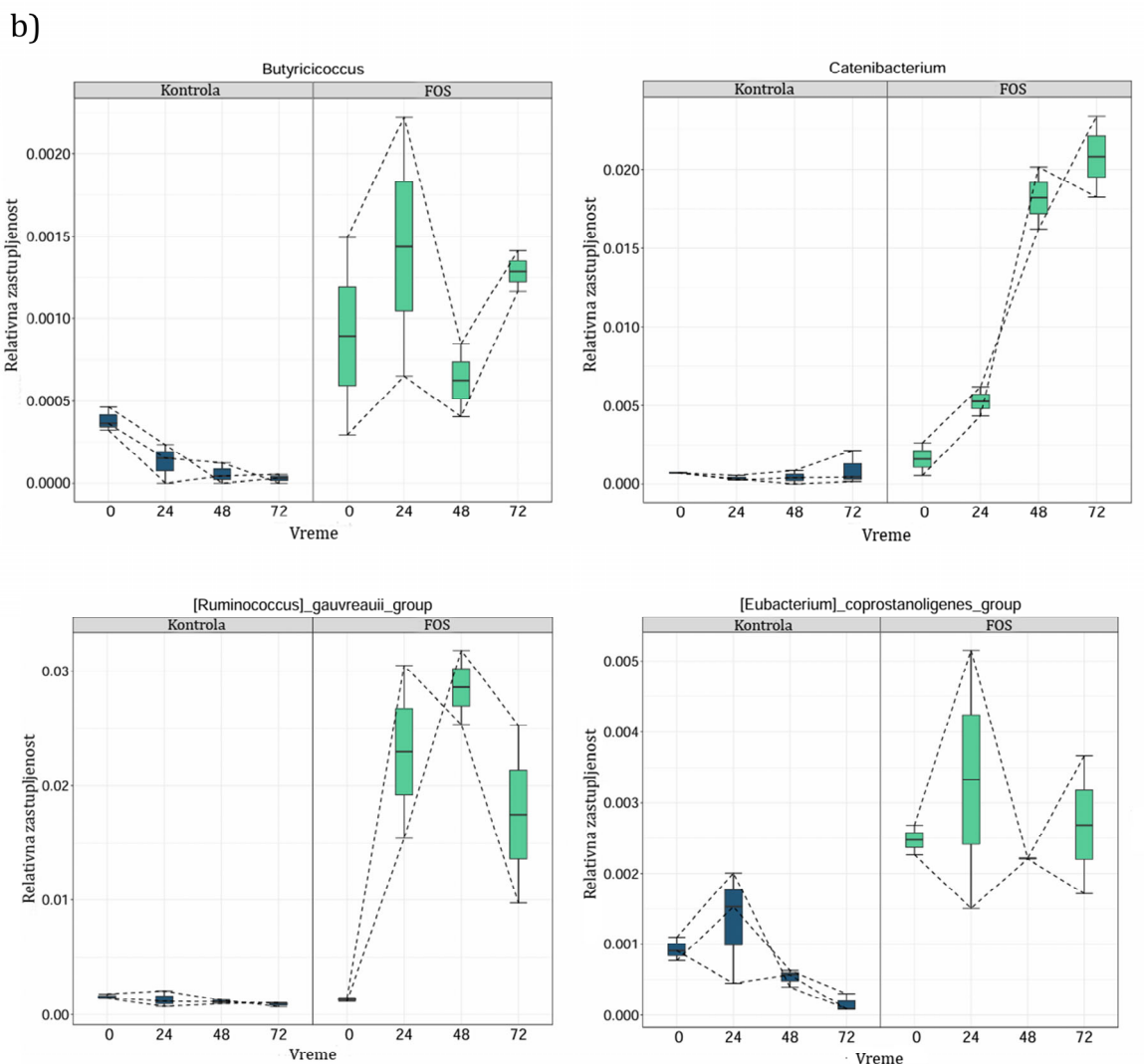
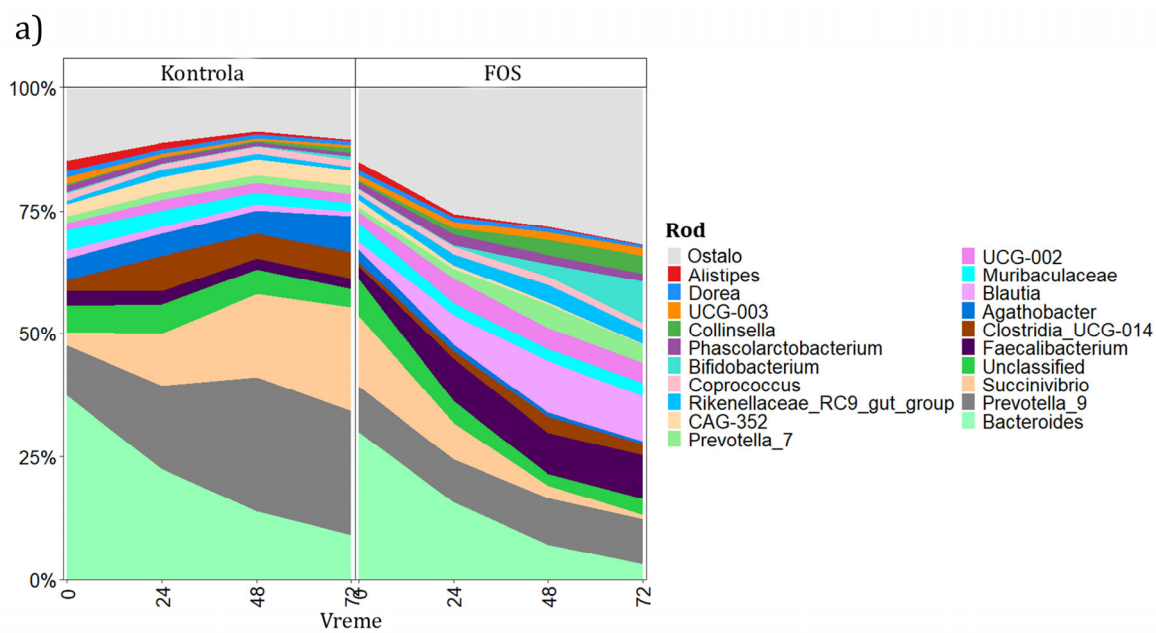
Slika 4.50. Beta diverzitet mikrobiote kontrolnog i uzorka suplementiranog sa FOS pri različitim vremenima uzorkovanja (0-72 h)

4.5.2. Analiza mikrobnog sastava

Imajući u vidu prethodne parametre koji ukazuju da suplementacija FOS modulira crevnu mikrobiotu, radi dobijanja opsežnijih informacija o konkretnim promenama bakterijskih organizama, izvedena je i analiza mikrobnog sastava.

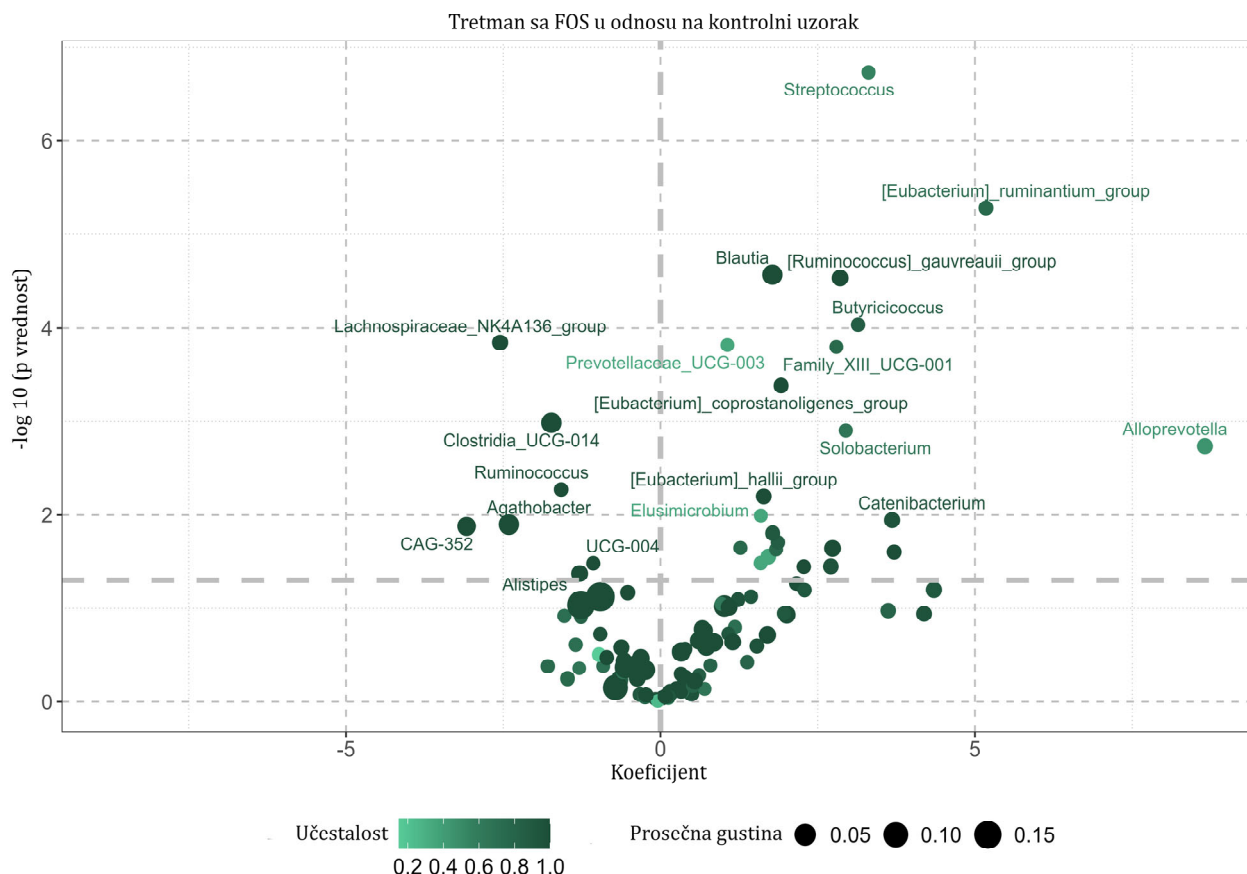
Utvrđeno je da su u mikrobioti prisutnoj u TIM-2 modelu najdominantniji bakterijski tipovi *Bacteroidota* (stari naziv *Bacteroidetes*), *Bacillota* (stari naziv *Firmicutes*) i *Proteobacteria*, kojima pripada preko 90 % ukupno identifikovanih bakterija. Među najzastupljenijim porodicama identifikovane su *Prevotellaceae*, *Bacteroidaceae*, *Clostridia*, *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* i *Succinivibrionaceae*, a od dominantnih rodova *Bacteroides*, *Prevotella*, *Faecalibacterium*, *Blautia* i *Succinivibrio*.

Dodatak kratkolančanih FOS tokom 72 h trajanja eksperimenta u dinamičkom TIM-2 sistemu rezultiralo je značajnim promenama u sastavu mikrobnih zajednica. Opšti prikaz promene relativne zastupljenosti 20 najzastupljenijih bakterijskih rodova tokom vremena, u kontrolnim i uzorcima suplementiranim smešom FOS, prikazan je na slici 4.51a. Rezultati ukazuju na značajne promene sastava mikrobiote tokom trajanja ekperimenta koje se mogu uočiti u obe testirane grupe.



Slika 4.51. a) Bakterijski sastav kontrolnog i uzorka suplementiranog sa FOS pri različitim vremenima uzorkovanja (0-72 h) prikazana na nivou roda b) Grafik longitudinalne promene relativnih zastupljenosti bakterijskih rodova koji su pokazali značajnu različitost između testiranih supstrata

U cilju utvrđivanja efekta FOS na pripadnike crevne mikrobiote u odnosu na kontrolni uzorak, ispitivane su promene u sastavu mikrobiote na različitim taksonomskim nivoima, a za normalizaciju podataka korišćen je metod ukupnog zbira (*eng. TSS – Total Sum Scaling*). Diferencijalna analiza je izvršena korišćenjem Association testa i LinDA metode u okviru MicrobiomeStat R paketa. Razlika u relativnoj zastupljenosti bakterija između testiranih uzoraka procenjena je upoređivanjem srednjih vrednosti relativnih rastupljenosti taksonomskih grupa određenih nakon 24, 48 i 72 h (Association test). Longitudinalne varijacije u pojedinim diferencijalno zastupljenim rodovima bakterija prikazane su na slici 4.51b, dok su pomoću grafika vulkanskog tipa vizuelizovani rezultati diferencijalne analize, slika 4.52.



Slika 4.52. Vulkanski tip grafičkog prikaza asocijacionog testa koji pokazuje longitudinalnu promenu relativne zastupljenosti različitih bakterijskih rodova u prisustvu FOS u odnosu na kontrolni uzorak. Levo od osnovne vertikalne ose prikazani su inhibirani bakterijski rodovi, dok su sa desne strane prikazani stimulirani bakterijski rodovi primenom FOS u odnosu na kontrolni uzorak. Duž vertikalne ose menja se i značajnost promene, pa je prema tome od dna ka vrhu statistički značajnija promena bakterija.

Na osnovu rezultata diferencijalne analize uočava se da je suplementacija FOS rezultirala statistički značajnom stimulacijom rasta crevnih bakterija iz sledećih porodica ($q < 0,05$): *Lachnospiraceae* (rod *Blautia*), *Eubacteriaceae* (rodovi *Eubacterium ruminantium grupa* i *Eubacterium coprostanoligenes grupa*), *Butyricoccaceae* (rod *Butyricoccus*), *Oscillospiraceae* (rod *Ruminococcus gauvreauii grupa*), *Streptococcaceae* (rod *Streptococcus*), *Prevotellaceae* (rodovi *Alloprevotella* i *Prevotellaceae UCG-003*) i *Erysipelotrichaceae* (rod *Solobacterium*). Takođe, dobijeno je da su na granici statističke značajnosti stimulirane i bakterije iz roda *Eubacterium hallii grupe*, *Catenibacterium* kao i *Marvinbryantia*. Statistički značajna inhibicija nakon dodatka FOS primećena je kod bakterija iz *Lachnospiraceae NK4A136 group*, *Clostridia*

UCG-014, i *Ruminococcus*. Dobijeni koeficijenti i tačne q vrednosti association testa za pomenute bakterijske rodove, navedene su u tabeli 4.9.

Tabela 4.9. Prikaz ostvarenih koeficijenata i konkretnih q vrednosti association testa za pojedine bakterijske rodove

Porodica	Rod	Koeficijent	q vrednost
<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Blautia</i>	1,78	0,00081
	<i>Marvinbryantia</i>	1,78	0,09083
	<i>Lachnospiraceae NK4A136 grupa</i>	-2,55	0,00222
<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Eubacterium ruminantium grupa</i>	5,18	0,00029
	<i>Eubacterium coprostanoligenes grupa</i>	1,92	0,00508
	<i>Eubacterium hallii grupa</i>	1,64	0,05009
<i>Butyricicoccaceae</i>	<i>Butyricoccus</i>	3,14	0,00202
<i>Oscillospiraceae</i>	<i>Ruminococcus gauvreauii grupa</i>	2,86	0,00081
	<i>Ruminococcus</i>	-1,58	0,04543
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>	3,31	2,03E-05
<i>Prevotellaceae</i>	<i>Alloprevotella</i>	8,66	0,01680
	<i>Prevotellaceae UCG-003</i>	1,06	0,00222
<i>Erysipelotrichaceae</i>	<i>Solobacterium</i>	2,95	0,01251
<i>Coprobacillaceae</i>	<i>Catenibacterium</i>	3,68	0,07831
<i>Clostridiaceae</i>	<i>Clostridia UCG-014</i>	-1,74	0,01136

Među korisnim bakterijama koje doprinose fermentaciji dijetalnih vlakana i koje se smatraju vodećim producentima SCFA ubrajaju se bakterije iz roda *Blautia*, *Butyricoccus* [313], pojedini pripadnici roda *Eubacterium* (*Eubacterium_ruminantium grupe* i *Eubacterium_hallii grupe*) [314], *Catenibacterium* [315], *Prevotellaceae UCG-003* i *Alloprevotella* [316]. Među kratkolančanim masnim kiselinama buterna kiselina se smatra posebno važnim metabolitom jer predstavlja glavni izvor energije epitelnih ćelija tankog creva i promoviše održavanje zdrave sluzokože creva, integriteta crevne barijere, poseduje antiinflamatorno i imunoregulatorno dejstvo, a ostvaruje i druge aktivnosti koje doprinose crevnoj homeostazi [317]. Pored buterne, značajne su i propionska i sirćetna kiselina. Propionska utiče na smanjenje lipogeneze jetre, a učestvuje i u oslobađanju određenih hormona koji regulišu apetit, dok se sirćetna koristi kao izvor energije, a takođe utiče i na smanjenje apetita [318, 319].

Rezultati dobijeni izvođenjem eksperimenata u TIM-2 modelu ukazuju na visok potencijal prečišćene smeše kratkolančanih FOS u promociji rasta bakterija iz roda *Blautia*. Drugi autori koji su testirali komercijalnu smešu FOS dobijenu iz cikorijske takođe na TIM-2 modelu, su u svojoj naučnoj publikaciji prijavili suprotan efekat [311]. Naveli su da je suplementacija FOS rezultirala značajnim smanjenjem rasta članova iz pomenutog bakterijskog roda. Ovakav rezultat može biti posledica različitog strukturnog sastava FOS u primenjenim smešama tj. prisustva kratkolančanih FOS sa nižim DP sa jedne strane, i FOS koje odlikuje viši DP, sa druge. Isto tako, treba imati na umu da u okviru roda *Blautia* u primenjenoj crevnoj mikrobioti mogu biti dominantne različite bakterijske vrste, što se takođe može odraziti na konačan rezultat. Isti autori su takođe prijavili da nije uočen porast pomenutog bakterijskog roda u tretmanu sa SIEM-om [311], što je u skadu sa prikazanim rezultatima i u okviru ove disertacije. Ovakav rezultat upućuje na zapažanje da bakterije iz roda *Blautia* nisu sklone ka iskorišćenju kompleksnih ugljenih hidrata poput pektina, arabinogalaktana, amilopektina, ksilana i skroba koji čine sastavni deo kontrolne podloge tj. SIEM-a. Prema tome, vrlo je verovatno da članovi

Blautia roda koji su prisutni u primenjenom fekalnom inokulumu za izvođenje eksperimenata na TIM-2 modelu, lakše fermentišu strukturalno jednostavnije FOS koji predstavljaju dominantne komponente testirane prečišćene smeše, s obzirom da je uočena značajna stimulacija rasta. Članovi roda *Butyricoccus*, proizvođači buterne kiseline i obećavajući probiotski kandidati sa terapijskim potencijalom u lečenju upalnih bolesti creva, [320] takođe su stimulisani prisustvom smeše FOS u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Stimulaciju rasta bakterija iz navedenog roda primenom FOS razgranatog tipa prijavili su i Popov i sar. u svojoj naučnoj publikaciji u kojoj su razmatrali efekat uticaja strukturalno različitih FOS na ljudsku mikrobiotu primenom TIM-2 modela [321].

U tretmanu sa FOS povećan je udeo i članova porodice *Eubacteriaceae* (rodovi *Eubacterium ruminantium grupa* i *Eubacterium coprostanoligenes grupa*), koji poseduju sposobnost proizvodnje buterne kiseline i drugih SCFA iz vlakana, čime indirektno doprinose održavanju crevne barijere i gastrointestinalnog okruženja [322]. Takođe, stimulacijom rasta nekultivisanog predstavnika *Eubacterium coprostanoligenes grupe* suplementacija FOS može potencijalno ostvariti pozitivne efekte na lipidni metabolizam čoveka. Pripadnici *Eubacterium coprostanoligenes* vrste su pokazali mogućnost biotransformacije holesterola u koprostanol, koji se dalje izlučuje u nepromenjenom obliku. Ovim pristupom omogućena je redukcija holesterola koji se može apsorbovati u crevima i ući u krvotok, ali i smanjen rizik od pojave aterosklerotičnih kardiovaskularnih bolesti koje su usko povezane sa povećanim sadržajem holesterola u krvi [322].

Rezultati prikazani u okviru ove disertacije takođe upućuju i na to da je suplementacijom FOS značajno stimulisan rast i bakterija iz porodice *Prevotellaceae* (*Prevotellaceae_UCG-003* i *Alloprevotella*) koje se smatraju saharolitičkim bakterijama budući da proizvode hidrolitičke enzime [323] i veoma uspešno metabolišu kompleksne ugljene hidrate [316]. Prema dobijenim rezultatima, bakterije iz navedenih rodova su pokazale veći afinitet ka iskorišćenju brzofermentirajućeg vlakna tj. FOS [319] s obzirom da nije uočena stimulacija rasta u kontrolnom uzorku. Iako se prema navodima iz literature pojedine bakterijske vrste iz roda *Prevotella*, koje takođe pripadaju porodici *Prevotellaceae*, povezuju sa ekspresijom gena odgovornih za produkciju ksilanaza i posledičnu hidrolizu ksilana, prema prikazanim rezultatima u ovoj disertaciji stimulisane bakterije iz *Prevotellaceae_UCG-003* i *Alloprevotella* verovatno proizvode enzime odgovorne za metabolisanje FOS [324]. Od značaja je istaći da se pomenuti bakterijski rodovi smatraju značajnim producentima sirćetne i propionske kiseline [316], kao i da je prema literaturnim podacima aktivnost pripadnika porodice *Prevotellaceae* povezana i sa poboljšanjem metabolizma glukoze u ljudskom organizmu usled konzumiranja vlakana [325].

