

Univerzitet u Beogradu  
Tehnološko-metalurški fakultet

Miona G. Miljković

**Primena agro-industrijskog otpada za  
dobijanje enzima dekstransaharaze i  
proizvodnja dekstrana i oligosaharida pomoću  
imobilisanih sistema**

Doktorska disertacija

Beograd, 2020

University of Belgrade  
Faculty of Technology and Metallurgy

Miona G. Miljković

**Application of agro-industrial waste for  
obtaining enzyme dextransucrase  
and for production of dextran and  
oligosaccharides using immobilized systems**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

**Mentor:**

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

**Komentor:**

.....  
Dr Vesna Lazić, viši naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke "Vinča"

**Članovi komisije:**

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

.....  
Dr Mirjana Rajilić-Stojanović, docent  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

.....  
Dr Mila Ilić, viši naučni saradnik  
Naučna ustanova, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju,  
Institut od nacionalnog značaja, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: .....

## **Zahvalnica**

*Ova disertacija urađena je na Katedri za Biohemijско inženjerstvo i biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Rad na ovoj doktorskoj disertaciji finansiralo je Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja.*

*Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru prof. dr Suzani Dimitrijević-Branković koja mi je pružila priliku da se bavim ovom izuzetno interesantnom tematikom u okviru svog naučno-istraživačkog rada. Neizmerno sam joj zahvalna na prenetom znanju, ali i podršci, razumevanju, svesrdnoj pomoći i angažovanju u tokom izrade ove doktorske disertacije a pre svega na jednom ljudskom i prijateljskom odnosu.*

*Naročito zahvaljujem dr Vesni Lazić, višem naučnom saradniku Instituta za nuklearne nauke Vinča, na svim dobronamernim sugestijama, aktivnom učestvovanju u eksperimentalnom radu, u pisanju naučnih radova i uopšte njenom celokupnom angažmanu na tome da ova doktorska disertacija ugleda svetlost dana.*

*Veliku zahvalnost dugujem i prof. dr Dejanu Bezbradici zbog velikog angažovanja i pomoći kojom je omogućio ne samo da za izradu ove teze bude dostupna savremena oprema na kojoj su izvedeni neki eksperimenti, već i je nesebičnoj pomoći oko tumačenja rezultata. Takođe, želela bih da zahvalim doc. dr Mirjani Rajilić-Stojanović koja mi je svojim znanjem i iskustvom, kao i korisnim savetima značajno pomogla u savladavanju veštine pisanja pre svega naučnih radova a kasnije i disertacije. Iskreno zahvaljujem dr Mili Ilić, višem naučnom saradniku Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, na pomoći u eksperimentalnom radu, korisnim sugestijama i korekcijama tokom pisanja koje su uticale na konačni izgled ove doktorske disertacije. Takođe veliku zahvalnost dugujem joj i na ukazanom poverenju, prijateljskim savetima i činjenici da je bila uz mene od samog početka mog naučno-istraživačkog rada.*

*Veliko hvala kolegama doktorandima, profesorima, kao i tehničkom osoblju Katedre za Biohemijско inženjerstvo i biotehnologiju na prijatnoj radnoj atmosferi. Možda najveću zahvalnost dugujem dr Slađani Davidović koja je prvenstveno kao prijatelj a onda i kao kolega bila uvek tu za mene, i pružala mi nesebičnu pomoć tokom izrade eksperimenata kao i tokom pisanja ove teze. Posebno se zahvaljujem kolegama i prijateljima Nedi i Maji na bezrezervnoj podršci i pomoći tokom svih ovih godina. Takođe, neizmerno hvala dr Katarini Banjanac i dr Milici Simović na nesebičnoj pomoći u toku eksperimentalnog rada.*

*Konačno, ogromnu zahvalnost dugujem svojoj porodici, pre svega roditeljima, tetki i stricu, Aleksandru, svojim cimerkama i prijateljima na pruženoj podršci, razumevanju i na svemu što su do sada činili za mene.*

## Primena agro-industrijskog otpada za dobijanje enzima dekstransaharaze i proizvodnja dekstrana i oligosaharida pomoću imobilisanih sistema

### REZIME

Predmet istraživanja u okviru ove doktorske disertacije je optimizacija proizvodnje enzima dekstransaharaze, dobijene iz novog soja *Leuconostoc mesenteroides* T3, na komercijalnoj podlozi i na otpadnom supstratu, kao i imobilizacija ovog enzima na nanočestice  $\text{TiO}_2$  i unutar agar-agar filmova u cilju proizvodnje dekstrana i glukooligosaharida (GLOS).