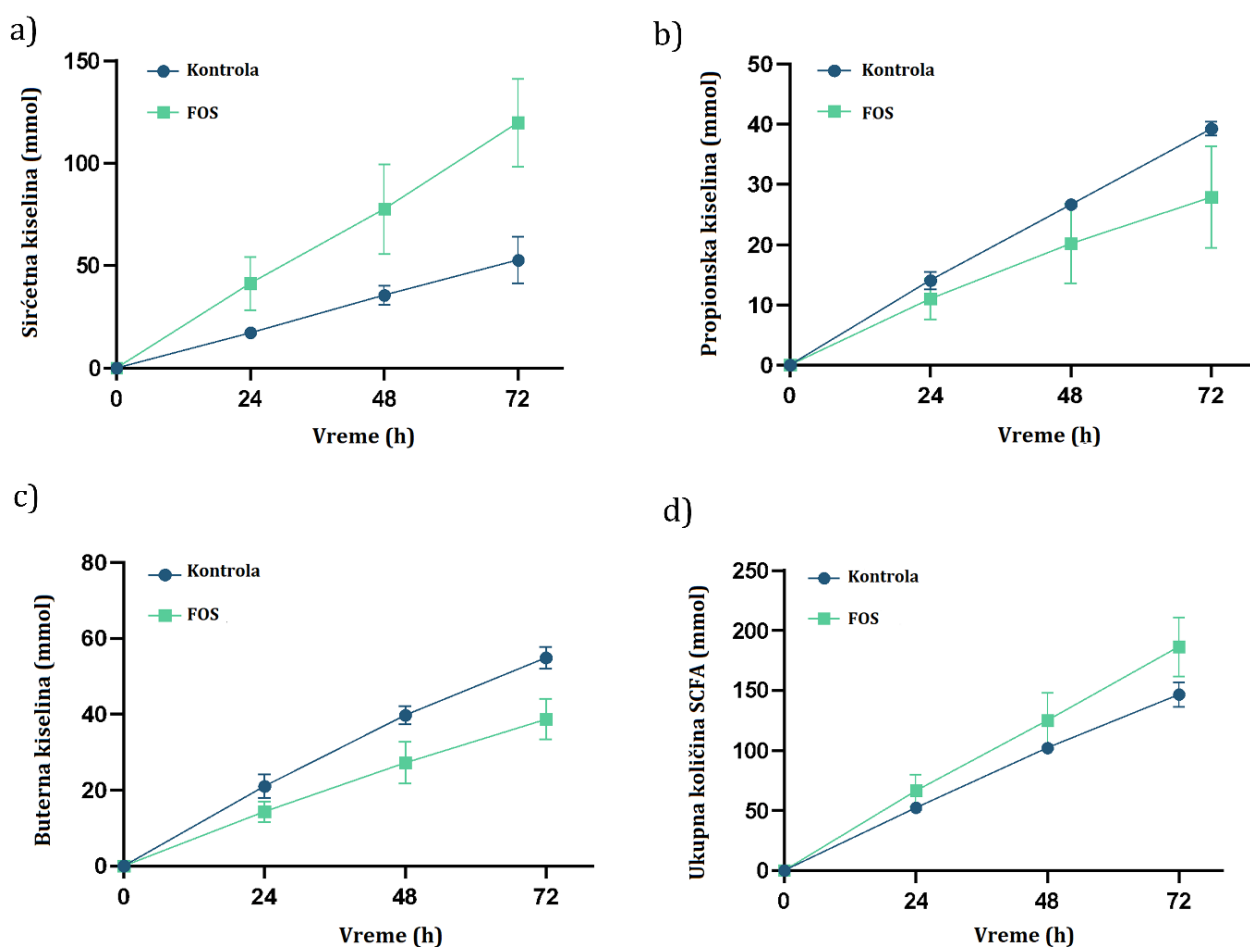
Iako je poznato da FOS predstavljaju bifidogene prebiotike [326], primena prečišćene smeše FOS u TIM-2 modelu nije rezultirala jakim bifidogenim efektom ($q=0,28063$). Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodno uočenim nalazima drugih studija [311, 321]. Razlog za ovakav ishod može biti povezan sa niskom zastupljenošću bifidobakterija u inokulumu ili neodgovarajuće produkcije glikozid hidrolaza od strane bifidobakterija, koje mogu učestvovati u hidrolizi FOS [321].

Imajući u vidu ulogu komensalnih članova crevne mikrobiote u održavanju crevne homeostaze i zdravlja čoveka, prebiotske intervencije koje mogu modifikovati aktivnost i sastav mikroorganizama predstavljaju potencijal za razvoj novih pristupa u prevenciji i lečenju hroničnih nezaraznih bolesti.

4.5.3. Analiza kratkolančanih masnih kiselina

Kao glavni produkti mikrobne fermentacije različitih dijetalnih vlakana izdvajaju se kratkolančane masne kiseline (SCFA) tj. sirćetna, propionska i buterna kiselina. Fermentacijom proteina uglavnom nastaju razgranate masne kiseline (BCFA) poput izo-buterne i izo-valerijanske [311].

Rezultati uporedne analize glavnih produkata mikrobne fermentacije kontrolnog uzorka (SIEM) i testirane smeše FOS u *in vitro* TIM-2 modelu prikazani su na slici 4.53 i ukazuju da je primećena veća kumulativna proizvodnja buterne kiseline u kontrolnom uzorku, dok je suplementacija smešom FOS značajno rezultirala većom kumulativnom proizvodnjom sirćetne kiseline ($p=0,018$). Kumulativna produkcija propionske kiseline je u tretmanu sa FOS bila na granici statističke značajnosti. Suplementacija smešom FOS rezultirala je većom kumulativnom proizvodnjom ukupnih SCFA u odnosu na kontrolni uzorak, koja je bila na granici statističke značajnosti.



Slika 4.53. Kumulativna proizvodnja (mmol) a) sirćetne kiseline b) propionske kiseline c) buterne kiseline d) ukupnih kratkolančanih masnih kiselina nakon 72 h mikrobne fermentacije u TIM-2 modelu u kontrolnom uzorku i primenom smeše FOS.

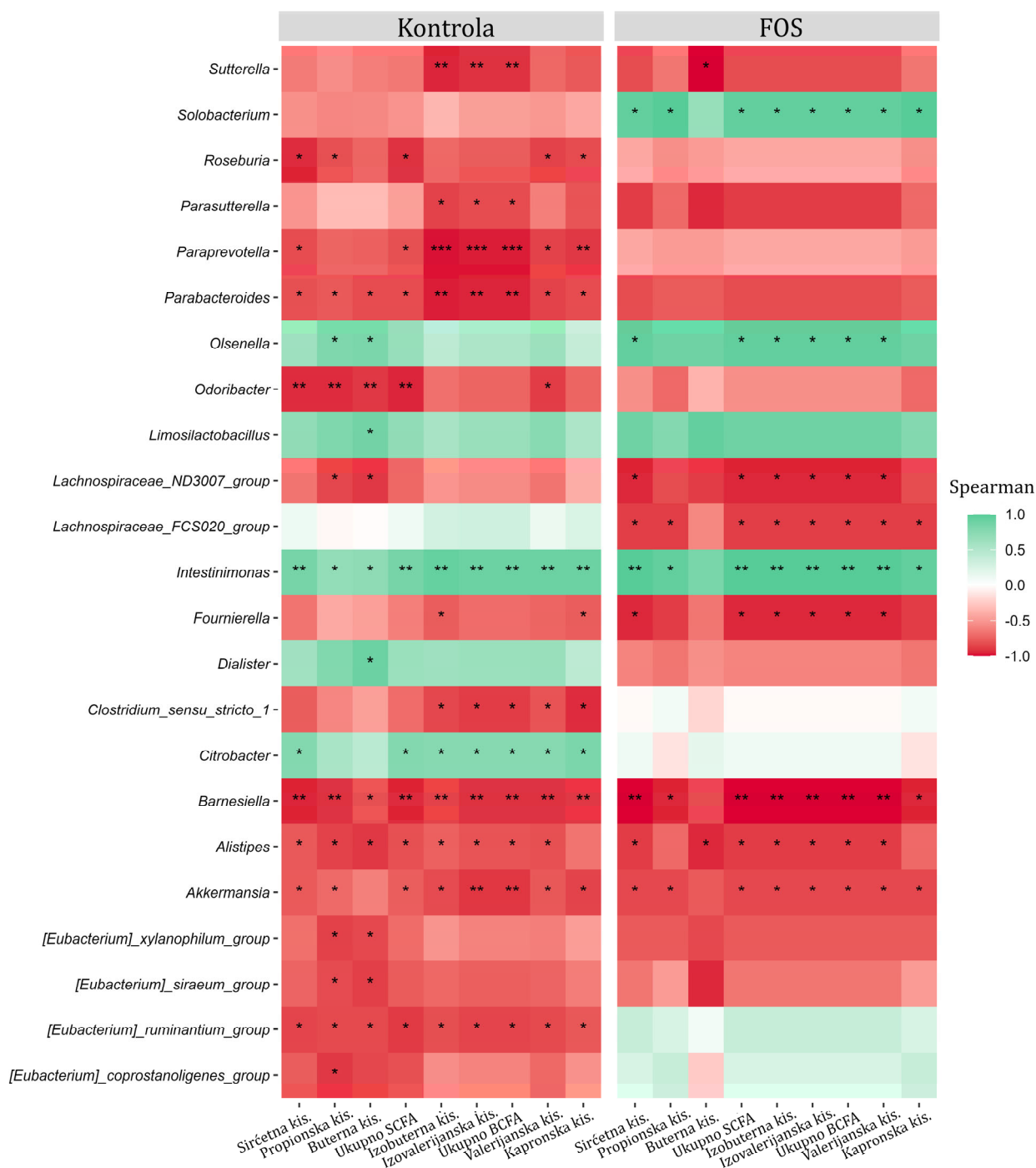
Izračunate kumulativne količine dobijenih masnih kiselina nakon 72 h fermentacije u TIM-2 modelu primenom T testa navedene su u tabeli 4.10.

Tabela 4.10. Kumulativne količine pojedinačnih i ukupnih organskih kiselina nakon 72 h mikrobne fermentacije u TIM-2 modelu primenom SIEM-a i smeše kratkolančanih FOS

SCFA	SIEM, mmol	FOS, mmol
Sirćetna kiselina	52,67 ± 11,38	119,90 ± 21,56
Propionska kiselina	39,28 ± 1,15	27,91 ± 8,44
Buterna kiselina	54,90 ± 2,87	38,73 ± 5,33
Ukupno SCFA	146,80 ± 10,34	186,54 ± 24,67

Dokazi brojnih studija upućuju na značajnu ulogu SCFA u održavanju zdravlja ljudskog organizma. Konkretno, do sada se pokazalo da ove kiseline ispoljavaju anti-inflamatorno i imunomodulatorno dejstvo, da su korisne u borbi protiv gojaznosti (zbog regulacije apetita), dijabetesa, bolesti jetre i dr. [327] Takođe, sirćetna i propionska kiselina se koriste kao supstrati za energetske procese metabolizma poput lipogeneze (sinteza triglicerida u cilju skladištenja energije) [328]. Budući da na produkciju masnih kiselina utiče hemijski sastav polaznih vlakana kao i metabolička aktivnost i sastav crevne mikrobiote, primenom Spearmanove analize izvedena je korelacija između organskih kiselina i članova mikrobiote koja uzima u obzir i pripadnost testiranim grupama.

Korelaciona analiza je izvršena za 135 bakterijska roda, nakon uklanjanja 67 rodova sa relativnom zastupljenošću manjom od 0,01%. Sa slike 4.54 može se uočiti da postoji pozitivna korelacija između organskih kiselina i relativne zastupljenosti bakterija iz roda *Solobacterium* i *Olsenella* u tretamanu sa FOS, dok je rod *Intestinimonas* pokazao pozitivnu korelaciju u obe testirane grupe. Značajna pozitivna korelacija je uočena između navedenih rodova i nivoa sirćetne i propionske kiseline, ukupnih SCFA, BCFA kao i drugih organskih kiselina, dok nivoi buterne kiseline nisu bili u značajnoj korelaciji sa bakterijama koje su suplementirane smešom FOS. Takodje, primetno je da postoje i razlike u produkciji organskih kiselina između testiranih uzoraka u slučaju grupa *Eubacterium ruminantium* i *Eubacterium coprostanoligenes*, s tim da pozitivna asocijacija uočena u tretmanu sa FOS nije statistički značajna. Dobijeno je i da u kontrolnoj grupi postoji više statistički značajnih negativnih korelacija između bakterijskih rodova *Paraprevotella*, *Parabacteroides*, *Eubacterium ruminantium* grupe, *Odoribacter* i produkcije organskih kiselina u odnosu na intervenciju sa FOS.



Slika 4.54. Spearmanova korelacija između identifikovanih bakterijskih rodova i produkcije organskih kiselina u kontrolnom uzorku i FOS (* označava postojanje statistički značajne korelacije)

4.6. Simultana sinteza i prečišćavanje FOS u membranskom reaktoru

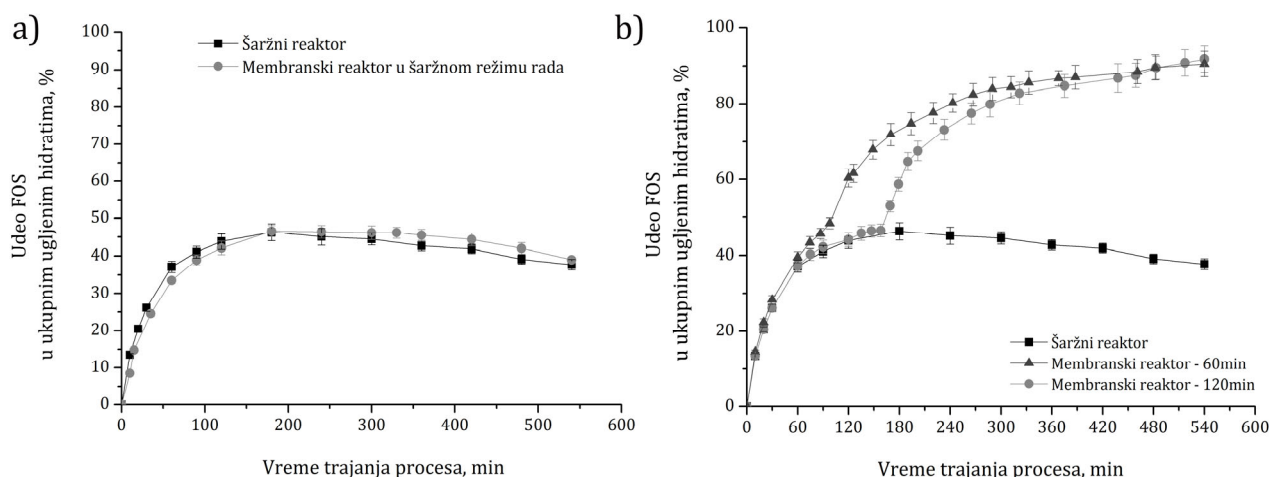
U poglavlju 4.4. je prikazano da se do proizvoda visoke čistoće FOS može doći procesom nanofiltracije u kombinaciji sa dijafiltracijom upotrebom sintetisane smeše FOS definisanog sastava. U cilju intenzifikacije konvencionalnog postupka prečišćavanja, pristupa se primeni membranskog reaktora. Ovaj sistem omogućava kombinaciju dveju tehnologija: membranske separacione, koja zahteva upotrebu membrana definisanih karakteristika i biotehnologije, koja podrazumeva upotrebu biokatalizatora za generisanje proizvoda [215]. Primena membranskog reaktora u cilju simultanog odvijanja reakcije sinteze oligosaharida, ali i prečišćavanja je posebno korisna ukoliko uključuje odvijanje enzimskih reakcija sa značajnom inhibicijom proizvodima reakcije. Njihovim odvođenjem, omogućeno je upravljanje enzimskom reakcijom u cilju kontrolisane proizvodnje željenih komponenti. Imajući ovo u vidu, upotreba membranskog reaktora se može smatrati korisnom u slučaju FOS koji se dobijaju reakcijom transfruktozilacije gde se kao nusproizvod izdvaja glukoza (inhibitor). Prema tome, u ovoj doktorskoj disertaciji prikazani su rezultati upotrebe membranskog reaktora korišćenjem rastvora saharoze kao supstrata i komercijalnog preparata Pectinex® Ultra SP-L kao izvora enzima FT.

U prvoj seriji eksperimenata paralelno su izvedene reakcije sinteze FOS u šaržnom reaktorskom sistemu (u erlenmajeru na tresilici) i u membranskom sistemu u šaržnom režimu rada. Dobijeni tok pomenutih reakcija (slika 4.55a) je skoro identičan i navodi na zaključak da izvođenje reakcije u membranskom reaktoru u šaržnom režimu rada prati kinetiku sinteze FOS, kao i da ne dolazi do nekih značajnih promena što je od važnosti za realizaciju procesa u membranskom reaktoru.

U narednoj seriji eksperimenata, izvedeni su simultani procesi sinteze i prečišćavanja FOS u membranskom reaktoru pri različitim vremenima zadržavanja tj. vremenskom periodu u kojem enzim samo reaguje sa supstratom pre početka separacije jer je zatvoren ventil za odvođenje permeata [329]. Ovaj parametar predstavlja ključnu promenljivu kojom se može kontrolisati konačna raspodela proizvoda i prinos procesa [228]. Ispitana su dva vremena šaržnog izvođenja procesa sinteze FOS (60 i 120 min), a nakon toga omogućeno je uklanjanje određenih proizvoda (nanofiltracija) uz uvođenje vode radi pospešivanja prečišćavanja produženim vremenom „ispiranja“ jedinjenja za koja je membrana propustljiva (dijafiltracija). Eksperimenti u membranskom reaktoru koji uključuju reakciju sinteze i proces prečišćavanja FOS su izvedeni pri prethodno optimizovanim uslovima za prečišćavanje FOS i to korišćenjem membrane NFW (300-500 Da) na 40 °C, pri brzini protoka permeata od 22 mL/min, koncentraciji saharoze 0,05 g/L i enzimskog preparata 2,55 IU/mL, a dobijeni rezultati su prikazani grafički na slici 4.56b.

Uporedni prikaz rezultata navodi na zaključak da je izvođenje simultanog procesa u membranskom reaktoru znatno efikasnije u poređenju sa šaržnim reaktorom, jer se nakon generisanja, neželjeni proizvodi odmah uklanjaju, povećavajući čistoću konačnog proizvoda. Različito vreme trajanja reakcije u šaržnom režimu rezultira i različitim sastavom smeše za prečišćavanje. Kao što je i očekivano, izvođenje reakcije u trajanju od 120 min dovodi do stvaranja većeg udela FOS različitog stepena polimerizacije u poređenju sa kraćim vremenom izlaganja supstrata proizvodu (60 min). Stoga, dobijene su smeše sledećeg sastava: 39,56 % FOS, 33,62 % saharoze i 26,82 % monosaharida za 60 min i 44,06 % FOS, 17,46 % saharoze i 38,48 % monosaharida za 120 min. Zbog prisutne veće količine FOS u smeši za prečišćavanje

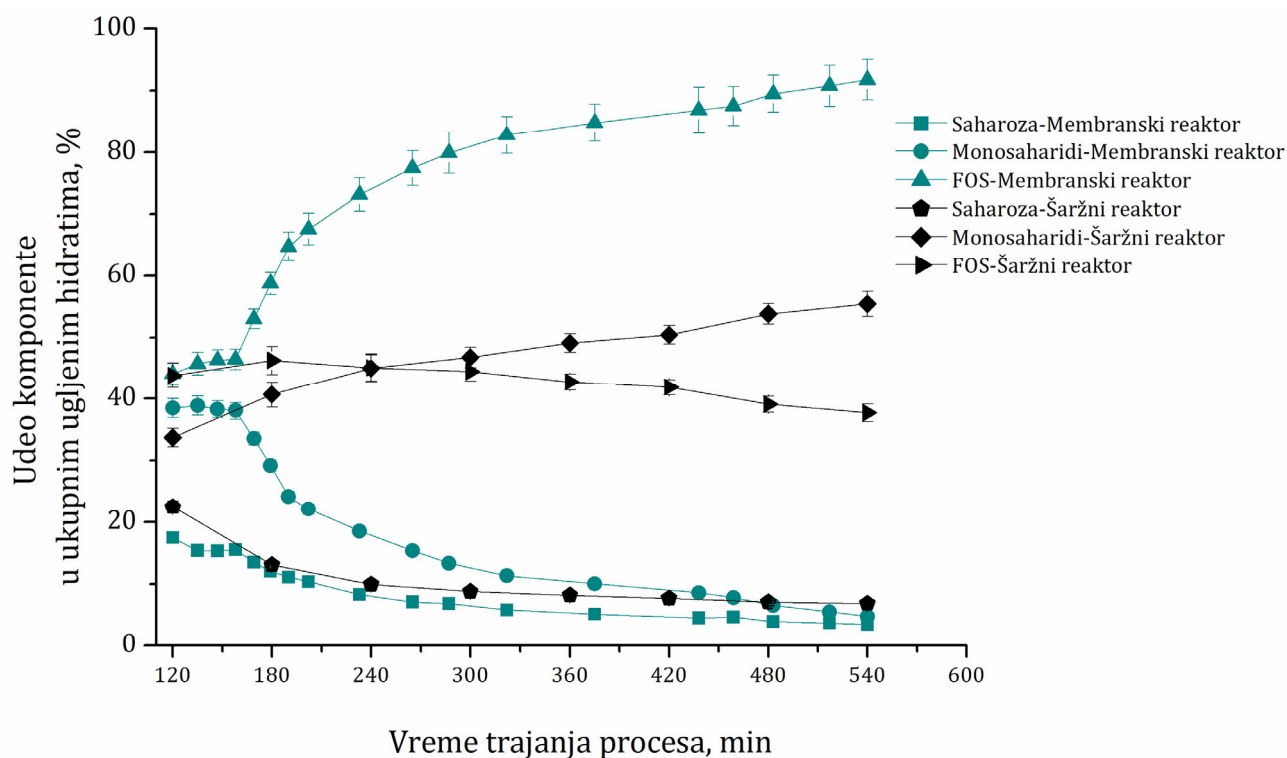
nakon 120 min, sa grafika (slika 4.55b) se može primetiti da nakon početka prečišćavanja postoji izraženo stacionarno stanje kao posledica nagomilavanja komponenti na membrani.



Slika 4.55. a) Tok sinteze FOS u šaržnom i membranskom reaktoru (u šaržnom režimu rada)
b) Tok izvođenja procesa u šaržnom i membranskom reaktoru

U slučaju kraćeg vremena reakcije bez separacije uočava se veća promena čistoće FOS usled manje blokade na površini membrane zbog manje količine sintetisanih prebiotika. Posmatrajući celokupni tok promene čistoće FOS, primetno je da je prečišćavanje pri kraćem vremenu trajanja reakcije brže kao i da se nakon 360 min trajanja procesa promene u udelu FOS minimalno menjaju rezultirajući krajnjim proizvodom čistoće od 90,5 % FOS. U procesu koji uključuje vreme trajanja reakcije od 120 min, nakon naglog porasta čistoće u početnom periodu prečišćavanja, dolazi do kontinuiranog povećanja u celom opsegu trajanja procesa (540 min) rezultirajući čistoćom od 91,8 % FOS. Pored ostvarene veće čistoće finalnog proizvoda, i činjenice da kraće vreme trajanja reakcije zahteva i raniji početak dijafiltracije, a posledično i upotrebu veće količine vode, vreme zadržavanja od 120 min je izabrano kao efikasnije rešenje za izvođenje procesa u membranskom reaktoru. Međutim, kao što je i pomenuto, a može se videti i sa grafika (slika 4.55b), udeo FOS beleži blagi porast sa povećanjem dužine trajanja prečišćavanja u celom ispitivanom opsegu. Upravo iz tog razloga izveden je i dodatni eksperiment u kojem je produženo vreme trajanja procesa do čak 840 min, kako bi se procenila mogućnost dobijanja krajnjeg proizvoda još veće čistoće. Naime, dobijeno je da je produženje trajanja prečišćavanja za 5 h, rezultiralo krajnjim proizvodom čistoće 93 % FOS. Povećanja čistoće za samo 1,2 %, na račun produženja procesa od 5 h svakako ne predstavlja zavidan rezultat, čak štaviše, takav proces bi se mogao smatrati nepovoljnim. Produženje trajanja procesa rezultiralo je i povećanjem količine FOS u permeatu, što može biti posledica nižih koeficijenata odbijanja, pri čemu je dobijen prinos FOS od 20 % koji je dva puta niži od prinosa FOS dobijenog izvođenjem procesa sa kraćim vremenom trajanja (9 h) koji iznosi 42 %. Imajući sve navedeno u vidu, vreme trajanje procesa od 9 h je procenjeno kao pogodniji izbor.

Poređenjem profila promene udela ugljenih hidrata u membranskom reaktoru (pri vremenu zadržavanja od 120 min) sa šaržnim reaktorom, sa slike 4.56 je evidentno da se udeo FOS postepeno povećava u celom ispitivanom periodu za razliku od reakcije u šaržnom reaktoru gde nakon postizanja maksimalne vrednosti od 46 %, dolazi do blagog smanjenja. Pomenuta razlika je posledica kontinualnog uklanjanja monosaharida iz sistema čime je smanjena mogućnost inhibicije. Slično zapažanje su prijavili Das i sar. u svojoj studiji na primeru GOS [330].



Slika 4.56. Uporedni prikaz promene sastava komponenti smeše u šaržnom i membranskom reaktoru od momenta pokretanja nano- i dijafiltracije

Da u membranskom reaktoru pored uklanjanja sporednih proizvoda dolazi i do odvijanja reakcije najbolje ukazuju podaci da sa vremenom dolazi do povećanja udela tetrasaharida (FOS 4) u poređenju sa trisaharidima (FOS 3) koji su bili dominantni u sintetisanoj smeši za prečišćavanje, ali i udela pentasaharida (FOS 5) koji nisu bili sastavni deo inicijalne smeše. U finalnom proizvodu kojeg karakteriše sledeći sastav: 91,8 % FOS (31,02 % FOS 3, 53,43 % FOS 4 i 7,31 % FOS 5), 3,43 % saharoze i 4,81 % monosaharida, primećen je niži udeo monosaharida 11,6 puta i veći udeo ukupnih FOS 2,4 puta u poređenju sa udelom u sintetisanoj smeši u šaržnom reaktoru. Nišizava (Nishizawa) sa sar. je takođe koristio membranski reaktor, ali i β -fruktofuranozidazu iz *A. niger* ATCC 20611 za izvođenje transfruktozilacije i prečišćavanja, i prijavio čistoću krajnje smeše iznad 90 % FOS [133]. Dobijeni rezultat je u skladu sa prijavljenom čistoćom finalne smeše u ovoj doktorskoj disertaciji. Stoga, evidentno je da membranski reaktor predstavlja efikasno rešenje za dobijanje smeše visoke čistoće FOS.

Upoređivanjem dobijene čistoće krajnjeg proizvoda od 91,8 % FOS nakon 9 h u slučaju primene membranskog reaktora i čistoće krajnjeg proizvoda od 87,2 % FOS nakon 30 h (24 h sinteza FOS i 6,5 h prečišćavanje) izvođenja konvencionalog procesa prečišćavanja (poglavlje 4.4.), može se zaključiti da membranski reaktor predstavlja bolji izbor s obzirom da se pored drastično smanjenog perioda trajanja procesa, postiže i bolji rezultat čime je ujedno proces efikasniji i ekonomski prihvatljiviji. Stoga, sasvim je izvesno da membranski reaktor predstavlja idealno rešenje za industrijsku implementaciju kojim se može obezbediti produkcija proizvoda visoke čistoće FOS. Dobijeni proizvod može biti primenjen u brojnim prehrambenim proizvodima čija priprema zahteva upotrebu šećera, dovodeći do smanjenja kalorijske i povećanja funkcionalne vrednosti. Takođe, u formi praha može biti upotrebljen i kao niskokalorični zaslađivač ili dodatak brojnim jelima i napicima umesto klasičnog konzumnog šećera.

4.7. *In situ* primena fruktoziltransferaze za dobijanje javorovog sirupa obogaćenog FOS

Poslednja faza istraživanja u okviru ove doktorske disertacije je usmerena ka razvijanju funkcionalnih proizvoda obogaćenih FOS. Kao značajan izvor saharoze, koja predstavlja prekursor za dobijanje FOS, korišćen je javorov sirup. Ovaj jedinstven prirodni kanadski proizvod koji se u najvećoj meri proizvodi u Kvebeku [331], zbog izuzetnog bogatog i raznolikog sastava u koji ulaze šećeri, vitamini, aminokiseline, polifenoli i druge komponente [332] pronalazi višenamensku primenu u mnogim domaćinstvima ne samo zbog slatkog i jedinstvenog ukusa, već i zbog pozitivnog uticaja na zdravlje [333-335]. Dobija se koncentrovanjem prirodnog soka dobijenog iz stabla javorovog drveta (rod *Acer*) procesom uparavanja ili reverzne osmoze, koji se potom zagreva kako bi se razvio karakterističan ukus kao posledica karamelizacije šećera [335]. Često je upotreba javorovog sirupa zbog visoke koncentracije šećera (saharoze) limitirana kod potrošača koji imaju problem sa gojaznošću ili boluju od dijabetesa [332]. Međutim, izvođenjem biotransformacije saharoze u FOS posredstvom enzima FT, moguće je dobiti javorov sirup sa nižim udelom šećera tj. smanjene kalorijske, a povećane funkcionalne vrednosti. Upravo iz tog razloga postoji sve veće interesovanje istraživačkih centara, ali i prehrambene industrije za razvojem i plasiranjem proizvoda dodatih vrednosti koji podržavaju bolje zdravlje svih potrošača, a ujedno unapređuju i kvalitet života onih ljudi kod kojih je primena proizvoda na bazi saharoze ograničena [63, 336].

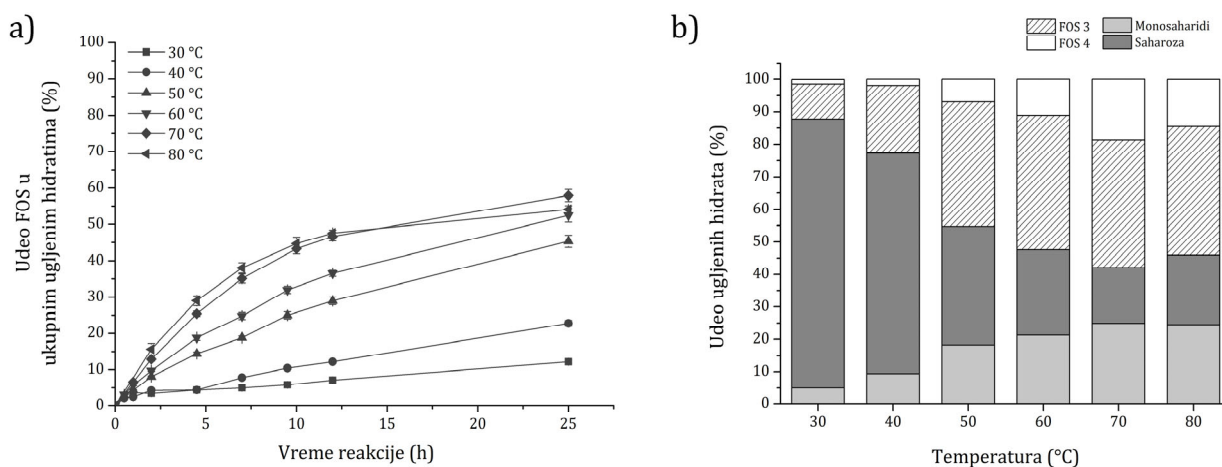
S tim u vezi, u ovoj fazi istraživanja izvedeni su eksperimenti koji su uključivali primenu komercijalnog javorovog sirupa i enzimskog preparata Pectinex® Ultra SP-L u cilju dobijanja proizvoda obogaćenog prebioticima sa smanjenim sadržajem saharoze uz minimalnu promenu inicijalnih karakteristika. Najpre je izvedena optimizacija procesa biokonverzije saharoze u FOS primenom slobodne FT, a u nameri da se u potpunosti iskoristi potencijal enzima i osigura industrijski održiv proces, ispitana je i upotreba imobilisane FT. Za tu svrhu, primenjeni su imobilisani preparati FT koji su u prethodno opisanim poglavljima pokazali veliki potencijal za sintezu FOS u čistom rastvoru saharoze.

4.7.1. Optimizacija modifikacije javorovog sirupa primenom slobodne FT

Pre enzimske konverzije, izvedena je analiza sirupa u pogledu sastava ugljenih hidrata. Dobijeno je da ukupna koncentracija ovih komponenti iznosi 790 g/L, kao i da je koncentracija saharoze 730 g/L, dok monosaharidi i oligosaharidi čine manju frakciju proizvoda. Imajući u vidu da je koncentracija saharoze fiksiran parametar, optimizacija *in situ* enzimske konverzije je izvedena ispitivanjem uticaja temperature i koncentracije enzima.

U prvom setu eksperimenata istražen je uticaj temperature u širokom opsegu, od 30-80 °C radi dobijanja detaljnijih informacija o aktivnosti enzima, ali i lakšeg rukovanja sa vrlo viskozim rastvorima kakav je sirup [125]. Na osnovu prikazanih rezultata (slika 4.57a), može se primetiti da je FT pokazala izuzetnu katalitičku aktivnost u ispitivanom temperaturnom opsegu, posebno na temperaturama iznad 50 °C s obzirom na ostvareni udeo FOS u ukupnim ugljenim hidratima koji je nakon 25 h veći od 50 %. Izvođenjem reakcije na temperaturi 60, 70 i 80 °C, dobijen je sirup sa udelom FOS od 52,5 %, 57,9 % i 54,1 %, i stepenom konverzije saharoze od 73,7 %, 82,9 % i 78,6 %, redom. Rezultati konverzije upućuju na zaključak da je pri pomenutim temperaturama ostvarena značajna redukcija sadržaja saharoze. Važno je napomenuti da je jedan deo saharoze konvertovan u FOS preko reakcije transfruktozilacije, dok je drugi (manji) deo hidrolizovan u monosaharide. Detaljan sastav dobijenih krajnjih proizvoda pri različitim temperaturama nakon 25 h prikazan je na slici 4.57b. Iako je najveća vrednost udela FOS, ali i stepena konverzije ostvarena na 70 °C, radi očuvanja ostalih bioaktivnih komponenti (pre

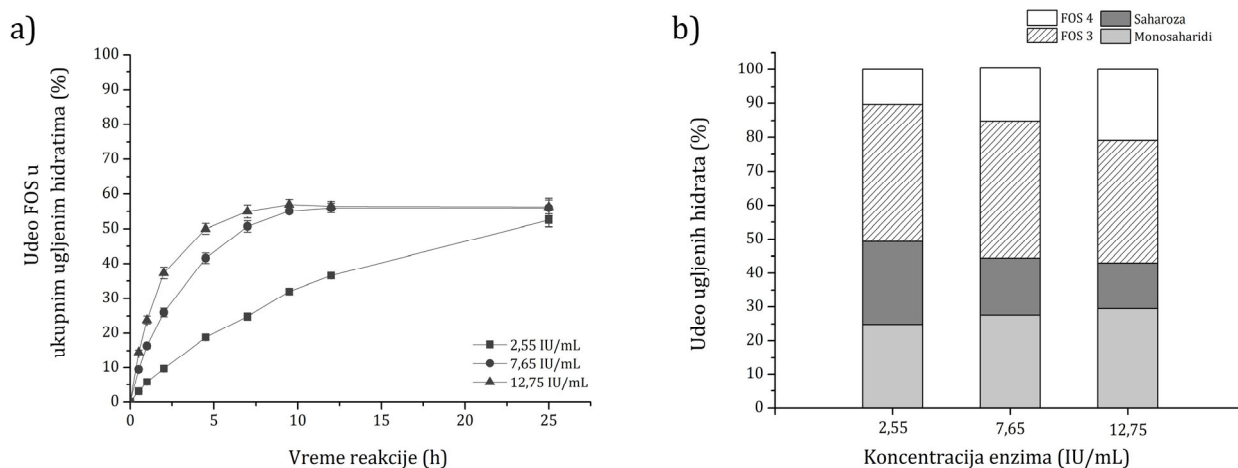
svega polifenola) i kvaliteta finalnog proizvoda u pogledu boje [270] i ukusa [337], temperatura od 60 °C kojom se obezbeđuje i manja potrošnja energije, izabrana je kao najpogodnija za dalji rad. Pri izabranoj temperaturi, nakon 25 h trajanja reakcije, dobijen je modifikovan javorov sirup sledećeg sastava: 26,3 % saharoza, 21,2 % monosaharidi i 52,5 % ukupnih FOS od kojih su 41,4 % FOS 3 i 11,1 % FOS 4.



Slika 4.57. a) Uticaj različitih temperatura na dobijanje FOS b) Sastav pojedinačnih komponenti modifikovanog javorovog sirupa na različitim temperaturama reakcije nakon 25 h.

Od značaja je istaći da su dobijeni rezultati uporedivi sa rezultatima koji su dobijeni primenom čistih rastvora saharoze. Ova konstatacija ukazuje na to da složeni supstrat kakvim se smatra javorov sirup nije imao značajan inhibitorski uticaj na enzim [3]. U ranijim istraživanjima je prijavljeno da na primer u slučaju primene soka od šargarepe kao supstrata, dolazi do difuzionih problema a ujedno i nižeg prinosa FOS [338]. Prema tome, može se zaključiti da javorov sirup predstavlja adekvatnu matricu za funkcionalnu derivatizaciju proizvoda.

Nakon utvrđivanja optimalne temperature, istražen je i uticaj različitih koncentracija enzima na modifikaciju sirupa u opsegu od 2,55-12,75 IU/mL. Profili promene udela FOS u uslovima različitih koncentracija prikazani su na slici 4.58a, i navode na konstataciju da se sa povećanjem unete količine enzima povećava brzina enzimske reakcije, a smanjuje vreme dostizanja maksimalnog udela FOS. Na primer, maksimalni udeo sintetisanih FOS od 52,5 % dobijen je nakon 25 h u uslovima najniže primenjene koncentracije od 2,55 IU/mL, dok je 56 % FOS dobijeno nakon 12 h primenom koncentracije enzima 7,65 IU/mL, a 57 % FOS nakon 9,5 h pri 12,75 IU/mL. Reakcija sinteze FOS korišćenjem najniže koncentracije je primetno sporija u odnosu na druge dve primenjene koncentracije. Svakako, efekat primene različitih koncentracija enzima na reakciju sinteze FOS u javorovom sirupu pokazuje veoma sličan trend promene kao kod primene čistog rastvora saharoze (prikazano u poglavlju 4.2.2. u okviru ovog doktorata). Dobijene udele FOS, prate i visoki stepeni konverzije saharoze, koji iznose 73,7 %, 82 % i 85,6 % pri 2,55, 7,65 i 12,75 IU/mL, redom. Usled dobijenog skoro identičnog udela FOS pri koncentraciji 7,65 i 12,75 IU/mL, prilikom izbora optimalne koncentracije enzima treba imati u vidu da iako se u uslovima najveće primenjene koncentracije postiže smanjenje trajanja procesa za 2,5 h, neophodno je primeniti i veću količinu enzimske smeše koja zauzima vodeće mesto u ukupnim troškovima procesa. Prema tome, koncentracija od 7,65 IU/mL predstavlja pogodnije rešenje za razvijanje profitabilnijeg procesa proizvodnje javorovog sirupa obogaćenog FOS. Kao konačan ishod izvedene optimizacije dobijen je modifikovani javorov sirup sa 56 % FOS, 27,3 % monosaharida i 16,7 % saharoze u ukupnim ugljenim hidratima (slika 4.58b).

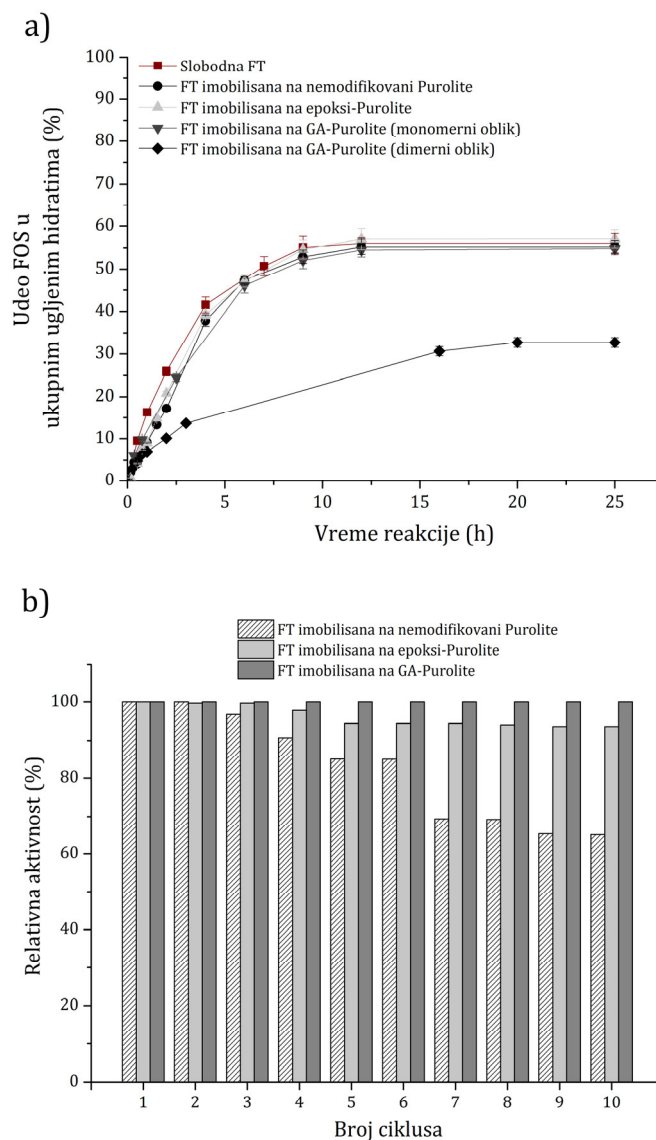


Slika 4.58. a) Uticaj različitih koncentracija enzima na dobijanje FOS b) Sastav pojedinačnih komponenti u modifikovanom javorovom sirupu primenom različitih koncentracija enzima u momentu dostizanja maksimalnog prinosa na 60 °C.

4.7.2. Modifikacija javorovog sirupa primenom imobilisanih preparata FT i procena operativne stabilnosti

U poređenju sa slobodnim enzimima, imobilisani enzimi se smatraju korisnijom formom biokatalizatora za realizaciju industrijskih procesa i to najviše zbog mogućnosti ponovne upotrebe, čime ne zaostaju kao kontaminirajuća primesa u krajnjim proizvodima. Pored toga što proces imobilizacije ima za cilj unapređenje stabilnosti enzima, sama činjenica da su vezani za nosač uz zadržavanje svojih katalitičkih aktivnosti kao i da se po završetku reakcije mogu odvojiti i ponovno upotrebiti je od izuzetnog značaja za realizaciju povoljnijih procesa u pogledu nižih operativnih troškova. U okviru ove doktorske disertacije imobilisani preparati FT, koji su u prethodnim eksperimentima pokazali visoku katalitičku moć na primeru čistog rastvora saharoze, primenjeni su za modifikaciju javorovog sirupa u pravcu produkcije FOS. Nakon detaljne optimizacije modifikacije javorovog sirupa primenom slobodne FT, izvedeni su eksperimenti koji su uključivali primenu četiri imobilisana preparata FT. Za tu namenu, FT je imobilisana adsorpcijom na nemođifikovani Purolite® A109 dajući preparat katalitičke aktivnosti od 343 IU/g nosača, ali i preko elektrostatičkih interakcija i kovalentnih veza za GA i epoksi funkcionalizovane nosače Purolite® A109. Pod utvrđenim optimalnim uslovima dobijeni su imobilisani preparati sledećih FT aktivnosti: 276 IU/g nosača (monomerna forma GA), 371 IU/g nosača (dimerna forma GA) i 243 IU/g nosača (epoksi-Purolite). Kako bi se adekvatno procenio potencijal imobilisanih preparata u složenom reakcionom sistemu kakvim se smatra javorov sirup, izvršeno je poređenje dobijenih rezultata sa sintezom slobodnog enzima. Povodom toga, za utvrđivanje toka sinteze FOS unet je isti broj jedinica aktivnosti slobodne i imobilisane FT, a dobijeni rezultati su prikazani na slici 4.59a.

Na osnovu prikazanih rezultata, može se primetiti skoro identičan vremenski tok produkcije FOS za različite forme enzima (rastvoran i imobilisan) izuzev u slučaju FT imobilisane na nosač sa dimernim oblikom GA gde je primećena smanjena aktivnost na osnovu niskog udela sintetisanih FOS od svega 32,7 % nakon 25 h. Dobijeni profili promene udela FOS prilikom primene preostala tri imobilisana preparata ukazuju da nije došlo do difuzionih limitacija uprkos složenosti i viskoznosti smeše. Korišćenjem slobodne FT dobijen je maksimalni udeo FOS od 56 % nakon 12 h trajanja reakcije, dok su primenom preostala tri imobilisana preparata FT dobijeni udeli FOS od 55-57 %. Produženjem trajanja reakcije, udeo FOS je ostao nepromenjen.



Slika 4.59. a) Vremenski tok sinteze FOS u javorovom sirupu primenom slobodne i imobilisane FT na različite nosače b) Operativna stabilnost imobilisanih preparata FT primenom nemodifikovanog, epoksi-modifikovanog i GA-modifikovanog (monomerni oblik) Purolite® A109 nosača.

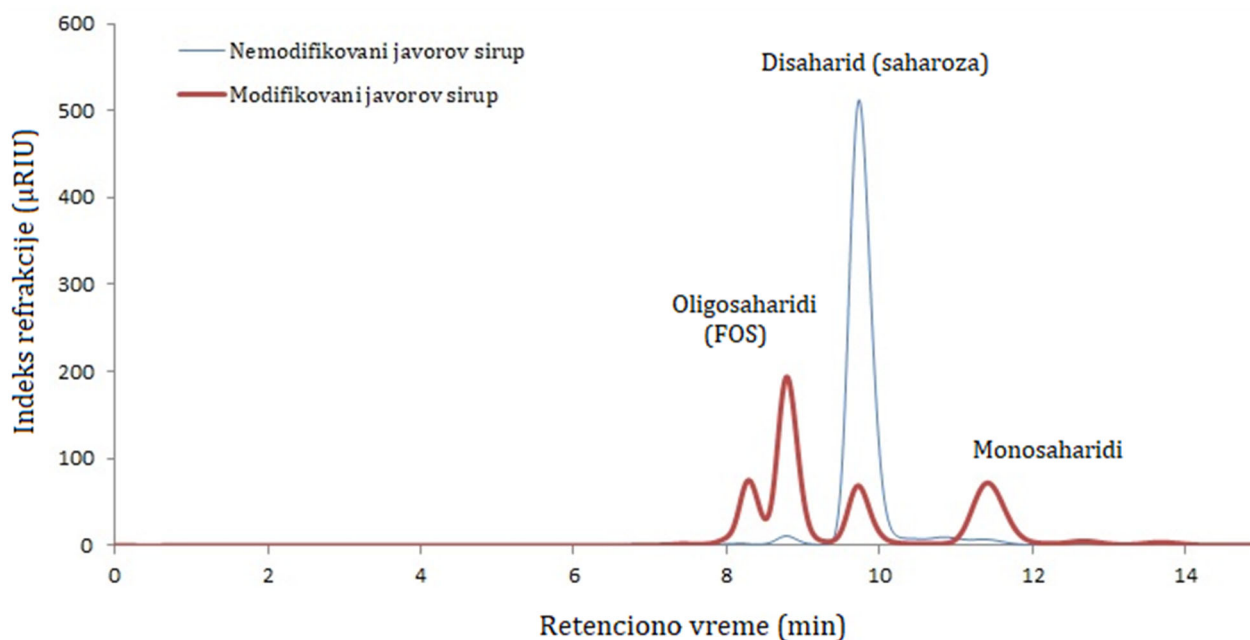
U narednim eksperimentima testirana je operativna stabilnost sva tri imobilisana preparata u cilju procene njihovog potencijala za buduću industrijsku implementaciju. Ovaj parametar je sa aspekta industrije od velike važnosti s obzirom na to da pokazuje kolika je zadržana inicijalna aktivnost enzima nakon upotrebe u više uzastopnih reakcija tj. reakcionih ciklusa. Višekratna mogućnost primene FT imobilisane na nemodifikovani, GA-modifikovani (monomerni oblik) i epoksi-modifikovani Purolite® A109, procenjena je izvođenjem 10 uzastopnih reakcionih ciklusa u trajanju od 12 h kako bi se obezbedilo dobijanje maksimalne količine FOS. Prema rezultatima operativne stabilnosti prikazanim u prethodnim poglavljima (4.3.3. i 4.3.4.) imobilisani preparati FT kojim uključuju primenu nemodifikovanog i epoksi-modifikovanog Purolite® A109, su u reakcijama sa čistim rastvorom saharoze pokazali ne samo izuzetnu već i uporedivu operativnu stabilnost (zadržana aktivnost veća od 90 % nakon 10 reakcionih ciklusa), dok reakcije izvedene u javorovom sirupu nisu rezultirale istim ishodom. Naime, u okviru ovog reakcionog sistema (slika 4.59b) može se primetiti da se operativne aktivnosti FT imobilisane na nemodifikovani i modifikovane nosače Purolite® A109 drastično razlikuju. Primenom nemodifikovanog nosača Purolite® A109 imobilisani enzim je zadržao 65 %

inicijalne aktivnosti, dok je primenom epoksi- i GA - aktiviranog nosača pokazao zadržavanje aktivnosti više od 90 % nakon 10 reakcionih ciklusa. Konkretno, primena GA-aktiviranog nosača je rezultirala čak i nepromenjenom relativnom aktivnošću. Dakle, rezultati jasno ukazuju da je modifikacija nosača u cilju uspostavlja stabilnih kovalentnih veza potpuno opravdan postupak, jer su imobilisani preparati pokazali odličnu stabilnost uprkos upotrebi složene i viskozne podloge kao što je javorov sirup.

4.7.3. Karakterizacija nemodifikovanog i modifikovanog javorovog sirupa

Radi bolje procene proizvoda i dobijanja potpunijih informacija o javorovom sirupu obogaćenog prebioticima koji potencijalno može biti svrstan među funkcionalne proizvode, izvedena je detaljnija karakterizacija. Naime, nemodifikovani i modifikovani javorov sirup su okarakterisani u pogledu fizičko-hemijskih osobina, stabilnosti, prebiotskog efekta na pripadnike crevne mikrobiote, a izvedena je i procena prihvatljivosti proizvoda sprovođenjem senzorne analize. Da bi se detaljno okarakterisao dobijeni proizvod, prvo je HPLC analizom određen sastav ugljenih hidrata modifikovanog proizvoda i upoređen sa nemodifikovanim (slika 4.60).

Sa dobijenog hromatograma uočava se prisustvo monosaharida (27,7 %), saharoze (16,7 %) i FOS (56 %) u proizvodu nakon modifikacije pod utvrđenim optimalnim uslovima (60 °C, koncentracija enzima 7,65 IU/mL nakon 12 h). Modifikovan proizvod sadrži 440 g/L FOS što je i više nego dovoljno za ispunjenje zahteva kako bi se proizvodi deklarirali kao bogati vlaknima [339]. Imajući u vidu dobijen sastav proizvoda i njihove literaturne kalorijske vrednosti [340], izračunata je ukupna kalorijska vrednost proizvoda nakon enzimskog tretmana. Dobijeno je da modifikovani sirup ima 2,2 kcal/mL, što je oko 1,6 puta manje u odnosu na deklarisanu vrednost nemodifikovanog proizvoda (3,6 kcal/mL). Na osnovu smanjenja energetske vrednosti od 39 %, javorov sirup obogaćen prebioticima bi prema Regulaciji (EC) br. 1924/2006 mogao biti deklarisan kao funkcionalni proizvod smanjene kalorijske vrednosti.



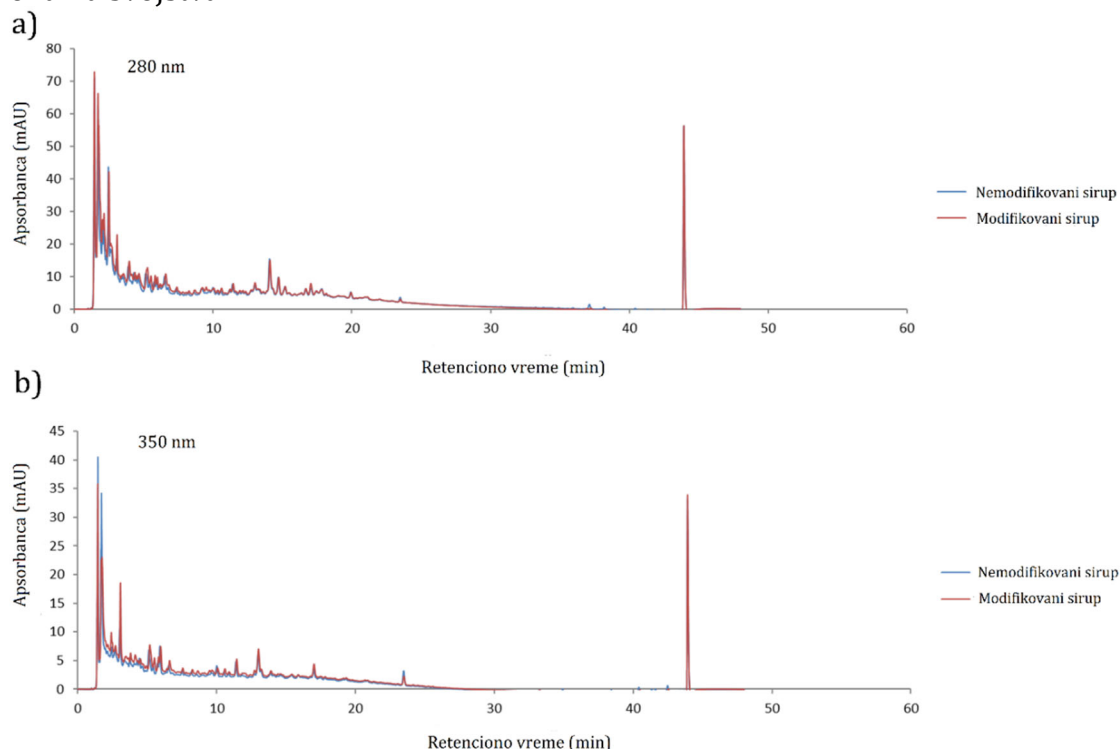
Slika 4.59. Hromatogrami dobijeni HPLC analizom ugljenih hidrata nemodifikovanog i modifikovanog javorovog sirupa nakon dodavanja FT i izvođenja reakcije pod optimalnim uslovima

Kako bi utvrdili da li je procesom modifikacije došlo do narušavanja inicijalnih karakteristika ili je sirup zadržao standardne parametre kvaliteta, u narednom setu eksperimenata ispitane su sledeće fizičko-hemijske karakteristike: transmisija svetlosti, pH, viskoznost, gustina, sadržaj suve materije, sadržaj polifenola i antioksidanasa. Dobijene vrednosti su prikazane u tabeli 4.11 i upućuju na to da su unutar opsega literaturnih podataka za javorov sirup [341]. Vrednosti transmisije (25–50 %) svrstavaju oba proizvoda u istu grupu javorovog sirupa tj. sirupa tamne boje sa uglavnom robusnim ukusom [342]. U slučaju sadržaja suve materije, za oba ispitivana proizvoda dobijene su vrednosti oko 66 ° Brix. Ovo je u skladu sa literaturnim podacima koji ukazuju da uzak opseg sadržaja rastvorenih čvrstih materija (66–67 ° Brix) predstavlja standard za definisanje sirupa [334]. Poredeći proizvode prema pH i viskoznosti, može se uočiti da je modifikovani proizvod pokazao blagi porast pH, ali i nešto veći viskozitet, verovatno usled prisustva ugljenih hidrata višeg stepena polimerizacije [63].

Tabela 4.11. Glavne fizičko-hemijske karakteristike nemodifikovanog i modifikovanog sirupa

Parametri	Merna jedinica	Nemodifikovani javorov sirup	Modifikovani javorov sirup
Transmisija	%	37,5±0,2	29,8±0,3
pH (25 °C)		6,70±0,11	6,94±0,087
Viskoznost (23 °C)	mPa s	190±2	210±3
Suva materija	°Brix	66,25±1,55	66,00±1,11
Gustina	g/mL	1,51±0,025	1,51±0,033
Antioksidativna aktivnost	mmol Fe ²⁺ /L	3,98±0,062	3,94±0,058
Sadržaj polifenola	g GAE/L	0,39±0,006	0,39±0,004

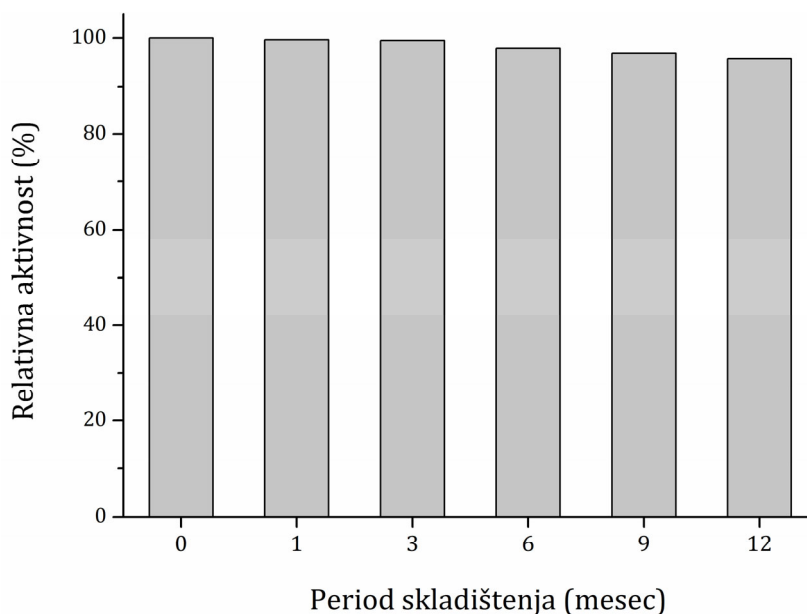
Osim toga, imajući u vidu da javorov sirup predstavlja prirodni antioksidans bogat raznim polifenolnim jedinjenjima [334], određen je sadržaj polifenola, ali i antioksidativna aktivnost modifikovanog sirupa kako bi se proverilo da li predložena prerada utiče na ova karakteristična funkcionalna svojstva.



Slika 4.60. Hromatogrami dobijeni HPLC analizom polifenola nemodifikovanog i modifikovanog javorovog sirupa na a) 280 nm b) 350 nm

Imajući u vidu dobijene i predstavljene podatke o ukupnim polifenolima (tabela 4.11) može se primetiti da modifikacija javorovog sirupa nije narušila navedena svojstva, jer je koncentracija polifenola bila skoro identična. Ostvarene rezultate su potvrdili i skoro identični HPLC profili na posmatranim talasnim dužinama (slika 4.61), dok je antioksidativna aktivnost bila smanjena za samo 1,15 %. Odatle se može zaključiti da modifikovani sirup zadržava inicijalni sadržaj polifenola i antioksidativne aktivnosti.

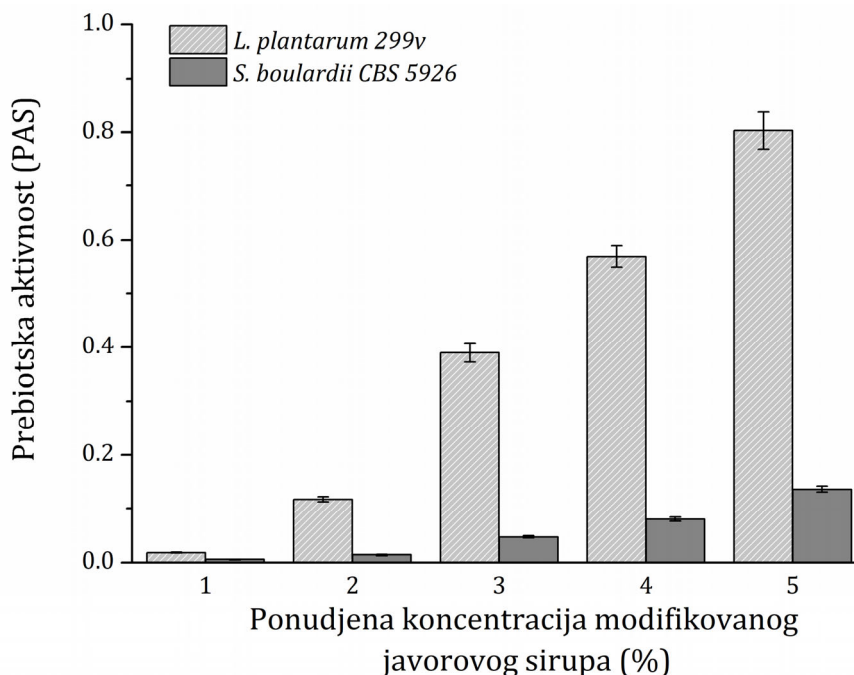
Ispitana je i stabilnost modifikovanog proizvoda u pogledu sintetisanih FOS na period od godinu dana. Rezultati sa slike 4.62 ukazuju na izrazitu stabilnost prebiotika, s obzirom na to da je nakon 12 meseci zadržano 96 % inicijalno sintetisanih FOS. Dakle, može se zaključiti da javorov sirup predstavlja izuzetno pogodan supstrat za derivatizaciju proizvoda obogaćenog FOS, jer njegov sastav i neutralni pH nisu negativno uticali na stabilnost FOS, kao što je to prijavljeno u slučaju nekih voćnih sokova i preparata [343].



Slika 4.61. Stabilnost FOS u modifikovanom javorovom sirupu tokom skladištenja

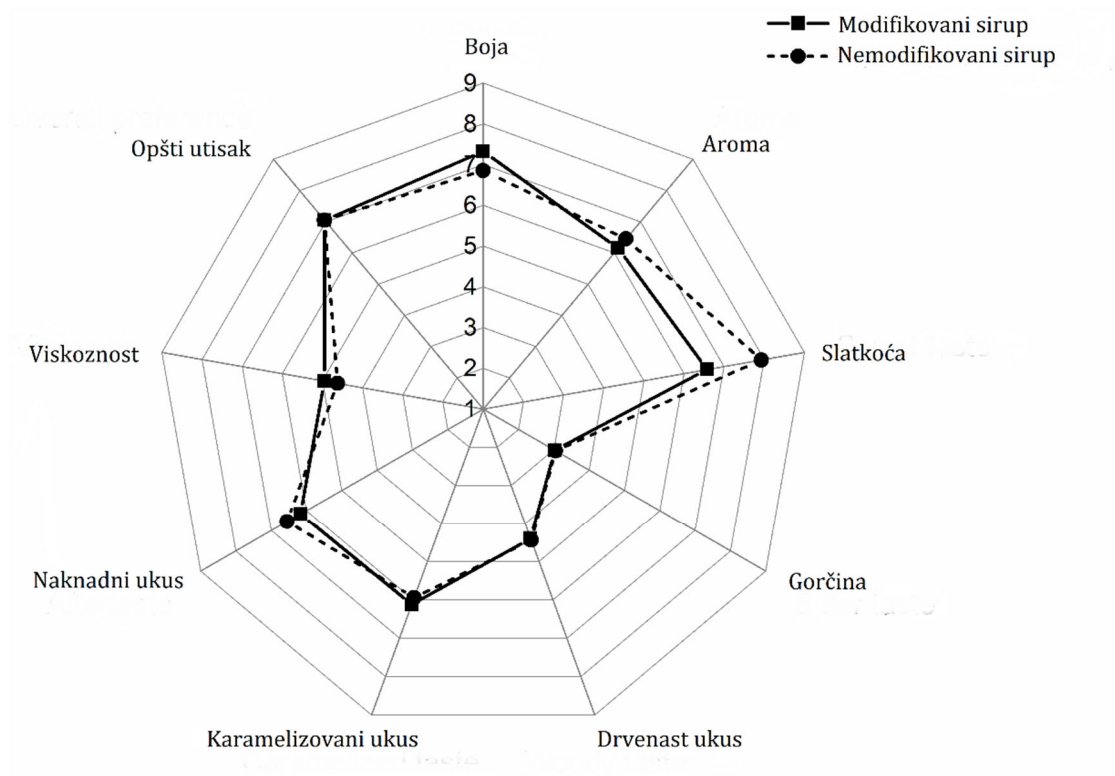
Ispitan je i prebiotski potencijal nemodifikovanog i modifikovanog javorovog sirupa kako bi se procenila sposobnost podsticanja rasta korisnih crevnih mikroba. Za tu svrhu testirane su različite koncentracije sirupa (1,0-5,0 % (v/v)) na rast probiotskih sojeva *L. plantarum* 299v i *S. boulardii* CBS 5926, ali i indikatorskog soja patogene vrste *E. coli* ATCC 25922 (slika 4.63). Rezultati su izraženi izračunavanjem prebiotske aktivnosti (PAS) prema jednačini 25 (poglavlje 3.2.15). Nemodifikovani javorov sirup nije pokazao prebiotski efekat. Imajući u vidu da pozitivne vrednosti PAS ukazuju na postojanje prebiotskog efekta u slučaju modifikovanog javorovog sirupa, sa slike 4.64 se može primetiti da sa povećanjem ponuđene koncentracije, dolazi do porasta PAS za oba ispitivana mikroorganizma. Izraženiji efekat primećen je kod bakterijskog soja u poređenju sa sojem kvasca. Naime, u uslovima najveće primenjene koncentracije modifikovanog sirupa od 5,0 %, dobijena je najveća vrednost PAS od 0,8 za *L. plantarum* 299v. U naučnoj literaturi postoje podaci o prebiotskom efektu komercijalne smeše visoke čistoće FOS (iznad 95 %) takođe na pripadnike crevne mikrobiote [252] čije dalje ugrađivanje u prehrambene proizvode može dovesti do hidrolize ukupnih oligosaharida usled različitih proizvodnih procesa, a posledično i do smanjenja prebiotnog potencijala. Na primer, postoje podaci da je komercijalna smeša (koja takođe sadrži više od 95 % FOS) inkorporirana u mafine rezultirala veoma niskom vrednošću PAS, dok nakon dodavanja u kolačiće nije zabeležen prebiotski potencijal [344]. Dakle, dobijene vrednosti PAS za ceo ispitani opseg

koncentracija modifikovanog javorovog sirupa predstavljaju prihvatljiv rezultat, pogotovo što se odnose na konkretan proizvod.



Slika 4.62. Prebiotska aktivnost različitih koncentracija modifikovanog javorovog sirupa

Ono što javorov sirup posebno izdvaja od drugih proizvoda jesu jedinstven ukus, boja i tekstura. S obzirom na to da je izvedena enzimaska modifikacija komercijalnog javorovog sirupa u pravcu dobijanja funkcionalnog proizvoda obogaćenog prebioticima, na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu sprovedena je senzorna analiza kako bi se procenile sve potencijalne promene proizvoda. U sprovođenju senzorne analize učestvovalo je 40 neobučanih ispitanika koji su ocenjivali modifikovani i nemodifikovani javorov sirup u pogledu senzornih osobina poput boje, arome, slatkoće, gorčine, drvenastog ukusa, karamelizovanog ukusa, naknadnog ukusa, teksture. Na osnovu grafikona paukove mreže koji omogućava prikazivanje rezultata senzorne analize (slika 4.64), može se primetiti da proizvodi pokazuju samo neznatne razlike između ispitivanih parametara. Dobijeno je da modifikovani javorov sirup ima manju slatkoću (ocena 6,6) u odnosu na nemodifikovani (ocena 7,9), što je i bilo očekivano s obzirom na to da je biotransformacija saharoze rezultirala FOS koji imaju niži stepen slatkoće [63]. Međutim, ovaj fenomen je ublažen prisustvom glukoze, kao i fruktoze koja ima veću moć zaslađivanja od saharoze [345]. Ispitanici su takođe primetili da modifikovani sirup ima intenzivniju boju i veći viskozitet koji se može pripisati prisutnim oligosaharidima [63], dok druge razlike u senzornom profilu nisu detektovane. Analizirajući rezultate zbirne procene ispitanika (opšti utisak) datih proizvoda, može se zaključiti da je 40 % dalo prednost modifikovanom proizvodu, 32,5 % nemodifikovanom, dok je ostatak (27,5 %) ostao neodlučan. Rezultati senzorne evaluacije ukazuju da je javorov sirup obogaćen prebioticima organoleptički prihvatljiv i da poseduje veliki potencijal za buduću primenu.



Slika 4.63. Senzorna analiza modifikovanog (puna linija) i nemodifikovanog javorovog isrupa (isprekidana linija)

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu sprovedenih istraživanja i predstavljenih rezultata u okviru ove doktorske disertacije izvedeni su sledeći zaključci:

- Testiranjem različitih industrijskih enzimskih preparata u reakciji sinteze FOS polazeći od saharoze kao supstrata, kao najpogodniji za dalji rad izabran je Pectinex® Ultra SP-L. Detaljnom optimizacijom kinetički kontrolisane reakcije transfruktozilacije potvrđeno je da temperatura, koncentracija enzima i koncentracija supstrata predstavljaju ključne faktore od kojih zavisi efikasnost sinteze FOS i izabrani su optimalni uslovi: temperatura 50 °C, koncentracija supstrata 500 g/L i enzima 2,55 IU/mL. Pri definisanim uslovima nastaje smeša u kojoj su dominantne komponente FOS (60,2 %) u obliku tri-, tetra- i pentasaharida, dok se kao sporedni proizvodi izdvajaju neproreagovala saharoza (10,1 %), glukoza i fruktoza (29,7 %).
- Istraživanjem imobilizacije fruktoziltransferaze na različite tipove nosača posredstvom različitih mehanizama vezivanja došlo se do sledećih saznanja:
 - Modifikovane nanočestice silike sa uvedenim amino (AFNS) i hloridnim (CCAFNS) funkcionalnim grupama pogodni su nosači za imobilizaciju FT, dok se nemodifikovane nanočestice (FNS) sa prisutnim hidrosilnim funkcionalnim grupama, usled niske katalitičke aktivnosti imobilisanih preparata, nisu pokazale kao adekvatne za dalju primenu.
 - Metakrilatni komercijalni nosači sa primarnim amino (ECR8409F) i butil/epoksidnim (ECR8285F) funkcionalnim grupama iz Purolite Lifetech™ ECR serije su pogodni, dok se hidrofobni nosač sa oktadecil funkcionalnim grupama (ECR8806M) nije pokazao kao pogodan za dalju primenu.
 - Makroporozni komercijalni nosač sa primarnim amino grupama Purolite® A109, kao i funkcionalizovani derivati dobijeni tretmanima sa GA i epihlorhidrinom radi uvođenja karbonilnih i epoksidnih funkcionalnih grupa i mogućnosti kovalentne imobilizacije, pogodni su za imobilizaciju FT. Primena Purolite® A109 nosača u nemodifikovanom i modifikovanom obliku rezultirala je dobijanjem imobilisanih preparata FT sa različitim tipom interakcija.
 - Purolite® A109 je zbog dimenzija i gustine izabran kao najpogodniji nosač za primenu u bioreaktorima pa je imobilizacija na ovaj nosač i njegove funkcionalizovane derivate detaljnije optimizovana. Pri optimalnim uslovima (pH 6,0, koncentraciju enzima 50 mg/g nosača i vreme imobilizacije 5 h) imobilizacije FT adsorpcijom na nemodifikovani Purolite® A109 dobijen je imobilisani preparat FT maksimalne katalitičke aktivnosti od 343 IU/g, a omogućeno je i selektivno vezivanje FT u odnosu na pektinaze iz komercijalnog enzimskog preparata s obzirom na to da je odnos prinosa aktivnosti koji odražava selektivnost imao vrednost 20. Time je dokazano da se ovom strategijom omogućava delimično prečišćavanje FT od drugih hidrolitičkih enzima iz primenjenog enzimskog preparata selektivnom imobilizacijom što je od izuzetnog značaja za buduću potencijalnu implementaciju imobilisanih preparata u kompleksnim supstratima.
 - Nakon detaljne optimizacije postupaka imobilizacije FT na funkcionalizovane nosače koji mogu da se primenjuju za kovalentnu imobilizaciju ustanovljeno je da je epoksi-

modifikovani nosač Purolite® A109 pogodniji za primenu u reakciji sinteze FOS. Adekvatnim izborom optimalnih uslova (pH 4,0 u prvoj fazi, a potom 9,0, koncentracija enzima 20 mg/g nosača, vreme imobilizacije 24 h) omogućena je visoka selektivnost imobilizacije FT (19). Strategijom imobilizacije koja uključuje promenu reakcionih uslova (pH sredine) omogućeno je kombinovano vezivanje FT tj. najpre favorizovanje adsorpcije, a potom i uspostavljanja kovalentnih veza. Ovim pristupom dobijen je imobilisani preparat FT sa značajnim udelom kovalentnih veza (85, 31%).

- Imobilisani preparati FT dobijeni primenom nemodifikovanog i epoksi-modifikovanog nosača Purolite® A109 uspešno su iskorišćeni u cilju razvijanja postupaka sinteze FOS u pneumatskom (air-lift) reaktorskom sistemu u šaržnom režimu rada, kao i za realizaciju kontinualne produkcije FOS u ovom reaktoru.
 - Rezultati testiranja operativne stabilnosti imobilisanih preparata FT dobijeni primenom nemodifikovanog i epoksi-modifikovanog nosača Purolite® A109 u konvencionalnom šaržnom i pneumatskom reaktoru jasno upućuju na izuzetnu operativnu stabilnost. Nakon 10 reakcionih ciklusa imobilisani preparat FT dobijen primenom epoksi-modifikovanog nosača Purolite® A109 potpuno je zadržao svoju inicijalnu aktivnost, dok je nakon 15 reakcionih ciklusa zadržao 87,7 % i 83,0 % svoje inicijalne aktivnosti u slučaju pneumatskog i šaržnog reaktora, redom. Shodno tome, rezultati operativne stabilnosti potvrđuju bolje karakteristike pneumatskog reaktora u poređenju sa konvencionalnim šaržnim reaktorom.
 - Imobilisani preparat FT dobijen primenom epoksi-modifikovanog nosača Purolite® A109 uspešno je primenjen za relizaciju kontinualne proizvodnje FOS u trajanju od 7 dana koja je rezultirala dobijanjem proizvoda sa udelom FOS od 52,2%.
- Važan deo istraživanja u okviru disertacije je bio posvećen optimizaciji prečišćavanja FOS primenom membranskih separacija i razvoju sistema za istovremeno odvijanje enzimske reakcije sinteze FOS i prečišćavanje u membranskom reaktoru. Najvažniji naučni doprinosi ovog dela istraživanja su:
 - Reakciona smeša dobijena primenom FT u optimalnim uslovima uspešno je prečišćena primenom membranskog modula za nanofiltraciju od tankoslojne kompozitne poliamidne membrane NFW (MWCO 300-500 Da) u dijafiltracionom režimu rada. Detaljnom optimizacijom procesa nanofiltracije potvrđeno je da promena procesnih parametara poput temperature i protoka permeata utiče na efikasnost razdvajanja što potvrđuju i dobijeni koeficijenti odbijanja, dok početna koncentracija ukupnih ugljenih hidrata nije ostvarila značajan uticaj. Izborom optimalnih uslova koji uključuju temperaturu od 35 °C, protok permeata od 22 mL/min i inicijalnu koncentraciju ukupnih ugljenih hidrata napojne smeše od 0,03 g/mL, dobijena je visokoprečišćena smeša sledećeg sastava: 87,2 % FOS, 10,3 % saharoze i 2,5 % monosaharida.
 - Primenom membranskog reaktora koji uključuje simultano izvođenje sinteze FOS i prečišćavanja, uspešno je sprovedena intenzifikacija konvencionalnog postupka prečišćavanja. Nakon 9 h izvođenja procesa, dobijena je smeša sledećeg sastava: 91,8 % FOS, 3,43 % saharoze i 4,81 % monosaharida. Ovim pristupom razvijen je efikasniji i ekonomski pogodniji proces koji ima za cilj dobijanje smeše visoke čistoće FOS, uz skraćenje proizvodnog postupka i smanjenje broja neophodnih uređaja.

- Iako su FOS već priznati prebiotici, u ovoj disertaciji je urađena i detaljnija analiza aktivnosti dobijenih proizvoda testiranjem prebiotskog efekta u kompjuterski kontrolisanom in vitro TIM-2 modelu kojim se došlo do sledećih saznanja:
 - Utvrđeno je da suplementacija uzorkom koji je sadržao prečišćenu smešu FOS statistički značajno stimuliše rast korisnih bakterija iz roda *Blautia*, *Butyricoccus*, *Catenibacterium*, *Prevotellaceae* UCG- 003, *Alloprevotella*, *Eubacterium_ruminantium* grupe i *Eubacterium_hallii* grupe u odnosu na suplementaciju kontrolnim uzorkom (SIEM) sa dodatim ugljenim hidratima (pektin, arabinogalaktan, amilopektin, ksilan i skrob).
 - Utvrđeno je da je suplementacija prečišćenom smešom FOS rezultirala većom proizvodnjom ukupnih SCFA u odnosu na kontrolni uzorak. U pogledu pojedinačnih masnih kiselina, suplementacija FOS rezultirala je većom proizvodnjom sirćetne i propionske, dok je suplementacija kontrolnog uzorka rezultirala većom produkcijom buterne kiseline.
- FT je primenjena u javorovom sirupu radi in situ biokonverzije saharoze u FOS, sa ciljem dobijanja proizvoda obogaćenog prebioticima niže kalorijske, a veće funkcionalne vrednosti.
 - Izborom procesnih parametara sinteze FOS (temperatura 60 °C i koncentracija enzima 7,65 IU/mL) dobijen je modifikovani javorov sirup sledećeg sastava: 56,0 % FOS, 27,3 % monosaharida i 16,7 % saharoze u ukupnim ugljenim hidratima.
 - Modifikovani javorov sirup sadrži 1,6 puta nižu kalorijsku vrednost u poređenju sa polaznim javorovim sirupom. Modifikovani javorov sirup je zadržao svoj inicijalni sadržaj polifenola i antioksidanata, pokazao prebiotski potencijal i izrazitu stabilnost u pogledu koncentracije FOS.
 - Rezultati sprovođenja senzorne evaluacije impliciraju na zaključak da je modifikovani javorov sirup organoleptički prihvatljiv i da poseduje veliki potencijal za buduću primenu.

LITERATURA

1. Dominguez, A.L., et al., *An Overview of the Recent Developments on Fructooligosaccharide Production and Applications*. Food and Bioprocess Technology, 2013. **7**(2): p. 324-337.
2. Temple, N.J., *A rational definition for functional foods: A perspective*. Frontiers in Nutrition, 2022. **9**: p. 957516.
3. Flores-Maltos, D.A., et al., *Biotechnological production and application of fructooligosaccharides*. Critical Review in Biotechnology, 2016. **36**(2): p. 259-67.
4. Bali, V., et al., *Fructo-oligosaccharides: Production, Purification and Potential Applications*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2015. **55**(11): p. 1475-90.
5. Singh, R.S., R.P. Singh, and J.F. Kennedy, *Recent insights in enzymatic synthesis of fructooligosaccharides from inulin*. International Journal of Biological Macromolecules, 2016. **85**: p. 565-72.
6. Dias, G.S., et al., *Fructooligosaccharides: A Comprehensive Review on Their Microbial Source, Functional Benefits, Production Technology, and Market Prospects*. Processes, 2025. **13**(4).
7. Bié, J., et al., *Enzyme Immobilization and Co-Immobilization: Main Framework, Advances and Some Applications*. Processes, 2022. **10**(3): p. 494.
8. Maghraby, Y.R., et al., *Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications*. ACS Omega, 2023. **8**(6): p. 5184-5196.
9. Vignesh, A., et al., *A review on the influence of nutraceuticals and functional foods on health*. Food Chemistry Advances, 2024. **5**: p. 100749.
10. Gomaa, E.Z., *Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review*. Antonie Van Leeuwenhoek, 2020. **113**(12): p. 2019-2040.
11. Hou, K., et al., *Microbiota in health and diseases*. Signal Transduct Target Ther, 2022. **7**(1): p. 135.
12. Cani, P.D., *Human gut microbiome: hopes, threats and promises*. Gut, 2018. **67**(9): p. 1716-1725.
13. Berg, G., et al., *Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges*. Microbiome, 2020. **8**(1): p. 103.
14. Adak, A. and M.R. Khan, *An insight into gut microbiota and its functionalities*. Cellular and Molecular Life Sciences 2019. **76**(3): p. 473-493.
15. Meijers, B., P. Evenepoel, and H.J. Anders, *Intestinal microbiome and fitness in kidney disease*. Nature Reviews | Nephrology, 2019. **15**(9): p. 531-545.
16. Cresci, G.A. and E. Bawden, *Gut Microbiome: What We Do and Don't Know*. Nutrition in Clinical Practice, 2015. **30**(6): p. 734-46.
17. Rinninella, E., et al., *What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases*. Microorganisms, 2019. **7**(1).
18. Rosenberg, E., *Diversity of bacteria within the human gut and its contribution to the functional unity of holobionts*. NPJ Biofilms Microbiomes, 2024. **10**(1): p. 134.
19. Thursby, E. and N. Juge, *Introduction to the human gut microbiota*. Biochemical Journal, 2017. **474**(11): p. 1823-1836.

20. Nardone, G. and D. Compare, *The human gastric microbiota: Is it time to rethink the pathogenesis of stomach diseases?* United European Gastroenterology Journal, 2015. **3**(3): p. 255-60.
21. Ren, Y., et al., *Lifestyle patterns influence the composition of the gut microbiome in a healthy Chinese population.* Nature Scientific Reports, 2023. **13**(1): p. 14425.
22. Markowiak, P. and K. Slizewska, *Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health.* Nutrients, 2017. **9**(9): p. 1021.
23. Khan, I., et al., *Mechanism of the Gut Microbiota Colonization Resistance and Enteric Pathogen Infection.* Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 2021. **11**: p. 716299.
24. Rosas-Plaza, S., et al., *Human Gut Microbiome Across Different Lifestyles: From Hunter-Gatherers to Urban Populations.* Frontiers in Microbiology, 2022. **13**: p. 843170.
25. Stavrou, G. and K. Kotzampassi, *Gut microbiome, surgical complications and probiotics.* Annals of Gastroenterology, 2017. **30**(1): p. 45-53.
26. Zhang, Y.J., et al., *Impacts of gut bacteria on human health and diseases.* International Journal of Molecular Sciences, 2015. **16**(4): p. 7493-519.
27. Maciel-Fiuza, M.F., et al., *Role of gut microbiota in infectious and inflammatory diseases.* Frontiers in Microbiology, 2023. **14**: p. 1098386.
28. Senghor, B., et al., *Gut microbiota diversity according to dietary habits and geographical provenance.* Human Microbiome Journal, 2018. **7-8**: p. 1-9.
29. Shah, S.S., O. Noman, and N. Jaiswal, *Unveiling the Gut Microbiome: How Junk Food Impacts the Gut.* Cureus, 2023. **15**(11): p. e49179.
30. Afzaal, M., et al., *Human gut microbiota in health and disease: Unveiling the relationship.* Frontiers in Microbiology, 2022. **13**: p. 999001.
31. Lloyd-Price, J., G. Abu-Ali, and C. Huttenhower, *The healthy human microbiome.* Genome Medicine, 2016. **8**(1): p. 51.
32. Kumar, A., et al., *Gut Microbiota in Anxiety and Depression: Unveiling the Relationships and Management Options.* Pharmaceuticals, 2023. **16**(4): p. 565.
33. Vijay, A. and A.M. Valdes, *Role of the gut microbiome in chronic diseases: a narrative review.* European Journal of Clinical Nutrition, 2022. **76**(4): p. 489-501.
34. Wang, J.W., et al., *Fecal microbiota transplantation: Review and update.* Journal of the Formosan Medical Association, 2019. **118** p. S23-S31.
35. Hill, C., et al., *Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic.* Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2014. **11**(8): p. 506-514.
36. Gibson, G.R., et al., *Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics.* Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2017. **14**(8): p. 491-502.
37. Hutkins, R.W., et al., *Prebiotics: why definitions matter.* Current Opinion in Biotechnology, 2016. **37**: p. 1-7.
38. Martins, G.N., et al., *Technological Aspects of the Production of Fructo and Galacto-Oligosaccharides. Enzymatic Synthesis and Hydrolysis.* Frontiers in Nutrition 2019. **6**: p. 78.

39. Holscher, H.D., *Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota*. Gut Microbes, 2017. **8**(2): p. 172-184.
40. Carlson, J.L., et al., *Health Effects and Sources of Prebiotic Dietary Fiber*. Current Developments in Nutrition 2018. **2**(3): p. nzy005.
41. Ferreira-Lazarte, A., F.J. Moreno, and M. Villamiel, *Bringing the digestibility of prebiotics into focus: update of carbohydrate digestion models*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2021. **61**(19): p. 3267-3278.
42. Wang, Y., *Prebiotics: Present and future in food science and technology*. Food Research International, 2009. **42**(1): p. 8-12.
43. Hernandez, E. and S. Pandiella, *Development of Probiotics and Prebiotics*, in *Engineering Aspects of Food Biotechnology*. 2013. p. 21-60.
44. Míguez, B., et al., *Pectic Oligosaccharides and Other Emerging Prebiotics*, in *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*. 2016. p. 301-330.
45. Wongkaew, M., et al., *Mango Pectic Oligosaccharides: A Novel Prebiotic for Functional Food*. Frontiers in Nutrition, 2022. **9**: p. 798543.
46. Veljković, M., et al., *Established and emerging prebiotics for gut microbiota*. Microbiota in Health and Disease, 2024. **6**(e1125).
47. Martinez, K.B., J.D. Mackert, and M.K. McIntosh, *Polyphenols and Intestinal Health*, in *Nutrition and Functional Foods for Healthy Aging*. 2017. p. 191-210.
48. Al-Sheraji, S.H., et al., *Prebiotics as functional foods: A review*. Journal of Functional Foods, 2013. **5**(4): p. 1542-1553.
49. Ashwini, A., et al., *Reactive mechanism and the applications of bioactive prebiotics for human health: Review*. Journal of Microbiological Methods, 2019. **159**: p. 128-137.
50. Bedu-Ferrari, C., et al., *Prebiotics and the Human Gut Microbiota: From Breakdown Mechanisms to the Impact on Metabolic Health*. Nutrients, 2022. **14**(10).
51. Parada Venegas, D., et al., *Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases*. Frontiers in Immunology, 2019. **10**: p. 277.
52. Chandel, V., et al., *Current Advancements in Pectin: Extraction, Properties and Multifunctional Applications*. Foods, 2022. **11**(17): p. 2683.
53. Cerdo, T., et al., *The Role of Probiotics and Prebiotics in the Prevention and Treatment of Obesity*. Nutrients, 2019. **11**(3): p. 635.
54. Kim, C.H., *Complex regulatory effects of gut microbial short-chain fatty acids on immune tolerance and autoimmunity*. Cellular & Molecular Immunology 2023. **20**(4): p. 341-350.
55. Wang, X., et al., *Prebiotic Supplementation of In Vitro Fecal Fermentations Inhibits Proteolysis by Gut Bacteria, and Host Diet Shapes Gut Bacterial Metabolism and Response to Intervention*. Applied and Environmental Microbiology, 2019. **85**(9): p. e02749-18.
56. Ballongue, J., C. Schumann, and P. Quignon, *Effects of lactulose and lactitol on colonic microflora and enzymatic activity*. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 1997. **222**: p. 41-44.
57. Varvara, R.A. and D.C. Vodnar, *Probiotic-driven advancement: Exploring the intricacies of mineral absorption in the human body*. Food Chemistry: X, 2024. **21**: p. 101067.
58. Whisner, C.M. and L.F. Castillo, *Prebiotics, Bone and Mineral Metabolism*. Calcified Tissue International 2018. **102**(4): p. 443-79.

59. Yang, J. and Y. Xu, *Functional Carbohydrate Polymers: Prebiotics*, in *Polymers for Food Applications*. 2018. p. 651-691.
60. Vulevic, J., et al., *Modulation of the fecal microflora profile and immune function by a novel trans-galactooligosaccharide mixture (B-GOS) in healthy elderly volunteers*. American Journal of Clinical Nutrition, 2008. **88**(5): p. 1438-46.
61. Dehghan, P., B. Pourghassem Gargari, and M. Asghari Jafar-abadi, *Oligofructose-enriched inulin improves some inflammatory markers and metabolic endotoxemia in women with type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled clinical trial*. Nutrition, 2014. **30**(4): p. 418-23.
62. Brosseau, C., et al., *Prebiotics: Mechanisms and Preventive Effects in Allergy*. Nutrients, 2019. **11**(8).
63. Kherade, M., et al., *Fructooligosaccharides: A comprehensive review*. Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine, 2021. **7**(3): p. 193-200.
64. Alatorre-Santamaría, S., A. Cruz-Guerrero, and F. Guzmán-Rodríguez, *Fructooligosaccharides (FOS)*, in *Handbook of Food Bioactive Ingredients*. 2023. p. 1271-1300.
65. Le Bourgot, C., et al., *Gastrointestinal Tolerance of Short-Chain Fructo-Oligosaccharides from Sugar Beet: An Observational, Connected, Dose-Ranging Study in Healthy Volunteers*. Nutrients, 2022. **14**(7): p. 1461.
66. Singh, S.P., et al., *Prebiotic Oligosaccharides: Special Focus on Fructooligosaccharides, Its Biosynthesis and Bioactivity*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2017. **183**(2): p. 613-635.
67. Diez-Municio, M., et al., *Enzymatic synthesis and characterization of fructooligosaccharides and novel maltosylfructosides by inulosucrase from Lactobacillus gasseri DSM 20604*. Applied and Environmental Microbiology, 2013. **79**(13): p. 4129-4140.
68. Maiorano, A.E., et al., *Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of prebiotics*. Biotechnology Letters, 2008. **30**(11): p. 1867-1877.
69. Jovanovic-Malinovska, R., S. Kuzmanova, and E. Winkelhausen, *Oligosaccharide Profile in Fruits and Vegetables as Sources of Prebiotics and Functional Foods*. International Journal of Food Properties, 2014. **17**(5): p. 949-965.
70. Collins, M.E. and R.A. Rastall, *Oligosaccharides in Food and Agriculture*, in *Glycoscience*, Fraser-Reid B, Tatsuta K, and T. J, Editors. 2008, Springer: Berlin, Heidelberg. p. 1185-1204.
71. Ni Lochlainn, M., et al., *Effect of gut microbiome modulation on muscle function and cognition: the PROMOTe randomised controlled trial*. Nature Communications, 2024. **15**(1): p. 1859.
72. Mancilla-Margalli, N.A. and M.G. López, *Water-Soluble Carbohydrates and Fructan Structure Patterns from Agave and Dasylirion Species*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(20): p. 7832-7839.
73. Meyer, D. and J. de Wolf, *Inulin in bread and other cereal-based products*, in *Technology of Functional Cereal Products*. 2008. p. 409-427.
74. Ronkart, S.N., et al., *Isolation and identification of inulooligosaccharides resulting from inulin hydrolysis*. Analytica Chimica Acta, 2007. **604**(1): p. 81-87.

75. Mutanda, T., et al., *Microbial enzymatic production and applications of short-chain fructooligosaccharides and inulooligosaccharides: recent advances and current perspectives*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2014. **41**(6): p. 893-906.
76. Hripko, I., et al., *Obtaining and Identification of Inulin from Jerusalem Artichoke (Helianthus Tuberosus) Tubers*. Foods and Raw Materials, 2015. **3**(2): p. 13-22.
77. Mano, M.C.R., et al., *Oligosaccharide biotechnology: an approach of prebiotic revolution on the industry*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018. **102**(1): p. 17-37.
78. Avila-Fernandez, A., et al., *Production of functional oligosaccharides through limited acid hydrolysis of agave fructans*. Food Chemistry, 2011. **129**(2): p. 380-386.
79. Fontana, J.D., et al., *Fructo-oligosaccharide production from inulin through partial citric or phosphoric acid hydrolyses*. Journal of Medicinal Food, 2011. **14**(11): p. 1425-1430.
80. Sánchez-Martínez, M.J., et al., *Manufacturing of Short-Chain Fructooligosaccharides: from Laboratory to Industrial Scale*. Food Engineering Reviews, 2020. **12**(2): p. 149-172.
81. Chapman, J., A.E. Ismail, and C.Z. Dinu, *Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks*. Catalysts, 2018. **8**(6).
82. Bersaneti, G.T., et al., *Co-production of Fructooligosaccharides and Levan by Levansucrase from Bacillus subtilis natto with Potential Application in the Food Industry*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2018. **184**(3): p. 838-851.
83. Singh S. Ram and S.P. Rupinder, *Production of Fructooligosaccharides from Inulin by Endoinulinases and Their Prebiotic Potential*. Food Technology and Biotechnology 2010. **48**(4): p. 435-450
84. Contesini, F.J., et al., *Carbohydrate Active Enzymes Applied in the Production of Functional Oligosaccharides*, in *Reference Module in Food Science*. 2019.
85. Hill, A., et al., *Discovery of new levansucrase enzymes with interesting properties and improved catalytic activity to produce levan and fructooligosaccharides*. Catalysis Science & Technology, 2019. **9**(11): p. 2931-2944.
86. Lum, A. and J. Albrecht, *Sensory Evaluation of Ice Cream made with Prebiotic Ingredients*. RURALS: Review of Undergraduate Research in Agricultural and Life Sciences, 2008. **3**(1): p. 1-9.
87. Handa, C., S. Goomer, and A. Siddhu, *Physicochemical properties and sensory evaluation of fructooligosaccharide enriched cookies*. Journal of Food Science and Technology 2012. **49**(2): p. 192-199.
88. Karboune, S., et al., *Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides from sucrose by endoinulinase-catalyzed transfructosylation reaction in biphasic systems*. Process Biochemistry, 2018. **69**: p. 82-91.
89. Picazo, B., et al., *Enzymes for Fructooligosaccharides Production: Achievements and Opportunities*, in *Enzymes in Food Biotechnology*. 2019. p. 303-320.
90. Montet, D. and R.C. Ray, *Fermented Foods: Biochemistry and Biotechnology*. 2016: CRC Press. 412.
91. Charalampopoulos, D. and R.A. Rastall, *Prebiotics in foods*. Current Opinion in Biotechnology, 2012. **23**(2): p. 187-191.

92. Perini, M.P., et al., *Duration of Prebiotic Intake Is a Key-Factor for Diet-Induced Modulation of Immunity and Fecal Fermentation Products in Dogs*. *Microorganisms*, 2020. **8**(12): p. 1916.
93. Kumar, C.G., S. Sripada, and Y. Poornachandra, *Status and Future Prospects of Fructooligosaccharides as Nutraceuticals*, in *Role of Materials Science in Food Bioengineering*. 2018. p. 451-503.
94. Morohashi, T., et al., *Fructooligosaccharide consumption improves the decreased dentin formation and mandibular defects following gastrectomy in rats*. *Oral Diseases*, 2005. **11**(6): p. 360-364.
95. Michel, M.R., et al., *Fructosyltransferase Sources, Production, and Applications for Prebiotics Production*, in *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*. 2016. p. 169-189.
96. Aggarwal, D., L. Sabikhi, and M.H. Sathish Kumar, *Formulation of reduced-calorie biscuits using artificial sweeteners and fat replacer with dairy–multigrain approach*. *NFS Journal*, 2016. **2**: p. 1-7.
97. Simović, M., et al., *Modifikacija nadeva bundeve direktnom enzimskom sintezom frukto-oligosaharida u cilju obogaćivanja proizvoda prebioticima*. 2022.
98. Rolim, P.M., *Development of prebiotic food products and health benefits*. *Food Science and Technology (Campinas)*, 2015. **35**(1): p. 3-10.
99. Pham, V.T. and M.H. Mohajeri, *The application of in vitro human intestinal models on the screening and development of pre- and probiotics*. *Beneficial Microbes*, 2018. **9**(5): p. 725-742.
100. Bohn, T., et al., *Correlation between in vitro and in vivo data on food digestion. What can we predict with static in vitro digestion models?* *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2018. **58**(13): p. 2239-2261.
101. Zhou, H., Y. Tan, and D.J. McClements, *Applications of the INFOGEST In Vitro Digestion Model to Foods: A Review*. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2023. **14**: p. 135-156.
102. El Houari, A., et al., *Development of an in vitro Model of Human Gut Microbiota for Screening the Reciprocal Interactions With Antibiotics, Drugs, and Xenobiotics*. *Frontiers in Microbiology*, 2022. **13**: p. 828359.
103. Wang, R., et al., *In-vitro digestion models: a critical review for human and fish and a protocol for in-vitro digestion in fish*. *Bioengineered*, 2021. **12**(1): p. 3040-3064.
104. Brodkorb, A., et al., *INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion*. *Nature Protocols*, 2019. **14**(4): p. 991-1014.
105. Hernandez-Hernandez, O., *In vitro Gastrointestinal Models for Prebiotic Carbohydrates: A Critical Review*. *Current Pharmaceutical Design*, 2019. **25**(32): p. 3478-3483.
106. Oku, T., et al., *Similarity of hydrolyzing activity of human and rat small intestinal disaccharidases*. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 2011. **4**: p. 155-161.
107. Nissen, L., F. Casciano, and A. Gianotti, *Intestinal fermentation in vitro models to study food-induced gut microbiota shift: an updated review*. *FEMS Microbiology Letters* 2020. **367**(12): p. 1-10.

108. Lucas-Gonzalez, R., et al., *In vitro digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges*. Food Research International, 2018. **107**: p. 423-436.
109. Gibson, G.R., J.H. Cummings, and G.T. Macfarlane, *Use of a three-stage continuous culture system to study the effect of mucin on dissimilatory sulfate reduction and methanogenesis by mixed populations of human gut bacteria*. Applied and Environmental Microbiology, 1988. **54**(11): p. 2750-2755.
110. Laforet, F., et al., *Impact Assessment of vB_KpnP_K1-ULIP33 Bacteriophage on the Human Gut Microbiota Using a Dynamic In Vitro Model*. Viruses, 2023. **15**(3): p. 719.
111. Barroso, E., et al., *The Computer-Controlled Multicompartmental Dynamic Model of the Gastrointestinal System SIMGI*, in *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, K. Verhoeckx, et al., Editors. 2015: Cham (CH). p. 319-327.
112. Minekus, M., *The TNO Gastro-Intestinal Model (TIM)*, in *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, K. Verhoeckx, et al., Editors. 2015, Springer Cham (CH).
113. Venema, K. and P. van den Abbeele, *Experimental models of the gut microbiome*. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 2013. **27**(1): p. 115-126.
114. Anson, N.M., et al., *Bioprocessing of wheat bran improves in vitro bioaccessibility and colonic metabolism of phenolic compounds*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(14): p. 6148-6155.
115. Venema, K., *The TNO In Vitro Model of the Colon (TIM-2)*, in *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, K. Verhoeckx, et al., Editors. 2015: Cham (CH). p. 293-304.
116. Reimer, R.A., et al., *Effect of the novel polysaccharide PolyGlycopleX(R) on short-chain fatty acid production in a computer-controlled in vitro model of the human large intestine*. Nutrients, 2014. **6**(3): p. 1115-1127.
117. Ferreira-Lazarte, A., et al., *Assessment of in Vitro Digestibility of Dietary Carbohydrates Using Rat Small Intestinal Extract*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017. **65**(36): p. 8046-8053.
118. Nobre, C., et al., *In vitro digestibility and fermentability of fructo-oligosaccharides produced by Aspergillus ibericus*. Journal of Functional Foods, 2018. **46**: p. 278-287.
119. Nobre, C., et al., *Process development for the production of prebiotic fructo-oligosaccharides by penicillium citreonigrum*. Bioresources Technology, 2019. **282**: p. 464-474.
120. Terpend, K., et al., *Arabinogalactan and fructo-oligosaccharides have a different fermentation profile in the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME (R))*. Environmental Microbiology Reports 2013. **5**(4): p. 595-603.
121. Sivieri, K., et al., *Prebiotic effect of fructooligosaccharide in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME(R) model)*. Journal of Medicinal Food, 2014. **17**(8): p. 894-901.
122. Hidaka, H., M. Hirayama, and N. Sumi, *A Fructooligosaccharide-producing Enzyme from Aspergillus niger ATCC 20611*. Agricultural and Biological Chemistry, 2016. **52**(5): p. 1181-1187.

123. Chen, W.-c. and C.-h. Liu, *Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus**. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996. **18**(2): p. 153-160.
124. Antosova, M., et al., *Chromatographic separation and kinetic properties of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans**. *Journal of Biotechnology*, 2008. **135**(1): p. 58-63.
125. Vega-Paulino, R.J. and M.E. Zúniga-Hansen, *Potential application of commercial enzyme preparations for industrial production of short-chain fructooligosaccharides*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2012. **76**: p. 44-51.
126. Lorenzoni, A.S., et al., *Fructooligosaccharides synthesis by highly stable immobilized beta-fructofuranosidase from *Aspergillus aculeatus**. *Carbohydrate Polymers*, 2014. **103**: p. 193-197.
127. Ganaie, M.A., A. Lateef, and U.S. Gupta, *Enzymatic Trends of Fructooligosaccharides Production by Microorganisms*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014. **172**(4): p. 2143-2159.
128. Jitonnom, J., J.R. Ketudat-Cairns, and S. Hannongbua, *QM/MM modeling of the hydrolysis and transfructosylation reactions of fructosyltransferase from *Aspergillus japonicus*, an enzyme that produces prebiotic fructooligosaccharide*. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2018. **79**: p. 175-184.
129. Mitchell, D.A. and N. Krieger, *Looking through a new lens: Expressing the Ping Pong bi bi equation in terms of specificity constants*. *Biochemical Engineering Journal*, 2022. **178**: p. 108276.
130. Jung, K.H., et al., *Mathematical model for enzymatic production of fructo-oligosaccharides from sucrose*. *Enzyme and Microbial Technology*, 1989. **11**(8): p. 491-494.
131. Guio, F., et al., *Kinetic modeling of fructooligosaccharide production using *Aspergillus oryzae* N74*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012. **167**(1): p. 142-163.
132. Alvarado-Huallanco, M.B. and F. Maugeri Filho, *Kinetic studies and modelling of the production of fructooligosaccharides by fructosyltransferase from *Rhodotorula sp.** *Catalysis Science & Technology*, 2011. **1**(6): p. 1043.
133. Nishizawa, K., M. Nakajima, and H. Nabetani, *Kinetic Study on Transfructosylation by β -Fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611 and Availability of a Membrane Reactor for Fructooligosaccharide Production*. *Food Science and Technology Research*, 2001. **7**(1): p. 39-44.
134. Romano, N., et al., *Effect of sucrose concentration on the composition of enzymatically synthesized short-chain fructo-oligosaccharides as determined by FTIR and multivariate analysis*. *Food Chemistry*, 2016. **202**: p. 467-475.
135. Karkeszová, K. and M. Polakovič, *Production of Fructooligosaccharides Using a Commercial Heterologously Expressed *Aspergillus sp.* Fructosyltransferase*. *Catalysts*, 2023. **13**(5): p. 843.
136. Nemukula, A., et al., *Response surface methodology: Synthesis of short chain fructooligosaccharides with a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus**. *Bioresource Technology*, 2009. **100**(6): p. 2040-2045.
137. Nobre, C., et al., *Production of fructo-oligosaccharides by *Aspergillus ibericus* and their chemical characterization*. *LWT*, 2018. **89**: p. 58-64.

138. Dominguez, A., et al., *New improved method for fructooligosaccharides production by Aureobasidium pullulans*. Carbohydrate Polymers 2012. **89**(4): p. 1174-1179.
139. Belmonte-Izquierdo, Y., et al., *Fructooligosaccharides (FOS) Production by Microorganisms with Fructosyltransferase Activity*. Fermentation, 2023. **9**(11): p. 968.
140. Maugeri, F. and S. Hernalsteens, *Screening of yeast strains for transfructosylating activity*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2007. **49**(1-4): p. 43-49.
141. Meyer, T.S.M., et al., *Biotechnological Production of Oligosaccharides — Applications in the Food Industry*, in *Food Production and Industry*. 2015. p. 25-78.
142. Rawat, H.K., et al., *Recent developments in the production of prebiotic fructooligosaccharides using fungal fructosyltransferases*. Mycology, 2024. **15**(4): p. 564-584.
143. Virgen-Ortiz, J.J., et al., *Identification and Functional Characterization of a Fructooligosaccharides-Forming Enzyme from Aspergillus aculeatus*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2016. **179**(3): p. 497-513.
144. Homaei, A.A., et al., *Enzyme immobilization: an update*. Journal of Chemical Biology, 2013. **6**(4): p. 185-205.
145. Bashir, N., M. Sood, and J.D. Bandral, *Enzyme immobilization and its applications in food processing: A review*. International Journal of Chemical Studies, 2020. **8**(2): p. 254-261.
146. Kulsharova, G., et al., *Simplified immobilisation method for histidine-tagged enzymes in poly(methyl methacrylate) microfluidic devices*. New Biotechnology, 2018. **47**: p. 31-38.
147. Knežević-Jugović, Z., *Enzimsko inženjerstvo*. 2008, Beograd: Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu.
148. Plou, F.J., et al., *Application of immobilized enzymes for the synthesis of bioactive fructooligosaccharides*, J. Moreno F. and M.L. Sanz, Editors. 2014, John Wiley & Sons: Ltd, Chichester, UK. p. 552.
149. Guisan, J.M., *Immobilization of Enzymes and Cells*. 3rd ed, ed. J.M. Walker. 2013: Humana Press.
150. Prabhakar, T., et al., *Covalent immobilization: A review from an enzyme perspective*. Chemical Engineering Journal, 2025. **503**: p. 158054.
151. Vijayalakshmi, S., M. Anand, and J. Ranjitha, *Microalgae-Based Biofuel Production Using Low-Cost Nanobiocatalysts*, in *Microalgae Cultivation for Biofuels Production*. 2020. p. 251-263.
152. Zucca, P. and E. Sanjust, *Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: methods and mechanisms*. Molecules, 2014. **19**(9): p. 14139-14194.
153. Novick, S. and D. Rozzell, *Immobilization of Enzymes by Covalent Attachment*, in *Microbial Enzymes and Biotransformations*, J.L. Barredo, Editor. 2005, Humana Press Inc: Totowa, NJ. p. 247-271.
154. Nisha, S., S. Arun Karthick, and N. Gobi, *A Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme*. Chemical Science Review and Letters 2012. **1**(3): p. 148-155.
155. Blanco-Llamero, C., P. Garcia-Garcia, and F.J. Senorans, *Cross-Linked Enzyme Aggregates and Their Application in Enzymatic Pretreatment of Microalgae: Comparison Between CLEAs and Combi-CLEAs*. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2021. **9**: p. 794672.

156. Yamaguchi, H., Y. Kiyota, and M. Miyazaki, *Techniques for Preparation of Cross-Linked Enzyme Aggregates and Their Applications in Bioconversions*. Catalysts, 2018. **8**(5): p. 174.
157. Mohidem, N.A., et al., *Recent Advances in Enzyme Immobilisation Strategies: An Overview of Techniques and Composite Carriers*. Journal of Composites Science, 2023. **7**(12): p. 488.
158. Magdy, E., *The Art of Immobilization Using Biopolymers, Biomaterials and Nanobiotechnology*, in *Biotechnology of Biopolymers*. 2011. p. 1-32.
159. Mohamad, N.R., et al., *An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes*. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2015. **29**(2): p. 205-220.
160. Bayne, L., R.V. Ulijn, and P.J. Halling, *Effect of pore size on the performance of immobilised enzymes*. Chemical Society Reviews, 2013. **42**(23): p. 9000-9010.
161. Santos, J.C.S.d., et al., *Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes*. ChemCatChem, 2015. **7**(16): p. 2413-2432.
162. Mokhtar, N.F., et al., *The Immobilization of Lipases on Porous Support by Adsorption and Hydrophobic Interaction Method*. Catalysts, 2020. **10**(7): p. 744.
163. Zdarta, J., et al., *A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility*. Catalysts, 2018. **8**(2): p. 92.
164. Gupta, D. and G. Modi, *Polymer-Based Strategies for Enzyme Immobilization: A Comprehensive Review*. Journal of Propulsion Technology, 2023. **44**(5): p. 792-802.
165. Yun, J.W., S.C. Kang, and S.-K.J.B.T. Song, *Continuous production of fructooligosaccharides from sucrose by immobilized fructosyltransferase*. Biotechnology Techniques, 1995. **9**: p. 805-808.
166. Hayashi, S., et al., *Immobilization of β -fructofuranosidase from Aureobasidium on DEAE-cellulose*. Journal of Industrial Microbiology, 1994. **13**(2): p. 103-105.
167. Aguiar-Oliveira, E. and F. Maugeri, *Characterization of the Immobilized Fructosyltransferase from Rhodotorula sp.* International Journal of Food Engineering, 2010. **6**(3): p. 1-19.
168. Alvarado-Huallanco, M.B. and F. Maugeri-Filho, *Kinetics and modeling of fructooligosaccharide synthesis by immobilized fructosyltransferase from Rhodotorula sp.* Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2010. **85**(12): p. 1654-1662.
169. Mussatto, S.I., et al., *Production of fructooligosaccharides and β -fructofuranosidase by batch and repeated batch fermentation with immobilized cells of Penicillium expansum*. European Food Research and Technology, 2012. **235**: p. 13-22.
170. Garcia, L.A., et al., *Synthesis and characterization of a novel silica-niobia support for the immobilization of microbial fructosyltransferase aiming at fructooligosaccharides production*. Materials Today Communications, 2022. **31**: p. 103588.
171. Hayashi, S., et al., *Properties of Aspergillus japonicus β -fructofuranosidase immobilized on porous silica*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1993. **9**(2): p. 216-220.
172. Chiang, C.J., et al., *Immobilization of beta-fructofuranosidases from Aspergillus on methacrylamide-based polymeric beads for production of fructooligosaccharides*. Biotechnology Progress, 1997. **13**(5): p. 577-582.

173. Nishizawa, K., M. Nakajima, and H. Nabetani, *A forced-flow membrane reactor for transfructosylation using ceramic membrane*. Biotechnol and Bioengineering, 2000. **68**(1): p. 92-97.
174. Tanriseven, A. and Y. Aslan, *Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce fructooligosaccharides*. Enzyme and Microbial Technology, 2005. **36**(4): p. 550-554.
175. Ghazi, I., et al., *Immobilisation of fructosyltransferase from Aspergillus aculeatus on epoxy-activated Sepabeads EC for the synthesis of fructo-oligosaccharides*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2005. **35**(1-3): p. 19-27.
176. Cheng, T.C., K.J. Duan, and D.C. Sheu, *Immobilization of beta-fructofuranosidase from Aspergillus japonicus on chitosan using tris(hydroxymethyl)phosphine or glutaraldehyde as a coupling agent*. Biotechnology Letters 2005. **27**(5): p. 335-338.
177. Lorenzoni, A.S.G., et al., *Continuous production of fructooligosaccharides and invert sugar by chitosan immobilized enzymes: Comparison between in fluidized and packed bed reactors*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2015. **111**: p. 51-55.
178. Oliveira, R.L.d., et al., *Immobilization of a commercial Aspergillus aculeatus enzyme preparation with fructosyltransferase activity in chitosan beads: A kinetic/thermodynamic study and fructo-oligosaccharides continuous production in enzymatic reactor*. Food and Bioproducts Processing, 2020. **122**: p. 169-182.
179. de Oliveira, R.L., et al., *Fructo-oligosaccharides production by an Aspergillus aculeatus commercial enzyme preparation with fructosyltransferase activity covalently immobilized on Fe(3)O(4)-chitosan-magnetic nanoparticles*. International Journal of Biological Macromolecules, 2020. **150**: p. 922-929.
180. Martínez, D., et al., *Rational design and immobilization of a recombinant sucrose: Sucrose 1-fructosyltransferase on Sepabeads® and ReliZyme™ supports for short-chain fructooligosaccharides production*. Process Biochemistry, 2024. **137**: p. 71-84.
181. Hayashi, S., et al., *Long-term continuous reaction of immobilized β-fructofuranosidase*. Biotechnology Letters, 1994. **16**(3): p. 227-228.
182. Cheng, C.-Y., et al., *Production of fructooligosaccharides by immobilized mycelium of Aspergillus japonicus*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 1996. **66**: p. 135-138.
183. Fernandez-Arrojo, L., et al., *Dried alginate-entrapped enzymes (DALGEEs) and their application to the production of fructooligosaccharides*. Process Biochemistry, 2013. **48**(4): p. 677-682.
184. Zambelli, P., et al., *An efficient continuous flow process for the synthesis of a non-conventional mixture of fructooligosaccharides*. Food Chemistry, 2016. **190**: p. 607-613.
185. Csanádi, Z. and C. Sisak, *Immobilization of pectinex ultra sp-l pectinase and its application to production of fructooligosaccharides*. Acta Alimentaria, 2006. **35**(2): p. 205-212.
186. Platková, Z., et al., *Selection of carrier for immobilization of fructosyltransferase from Aureobasidium pullulans*. Chemical Papers, 2006. **60**(6): p. 469-472.
187. Kurakake, M., et al., *Production of fructooligosaccharides by beta-fructofuranosidases from Aspergillus oryzae KB*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(1): p. 488-492.

188. Ademakinwa, A.N., et al., *Preparation, characterization and optimization of cross-linked fructosyltransferase aggregates for the production of prebiotic fructooligosaccharides*. *BioTechnologia*, 2018. **99**(4): p. 417-434.
189. Poppe, J.K., et al., *Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects*. *Biotechnology Advances*, 2015. **33**(5): p. 511-525.
190. Ureta, M.M., et al., *Recent advances in beta-galactosidase and fructosyltransferase immobilization technology*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021. **61**(16): p. 2659-2690.
191. Kovács, Z., et al., *Kinetic behavior of soluble Pectinex Ultra SP-L converting sucrose into fructo-oligosaccharides in batch and continuous fashion*. *Progress in Agricultural Engineering Sciences*, 2020. **16**(1): p. 81-97.
192. Jaswal, A.S., R. Elangovan, and S. Mishra, *Fructooligosaccharides: Production by recombinant fructosyltransferase from Festuca arundinacea in a continuous reactor and kinetic modeling profile*. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2024. **7**: p. 100511.
193. Li, L., et al., *Hydrodynamics and mass transfer of concentric-tube internal loop airlift reactors: A review*. *Bioresource Technology*, 2022. **359**: p. 127451.
194. Xu, X. and Y. Zhang, *Hydrodynamics and Mass Transfer in an Airlift Loop Reactor: Comparison between Using Two Kinds of Spargers*. *Processes*, 2023. **12**(1): p. 35.
195. Duan, Y. and F. Shi, *Bioreactor design for algal growth as a sustainable energy source, in Reactor and Process Design in Sustainable Energy Technology*. 2014. p. 27-60.
196. Milivojevic, M., S. Pavlou, and B. Bugarski, *Liquid velocity in a high-solids-loading three-phase external-loop airlift reactor*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2012. **87**(11): p. 1529-1540.
197. Lin, T.J. and Y.C. Lee, *High-content fructooligosaccharides production using two immobilized microorganisms in an internal-loop airlift bioreactor*. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, 2008. **39**(3): p. 211-217.
198. Li, W., et al., *Study on nanofiltration for purifying fructo-oligosaccharides*. *Journal of Membrane Science*, 2004. **245**(1-2): p. 123-129.
199. Zeng, M., J.P. van Pijkeren, and X. Pan, *Gluco-oligosaccharides as potential prebiotics: Synthesis, purification, structural characterization, and evaluation of prebiotic effect*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2023. **22**(4): p. 2611-2651.
200. Hage, D.S., *Chromatography, in Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry*. 2018. p. 1-32.
201. Nobre, C., P. Suvarov, and G. De Weireld, *Evaluation of commercial resins for fructo-oligosaccharide separation*. *New Biotechnology*, 2014. **31**(1): p. 55-63.
202. Vente, J.A., et al., *Comparison Of Sorption Isotherms Of Mono- and Disaccharides Relevant To Oligosaccharide Separations For Na, K, And Ca Loaded Cation Exchange Resins*. *Chemical Engineering Communications*, 2005. **192**(1): p. 23-33.
203. Vaňková, K. and M. Polakovič, *Optimization of single-column chromatographic separation of fructooligosaccharides*. *Process Biochemistry*, 2010. **45**(8): p. 1325-1329.
204. Campos, D., et al., *Effect of Yacon (Smallanthus sonchifolius) fructooligosaccharide purification technique using activated charcoal or ion exchange fixed bed column on*

- recovery, purity and sugar content. *International Journal of Food Science & Technology*, 2017. **52**(12): p. 2637-2646.
205. Kruschitz, A. and B. Nidetzky, *Downstream processing technologies in the biocatalytic production of oligosaccharides*. *Biotechnology Advance*, 2020. **43**: p. 107568.
206. Nobre, C., J.A. Teixeira, and L.R. Rodrigues, *Fructo-oligosaccharides purification from a fermentative broth using an activated charcoal column*. *New Biotechnology*, 2012. **29**(3): p. 395-401.
207. Kuhn, R.C. and F.M. Filho, *Purification of fructooligosaccharides in an activated charcoal fixed bed column*. *New Biotechnology*, 2010. **27**(6): p. 862-869.
208. Kuhn, R.C., M.A. Mazutti, and F. Maugeri Filho, *Separation and purification of fructooligosaccharides on a zeolite fixed-bed column*. *Journal of separation science*, 2014. **37**(8): p. 927-933.
209. Nobre, C., et al., *Strategies for the production of high-content fructo-oligosaccharides through the removal of small saccharides by co-culture or successive fermentation with yeast*. *Carbohydrate Polymers*, 2016. **136**: p. 274-281.
210. Yang, Y.-l., et al., *Preparation of High-Purity Fructo-oligosaccharides by Aspergillus japonicus β -Fructofuranosidase and Successive Cultivation with Yeast*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008. **56**(8): p. 2805-2809.
211. Kuhn, R.C., et al., *Mass transfer and transport during purification of fructooligosaccharides by nanofiltration*. *Journal of Membrane Science*, 2010. **365**(1-2): p. 356-365.
212. Wenten, I.G., *Recent Development in Membrane and Its Industrial Applications. Membrane Technology in Oil and Gas Industry*. 2005.
213. Wenten, I.G. and Khoiruddin, *Reverse osmosis applications: Prospect and challenges*. *Desalination*, 2016. **391**: p. 112-125.
214. Loeb, S., *The Loeb-Sourirajan Membrane: How It Came About*, in *Synthetic Membranes*:. 1981, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. p. 1-9.
215. Li, L., et al., *Development of membrane separation technology and membrane-based bioreactor in wastewater treatment: conventional membrane and dynamic membrane*. *Desalination and Water Treatment*, 2023. **304**: p. 36-46.
216. Ma, R., et al., *The Application of Membrane Separation Technology in the Pharmaceutical Industry*. *Membranes* 2024. **14**(1): p. 24.
217. Li, X., et al., *Nanofiltration for separation and purification of saccharides from biomass*. *Frontiers of chemical science and engineering*., 2021. **15**(4): p. 837-853.
218. Pinelo, M., G. Jonsson, and A.S. Meyer, *Membrane technology for purification of enzymatically produced oligosaccharides: Molecular and operational features affecting performance*. *Separation and Purification Technology*, 2009. **70**(1): p. 1-11.
219. Gul, A., J. Hruza, and F. Yalcinkaya, *Fouling and Chemical Cleaning of Microfiltration Membranes: A Mini-Review*. *Polymers*, 2021. **13**(6): p. 846.
220. Antov, M., *Bioseparaciono inženjerstvo*. 2010, Novi Sad: Tehnološki fakultet. 152.
221. Imbrogno, A., et al., *Molecular weight cut off (MWCO) determination in ultra- and nanofiltration: Review of methods and implications on organic matter removal*. *Separation and Purification Technology*, 2025. **354**: p. 128612.
222. Charcosset, C., *Membrane processes in biotechnology: an overview*. *Biotechnology Advances* 2006. **24**(5): p. 482-492.

223. Bolto, B., et al., *A Review on Current Development of Membranes for Oil Removal from Wastewaters*. Membranes 2020. **10**(4): p. 65.
224. Obotey Ezugbe, E. and S. Rathilal, *Membrane Technologies in Wastewater Treatment: A Review*. Membranes 2020. **10**(5): p. 89.
225. Raji, Y.O., et al., *Surface matrix functionalization of ceramic-based membrane for oil-water separation: A mini-review*. Korean Journal of Chemical Engineering, 2020. **37**(10): p. 1631-1641.
226. Warsinger, D.M., et al., *A review of polymeric membranes and processes for potable water reuse*. Progress in Polymer Science, 2016. **81**: p. 209-237.
227. Adewole, J.K., et al., *A review of seawater desalination with membrane distillation: material development and energy requirements*. Water Supply, 2022. **22**(12): p. 8500-8526.
228. Su, Z., et al., *Enzyme membrane reactors for production of oligosaccharides: A review on the interdependence between enzyme reaction and membrane separation*. Separation and Purification Technology, 2020. **243**: p. 116840.
229. Chen, X.Y., et al., *Membrane gas separation technologies for biogas upgrading*. RSC Advances, 2015. **5**(31): p. 24399-24448.
230. Wen, J., et al., *Experiment on and modeling of purification of fructooligosaccharides using ceramic nanofiltration membranes*. Separation and Purification Technology, 2023. **323**: p. 124508.
231. Kuhn, R.C., et al., *Selection of membranes for purification of fructooligosaccharides*. Desalination and Water Treatment, 2011. **27**(1-3): p. 18-24.
232. Sano, T., *CHA Zeolite Membrane*, in *Encyclopedia of Membranes*. 2014. p. 1-3.
233. Stanojević, M., B.V. Lazarevic, and D.J.F.T. Radić, *Review of membrane contactors designs and applications of different modules in industry*. FME Transactions, 2003. **31**: p. 91-98.
234. Lipnizki, F., J. Boelsmand, and R.F. Madsen, *Concepts of industrial-scale diafiltration systems*. Desalination, 2002. **144**(1): p. 179-184.
235. Cabral, R.S., *Optimization of the ultrafiltration in diafiltration mode to reduce the lactose content of protein concentrates*. 2015.
236. Fan, K., et al., *Comparison of polyamide, polyesteramide and polyester nanofiltration membranes: properties and separation performance*. Separation and Purification Technology, 2022. **297**: p. 121579.
237. Padhan, B., et al., *Production and Bioconversion Efficiency of Enzyme Membrane Bioreactors in the Synthesis of Valuable Products*. Membranes 2023. **13**(7): p. 673.
238. Nabarlantz, D., et al., *Purification of xylo-oligosaccharides from almond shells by ultrafiltration*. Separation and Purification Technology, 2007. **53**(3): p. 235-243.
239. Goulas, A.K., et al., *Purification of oligosaccharides by nanofiltration*. Journal of Membrane Science, 2002. **209**(1): p. 321-335.
240. Luo, J., et al., *Separation of Sucrose and Reducing Sugar in Cane Molasses by Nanofiltration*. Food and Bioprocess Technology, 2018. **11**(5): p. 913-925.
241. Feng, Y.M., et al., *Separation of galacto-oligosaccharides mixture by nanofiltration*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2009. **40**(3): p. 326-332.
242. Silva, F.C., *Fouling of Nanofiltration Membranes*, in *Nanofiltration*. 2018. p. 119-131.

243. Cao, W., et al., *From sucrose to fructo-oligosaccharides: Production and purification of fructo-oligosaccharides by an integrated enzymatic catalysis and membrane separation process*. Separation and Purification Technology, 2022. **288**: p. 120678.
244. Elst, K., et al., *Continuous production of pectic oligosaccharides from sugar beet pulp in a cross flow continuous enzyme membrane reactor*. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2018. **41**(11): p. 1717-1729.
245. Ren, H., et al., *Continuous ultrafiltration membrane reactor coupled with nanofiltration for the enzymatic synthesis and purification of galactosyl-oligosaccharides*. Separation and Purification Technology, 2015. **144**: p. 70-79.
246. Miller, G.L., *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar*. Analytical Chemistry, 1959. **31**(3): p. 426-428.
247. Hartree, E.F., *Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response*. Analytical Biochemistry, 1972. **48**(2): p. 422-427.
248. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, 1976. **72**(1): p. 248-254.
249. Dhiman, S., et al., *Immobilization of mannanase on sodium alginate-grafted-beta-cyclodextrin: An easy and cost effective approach for the improvement of enzyme properties*. International Journal of Biological Macromolecules, 2020. **156**: p. 1347-1358.
250. Trawczyńska, I., *New Method of Determining Kinetic Parameters for Decomposition of Hydrogen Peroxide by Catalase*. Catalysts, 2020. **10**(3): p. 323.
251. Michelon, M., et al., *Concentration and purification of galacto-oligosaccharides using nanofiltration membranes*. International Journal of Food Science & Technology, 2014. **49**(8): p. 1953-1961.
252. Anand, S., S. Mandal, and S.K. Tomar, *Effect of Lactobacillus rhamnosus NCDC 298 with FOS in Combination on Viability and Toxin Production of Enterotoxigenic Escherichia coli*. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2019. **11**(1): p. 23-29.
253. Aguirre, M., et al., *To pool or not to pool? Impact of the use of individual and pooled fecal samples for in vitro fermentation studies*. Journal of Microbiological Methods, 2014. **107**: p. 1-7.
254. Bolyen, E., et al., *Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2*. Nature Biotechnology, 2019. **37**(8): p. 852-857.
255. Callahan, B.J., et al., *DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data*. Nature Methods, 2016. **13**(7): p. 581-583.
256. Price, M.N., P.S. Dehal, and A.P. Arkin, *FastTree 2--approximately maximum-likelihood trees for large alignments*. PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9490.
257. Quast, C., et al., *The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools*. Nucleic Acids Research, 2013. **41**(Database issue): p. D590-596.
258. McMurdie, P.J. and S. Holmes, *phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e61217.
259. Liu, C., et al., *microeco: an R package for data mining in microbial community ecology*. FEMS Microbiology Ecology, 2021. **97**(2).

260. Finotello, F., E. Mastrorilli, and B. Di Camillo, *Measuring the diversity of the human microbiota with targeted next-generation sequencing*. Briefings in Bioinformatics, 2018. **19**(4): p. 679-692.
261. Anderson, M.J., et al., *Some solutions to the multivariate Behrens–Fisher problem for dissimilarity-based analyses*. Australian & New Zealand Journal of Statistics, 2017. **59**(1): p. 57-79.
262. Zhou, H., et al., *LinDA: linear models for differential abundance analysis of microbiome compositional data*. Genome Biology, 2022. **23**(1): p. 95.
263. Abou-Zaid, M.M., et al., *High-Performance Liquid Chromatography Characterization and Identification of Antioxidant Polyphenols in Maple Syrup*. Pharmaceutical Biology, 2008. **46**(1-2): p. 117-125.
264. Milutinović, M., et al., *Optimisation of microwave-assisted extraction parameters for antioxidants from waste Achillea millefolium dust*. Industrial Crops and Products, 2015. **77**: p. 333-341.
265. Scarabattoli, L., et al., *Use of carbohydrases to promote protein extraction from rice bran and soybean meal: A comparative study*. LWT, 2023. **184**: p. 115060.
266. Vega, R. and M.E. Zuniga-Hansen, *Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides with high 1-kestose concentrations using response surface methodology*. Bioresource Technology, 2011. **102**(22): p. 10180-10186.
267. Battestin, V. and G.A. Macedo, *Effects of temperature, pH and additives on the activity of tannase produced by Paecilomyces variotii*. Electronic Journal of Biotechnology, 2007. **10**(2): p. 191-199.
268. Rodrigues, I., M.G. Carvalho, and J.M.S. Rocha, *Increasing the protein content of rapeseed meal by enzymatic hydrolysis of carbohydrates*. BioResources, 2014. **9**(2): p. 2010-2025.
269. Bisswanger, H., *Enzyme assays*. Perspectives in Science, 2014. **1**(1-6): p. 41-55.
270. Cheng, Y., et al., *Characterization and Prebiotic Potential of Longan Juice Obtained by Enzymatic Conversion of Constituent Sucrose into Fructo-Oligosaccharides*. Molecules, 2018. **23**(10): p. 2596.
271. Kashyap, R., T. Palai, and P.K. Bhattacharya, *Kinetics and model development for enzymatic synthesis of fructo-oligosaccharides using fructosyltransferase*. Bioprocess and Biosystems Engineering 2015. **38**(12): p. 2417-2426.
272. Edwards, C.H., et al., *The role of sugars and sweeteners in food, diet and health: Alternatives for the future*. Trends in Food Science & Technology, 2016. **56**: p. 158-166.
273. Fathi, M., et al., *Use of Nanotechnology for Immobilization and Entrapment of Food Applicable Enzymes*, in *Bioactive Molecules in Food*, J.-M. Mérillon and K.G. Ramawat, Editors. 2019, Springer International Publishing: Cham. p. 2037-2061.
274. Altammar, K.A., *A review on nanoparticles: characteristics, synthesis, applications, and challenges*. Frontiers in Microbiology, 2023. **14**: p. 1155622.
275. Rudramurthy, G.R. and M.K. Swamy, *Potential applications of engineered nanoparticles in medicine and biology: an update*. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2018. **23**(8): p. 1185-1204.
276. Banjanac, K., et al., *Novel β -galactosidase nanobiocatalyst systems for application in the synthesis of bioactive galactosides*. RSC Advances, 2016. **6**(99): p. 97216-97225.

277. Eker, F., et al., *A Comprehensive Review of Nanoparticles: From Classification to Application and Toxicity*. *Molecules*, 2024. **29**(15): p. 3482.
278. Banjanac, K., et al., *Epoxy-silanization - tool for improvement of silica nanoparticles as support for lipase immobilization with respect to esterification activity*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2016. **91**(10): p. 2654-2663.
279. Milivojević, A., et al., *Flavonoid esters synthesis using novel biocatalytic systems - CAL B immobilized onto LifeTech™ ECR supports*. *Biochemical Engineering Journal*, 2020. **163**: p. 107748.
280. Carević, M., *Proizvodnja i imobilizacija mikrobnih β -galaktozidaza za primenu u transgalaktozilacionim reakcijama*. 2016, Univerzitet u Beogradu: Beograd, Srbija.
281. Purolite., *Purolite Lifetech™ ECR Enzyme Immobilization Resins*. 2014.
282. Tokmakov, A.A., A. Kurotani, and K.I. Sato, *Protein pl and Intracellular Localization*. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2021. **8**: p. 775736.
283. Hu, Y., et al., *Dye adsorption by resins: Effect of ionic strength on hydrophobic and electrostatic interactions*. *Chemical Engineering Journal*, 2013. **228**: p. 392-397.
284. Torres-Salas, P., et al., *Immobilized biocatalysts: novel approaches and tools for binding enzymes to supports*. *Advanced Materials*, 2011. **23**(44): p. 5275-5282.
285. Sekuljica, N.Z., et al., *Immobilization of horseradish peroxidase onto Purolite(R) A109 and its anthraquinone dye biodegradation and detoxification potential*. *Biotechnology Progress*, 2020. **36**(4): p. e2991.
286. Mihailovic, M., et al., *Immobilization of maltase from *Saccharomyces cerevisiae* on thiosulfonate supports*. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2016. **81**(12): p. 1371-1382.
287. Ghazi, I., et al., *Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus**. *Journal of Biotechnology*, 2007. **128**(1): p. 204-211.
288. Olwoch, I.P., et al., *The effects of the natural enzyme, Pectinex Ultra SP-L, on human cell cultures and bacterial biofilms in vitro*. *BMC Microbiology*, 2014. **14**(1): p. 251.
289. Faria, L.L., et al., *Biochemical characterization of extracellular fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301 immobilized on silica gel for the production of fructooligosaccharides*. *Biotechnology Letters*, 2021. **43**(1): p. 43-59.
290. Yang, O., M. Qadan, and M. Ierapetritou, *Economic Analysis of Batch and Continuous Biopharmaceutical Antibody Production: A Review*. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 2019. **14**: p. 1-19.
291. Nguyen, H.H. and M. Kim, *An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization*. *Applied Science and Convergence Technology*, 2017. **26**(6): p. 157-163.
292. Onur, H., et al., *A new highly enantioselective stable epoxide hydrolase from *Hypsibius dujardini*: Expression in *Pichia pastoris* and immobilization in ZIF-8 for asymmetric hydrolysis of racemic styrene oxide*. *SSRN Electronic Journal*, 2022. **189**: p. 108726.
293. Barbosa, O., et al., *Heterofunctional supports in enzyme immobilization: from traditional immobilization protocols to opportunities in tuning enzyme properties*. *Biomacromolecules*, 2013. **14**(8): p. 2433-2462.
294. Betancor, L., et al., *Glutaraldehyde in Protein Immobilization*, in *Immobilization of Enzymes and Cells*. 2008, Humana Press. p. 57-64.

295. Veljković, M., et al., *Heterofunctional epoxy support development for immobilization of fructosyltransferase from Pectinex® Ultra SP-L: batch and continuous production of fructo-oligosaccharides*. Reaction Chemistry & Engineering, 2022. **7**(12): p. 2518-2526.
296. Corradini, F.A.S., et al., *High stabilization and hyperactivation of a Recombinant beta-Xylosidase through Immobilization Strategies*. Enzyme and Microbial Technology, 2021. **145**: p. 109725.
297. Aslan, Y., D. Ömerosmanoğlu, and E.Ö. Koç, *Covalent immobilization of an alkaline protease from Bacillus licheniformis*. Turkish Journal of Biochemistry, 2018. **43**(6): p. 595-604.
298. Betancor, L., et al., *Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions*. Enzyme and Microbial Technology, 2006. **39**(4): p. 877-882.
299. Mateo, C., et al., *Multi-Point Covalent Immobilization of Enzymes on Supports Activated with Epoxy Groups: Stabilization of Industrial Enzymes*. Methods in molecular biology, 2020. **2100**: p. 109-117.
300. Smith, B.C., *Infrared Spectroscopy of Polymers, IX: Pendant Ester Polymers and Polycarbonates*. Spectroscopy, 2022.
301. Hanefeld, U., *Immobilization as a Tool for Improving Enzymes in Modern Biocatalysis: Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions.*, W.-D. Fessner and T. Anthonsen, Editors. 2009, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. p. 21-39.
302. Jia, J., et al., *Novel Magnetic Cross-Linked Cellulase Aggregates with a Potential Application in Lignocellulosic Biomass Bioconversion*. Molecules, 2017. **22**(2): p. 269.
303. Milivojevic, M., et al., *Dependence of slip velocity on operating parameters of air-lift bioreactors*. Chemical Engineering Journal, 2007. **132**(1-3): p. 117-123.
304. geor malar, C., et al., *Review on surface modification of nanocarriers to overcome diffusion limitations: An enzyme immobilization aspect*. Biochemical Engineering Journal, 2020. **158**: p. 107574.
305. Balwierz, R., et al., *Nano-Silica Carriers Coated by Chloramphenicol: Synthesis, Characterization, and Grinding Trial as a Way to Improve the Release Profile*. Pharmaceuticals 2022. **15**(6): p. 703.
306. Park, H.B., et al., *Maximizing the right stuff: The trade-off between membrane permeability and selectivity*. Science, 2017. **356**(6343).
307. Machado, M.T.C., et al., *Clarification and concentration of oligosaccharides from artichoke extract by a sequential process with microfiltration and nanofiltration membranes*. Journal of Food Engineering, 2016. **180**: p. 120-128.
308. Grandison, A., A. Goulas, and R. Rastall, *The use of dead-end and cross-flow nanofiltration to purify prebiotic oligosaccharides from reaction mixtures*. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 2002. **24**: p. 915-928.
309. Baker, R., *Membrane Technology and Applications*. 2012: A John Wiley & Sons.
310. Huebner, J., R.L. Wehling, and R.W. Hutkins, *Functional activity of commercial prebiotics*. International Dairy Journal, 2007. **17**(7): p. 770-775.
311. Miguez, B., et al., *Prebiotic effects of pectooligosaccharides obtained from lemon peel on the microbiota from elderly donors using an in vitro continuous colon model (TIM-2)*. Food & Function, 2020. **11**(11): p. 9984-9999.

312. Kers, J.G. and E. Saccenti, *The Power of Microbiome Studies: Some Considerations on Which Alpha and Beta Metrics to Use and How to Report Results*. *Frontiers in Microbiology* 2021. **12**: p. 796025.
313. Geirnaert, A., et al., *Butyricoccus pullicaecorum, a butyrate producer with probiotic potential, is intrinsically tolerant to stomach and small intestine conditions*. *Anaerobe*, 2014. **30**: p. 70-74.
314. Wade, W.G., *The Genus Eubacterium and Related Genera*, in *The Prokaryotes*. 2006. p. 823-835.
315. Mantri, A., et al., *Beneficial Effects of Synbiotics on the Gut Microbiome in Individuals with Low Fiber Intake: Secondary Analysis of a Double-Blind, Randomized Controlled Trial*. *Nutrients*, 2024. **16**(13): p. 2082.
316. Rajilic-Stojanovic, M. and W.M. de Vos, *The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota*. *FEMS Microbiology Reviews*, 2014. **38**(5): p. 996-1047.
317. Recharla, N., R. Geesala, and X.Z. Shi, *Gut Microbial Metabolite Butyrate and Its Therapeutic Role in Inflammatory Bowel Disease: A Literature Review*. *Nutrients*, 2023. **15**(10): p. 2275.
318. Chambers, E.S., et al., *Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults*. *Gut*, 2015. **64**(11): p. 1744-1754.
319. Chen, T., et al., *Fiber-utilizing capacity varies in Prevotella- versus Bacteroides-dominated gut microbiota*. *Scientific Reports*, 2017. **7**(1): p. 2594.
320. Geirnaert, A., et al., *Interindividual differences in response to treatment with butyrate-producing Butyricoccus pullicaecorum 25-3T studied in an in vitro gut model*. *FEMS Microbiology Ecology*, 2015. **91**(6): p. fiv054.
321. Popov, I.V., B. Koopmans, and K. Venema, *Modulation of human gut microbiota by linear and branched fructooligosaccharides in an in vitro colon model (TIM-2)*. *Journal of Applied Microbiology*, 2024. **135**(7): p. lxae170.
322. Mukherjee, A., et al., *Gut microbes from the phylogenetically diverse genus Eubacterium and their various contributions to gut health*. *Gut Microbes*, 2020. **12**(1): p. 1802866.
323. Macfarlane, G.T. and S. Macfarlane, *Bacteria, Colonic Fermentation, and Gastrointestinal Health*. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 2019. **95**(1): p. 50-60.
324. Betancur-Murillo, C.L., S.B. Aguilar-Marin, and J. Jovel, *Prevotella: A Key Player in Ruminant Metabolism*. *Microorganisms*, 2022. **11**(1).
325. Tett, A., et al., *Prevotella diversity, niches and interactions with the human host*. *Nature Reviews Microbiology* 2021. **19**(9): p. 585-599.
326. Venema, K., et al., *Xylo-oligosaccharides from sugarcane show prebiotic potential in a dynamic computer-controlled in vitro model of the adult human large intestine*. *Beneficial Microbes*, 2020. **11**(2): p. 191-200.
327. Xiong, R.G., et al., *Health Benefits and Side Effects of Short-Chain Fatty Acids*. *Foods*, 2022. **11**(18): p. 2863.
328. Mansuy-Aubert, V. and Y. Ravussin, *Short chain fatty acids: the messengers from down below*. *Frontiers in Neuroscience*, 2023. **17**: p. 1197759.

329. Lin, Y.-W., Y.-C. Hsiao, and B.-H. Chiang, *Production of high degree polymerized chitooligosaccharides in a membrane reactor using purified chitosanase from Bacillus cereus*. Food Research International, 2009. **42**(9): p. 1355-1361.
330. Das, R., et al., *A Comparative Study on the Production of Galacto-oligosaccharide from Whey Permeate in Recycle Membrane Reactor and in Enzymatic Batch Reactor*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2011. **50**(2): p. 806-816.
331. Saraiva, A., et al., *Maple Syrup: Chemical Analysis and Nutritional Profile, Health Impacts, Safety and Quality Control, and Food Industry Applications*. International Journal of Environmental Research and Public Health 2022. **19**(20): p. 13684.
332. Mohammed, F., et al., *Chemical composition and mineralogical residence of maple syrup: A comprehensive review*. Food Chemistry, 2022. **374**: p. 131817.
333. Castro-Muñoz, R., et al., *Natural sweeteners: Sources, extraction and current uses in foods and food industries*. Food Chemistry, 2022. **370**: p. 130991.
334. Gad, H.A., M.F. Ramadan, and M.A. Farag, *Authentication and quality control determination of maple syrup: A comprehensive review*. Journal of Food Composition and Analysis, 2021. **100**: p. 103901.
335. González-Montemayor, Á.-M., et al., *Honey and Syrups: Healthy and Natural Sweeteners with Functional Properties*, in *Natural Beverages*. 2019. p. 143-177.
336. Tandel, K.R., *Sugar substitutes: Health controversy over perceived benefits*. Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics, 2011. **2**(4): p. 236-43.
337. Weaver, N.J., et al., *Minimizing the energy requirements for the production of maple syrup*. Journal of Food Engineering, 2020. **273**: p. 109823.
338. Guerra, L., et al., *Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides: From carrot discards to prebiotic juice*. Food Research International, 2023. **170**: p. 112991.
339. Stephen, A.M., et al., *Dietary fibre in Europe: current state of knowledge on definitions, sources, recommendations, intakes and relationships to health*. Nutrition Research Reviews, 2017. **30**(2): p. 149-190.
340. Bornet, F.R., et al., *Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology and health implications*. Digestive and Liver Disease, 2002. **34**: p. S111-120.
341. Clément, A., L. Lagacé, and B. Panneton, *Assessment of maple syrup physico-chemistry and typicity by means of fluorescence spectroscopy*. Journal of Food Engineering, 2010. **97**(1): p. 17-23.
342. Singh, A.S., A.M.P. Jones, and P.K. Saxena, *Variation and Correlation of Properties in Different Grades of Maple Syrup*. Plant Foods for Human Nutrition, 2014. **69**(1): p. 50-56.
343. Renuka, B., et al., *Fructooligosaccharide fortification of selected fruit juice beverages: Effect on the quality characteristics*. LWT - Food Science and Technology, 2009. **42**(5): p. 1031-1033.
344. Moore, K.E., *BIOLOGICAL ANALYSIS OF PREBIOTICS IN VARIOUS PROCESSED FOOD MATRICES* 2011, University of Nebraska: Lincoln, Nebraska.
345. Vilela, A., et al., *Sucrose Replacement by Sweeteners in Strawberry, Raspberry, and Cherry Jams: Effect on the Textural Characteristics and Sensorial Profile—A Chemometric Approach*. Journal of Food Processing, 2015. **2015**: p. 1-14.

Biografija autora

Milica B. Veljković, master inženjer tehnologije, rođena je 13. novembra 1994. godine u Pirotu gde je završila Osnovnu školu „8. septembar“ i Pirotsku gimnaziju. Osnovne akademske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2013/2014. godine, na studijskom programu Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija. Diplomirala je u septembru 2017. godine, sa prosečnom ocenom 9,40. Po završetku osnovnih studija, školske 2017/2018. godine upisala je master akademske studije na istoimenom studijskom programu. Završni master rad odbranila je u septembru 2018. godine sa ocenom 10, dok je master studije završila sa prosečnom ocenom 9,75. U toku studiranja ostvarila je ukupnu prosečnu ocenu 9,47. Doktorske akademske studije upisala je školske 2018/2019. godine, takođe na studijskom programu Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija. Završni ispit odbranila je u septembru 2020. godine ocenom 10.

U periodu od 2019 do 2022. godine, bila je zaposlena kao istraživač pripravnik u Inovacionom centru Tehnološko-metalurškog fakulteta, a od marta 2022. godine izabrana je u zvanje istraživač saradnik. Bila je angažovana u nastavi na izvođenju eksperimentalnih vežbi iz predmeta Opšta hemija 2 (školske 2018/2019. godine) i Biotehnološki praktikum 1 (školske 2019/2020., 2020/2021. i 2021/2022. godine). Učestvovala je u eksperimentalnom radu i obradi rezultata završnih i master radova studenata na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju. Od 2022. godine angažovana je na nacionalnom projektu programa Ideje finansiranog od strane Fonda za nauku Republike Srbije, kao i na evropskom projektu finansiranog od strane Horizon Europe 2021-2027.

Tokom dosadašnjeg istraživačkog rada, koautor je 2 rada objavljena u međunarodnim časopisima izuzetnih vrednosti (M21a), 8 radova u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), 1 rada u istaknutom međunarodnom časopisu (M22), 1 rada u nacionalnom časopisu od međunarodnog značaja (M24), 1 tehničkog rešenja (M82) i 14 apstrakata sa konferencija. Ukupan broj citata naučnih radova je 43, a Hiršov indeks 5.

Prilog

Dokaz o uplaćenju naknadi za upotrebu BioRender-a

Receipt



Invoice number 43C53AD2-0002
Receipt number 2329-5958
Date paid July 22, 2024
Payment method [REDACTED]
CA GST/HST 779568310RT0001

Science Suite Inc. DBA BioRender
49 Spadina Avenue
Suite 200
Toronto Ontario M5V 2J1
Canada
+1 844-970-3616
support@biorender.com
CA GST/HST 779568310RT0001

Bill to
Milica Veljković
[REDACTED]
[REDACTED]
Belgrade
11000
Serbia
[REDACTED]

Ship to
Milica Veljković
[REDACTED]
[REDACTED]
Belgrade
11000
Serbia

\$47.00 paid on July 22, 2024

Description	Qty	Unit price	Amount
Academic Individual Plan Monthly (Charged in USD) (per seat) Jul 22 – Aug 22, 2024	1	\$47.00	\$47.00
Subtotal			\$47.00
Total			\$47.00
Amount paid			\$47.00

We no longer accept checks as a form of payment. The provided bank account details or a credit card may be used for Purchase Order transactions. Monthly subscriptions and in-app purchases require credit card payment. Thank you for your cooperation.

Wire Payment (ACH) Information:

Please send wire payments to: SCIENCE SUITE INC.

ABA/Routing Number: 026013958

Beneficiary Account Number: 665857182

Wire Payment Information:

Swift Code: CINAUS6L (International)

Bank Name: City National Bank, Bank Address: 1140 Avenue of the Americas, New York, NY 10036

Your free trial with Science Suite Inc. DBA BioRender started on July 8, 2024 and ended on July 22, 2024.

Your card [REDACTED] will be charged \$47.00 every month.

Visit <https://app.biorender.com/account/billing> to update or cancel your subscription.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Милица Вељковић

Број индекса 4003/2018

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Ензимска синтеза и мембранско пречишћавање фрукто-олигосахарида

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 14.04.2025.

M. Veljkovic

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милица Вељковић

Број индекса 4003/2018

Студијски програм Биохемијско инжењерство и биотехнологија

Наслов рада Ензимска синтеза и мембранско пречишћавање фрукто-олигосахарида

Ментори проф. др Дејан Безбрадица и др Милица Симовић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 14.04.2025.

M. Velkovic

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Ензимска синтеза и мембранско пречишћавање фрукто-олигосахарида

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 14.04.2025.

M. Benković

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „Ензимска синтеза и мембранско пречишћавање фрукто-олигосахарида”, аутора Милице Б. Вељковић, мастер инж. технологије, констатујемо да утврђено подударње текста износи 7%. Овај степен подударности претежно је последица употребљених личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, детаљног описа методологије, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из њене дисертације што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујемо да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

20. 5. 2025. године

Ментори

D. Bebrađica

Др Дејан Безбрадица, редовни професор
Универзитет у Београду,
Технолошко-металуршки факултет

M. Simović

Др Милица Симовић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду,
Технолошко-металуршки факултет