Novi soj *Lc. mesenteroides* T3, izolovan iz zrna vodenog kefiru korišćen je kao mikroorganizam za proizvodnju i izolaciju dekstransaharaze. Optimalna podloga za maksimalnu proizvodnju enzima dobijena je variranjem uslova gajenja (kao što su temperatura i aeracija) i komponenata podloge (koncentracija saharoze i izvora azota). Dekstransaharaza dobijena u optimalnoj podlozi je zatim izolovana i prečišćena taloženjem uz pomoć polietilen glikola 400 (PEG). Karakterizacijom delimično prečišćene dekstransaharaze utvrđeno je da pokazuje najveću aktivnost na 30 °C pri pH vrednosti 5,4 i da dodatak jona  $\text{Mn}^{2+}$  ima najveći pozitivan uticaj na povećanje aktivnosti od čak 73 %. Zimogramom je pokazano da dekstransaharaza ima molekulsku masu od oko 180 kDa. Karakterizacija proizvoda reakcije katalizovane dekstransaharazom iz radnog mikroorganizma, kada u reakcionoj smeši nisu bili prisutni akceptorski molekuli, izvršena je FTIR spektroskopijom. Potvrđeno je da je molekul glukana koji je sintetisan dekstransaharazom iz *Lc. mesenteroides* T3 dekstran u kome su molekuli glukoze dominantno povezani  $\alpha$ -(1→6) glikozidnim vezama.

Za proizvodnju dekstransaharaze na otpadnom supstratu, izluženi repin rezanac (SBP, od engl. *sugar beet pulp*), veličina zrna 500  $\mu\text{m}$ –800  $\mu\text{m}$ , korišćen je kao nosač za imobilizaciju ćelija *Lc. mesenteroides* T3 dok je melasa bila izvor ugljenika, vitamina i mineralnih materija. Ispitivanjem uticaja ne-tretiranog (SBP-N) i izluženog repinog rezanca nakon tretmana sa NaOH (SBP-NaOH) na proizvodnju dekstransaharaze, bolji se pokazao repin rezanac nakon alkalnog pretretmana. Optimalan sastav podloge za maksimalnu proizvodnju dekstransaharaze dobijen je nakon variranja koncentracije melase, SBP-NaOH i saharoze. Najveća vrednost koncentracije enzimske aktivnosti od 2,02 IU/ml dobijena je u podlozi koja je bila sledećeg sastava: 2,5 % melasa, 2,5 % SBP-NaOH i 4 % saharoze. Analizom mikrofografija skenirajućeg elektronskog mikroskopa utvrđeno je da je došlo do imobilizacije ćelija soja *Lc. mesenteroides* T3 na i unutar SBP-NaOH. Dobijeni rezultati pokazali su da se proizvodnja dekstransaharaze, na supstratu kao što je melasa, može poboljšati korišćenjem alkalno tretiranog izluženog repinog rezanca kao nosača za imobilizaciju bakterijskih ćelija.

Jedan od glavnih fokusa ove studije bio je funkcionalizacija komercijalnih nanočestica  $\text{TiO}_2$  (Degussa P25) u cilju dobijanja nosača sa velikim kapacitetima za imobilizaciju dekstransaharaze. Za uvođenje različitih funkcionalnih grupa na nanočestice  $\text{TiO}_2$  korišćena su dva sintetska puta. Prvi, koji se zasniva na već poznatoj reakciji silanizacije primenom (3-glicidiloksipropil)trimetoksisilana (GOPTMS-a), doveo je do sinteze nosača sa uvedenim epoksi grupama na nanočestice  $\text{TiO}_2$  ( $\text{TiO}_2$ /GOPTMS). Drugi, novi sintetski put za modifikaciju površine  $\text{TiO}_2$  sa amino i aldehidnim grupama, razvijen je korišćenjem prednosti stvaranja kompleksa sa prenosom naelektrisanja (CTC) između površine atoma Ti i liganda tipa slicilata (5-aminosalicilna kiselina (5-ASA)), čime su prvo dobijene amino-modifikovane čestice  $\text{TiO}_2$  ( $\text{TiO}_2$ /5-ASA). Ove čestice ( $\text{TiO}_2$ /5-ASA) su zatim tretirane glutaraldehidom (GA), što je za rezultat dalo nosač ( $\text{TiO}_2$ /5-

ASA/GA) koji na površini poseduje aldehidne grupe koje mogu da formiraju kovalentnu vezu sa molekulom enzima.

Delimično prečišćena dekstransaharaza imobilisana je na nemodifikovane i modifikovane nanočestice TiO<sub>2</sub> sa amino (TiO<sub>2</sub>/5-ASA), aldehidnom (TiO<sub>2</sub>/5-ASA/GA) i epoksi (TiO<sub>2</sub>/GOPTMS) funkcionalnom grupom. Koncentracija imobilisane aktivnosti za nosač TiO<sub>2</sub>/5-ASA iznosila je 230 IU/g, za TiO<sub>2</sub> funkcionalizovan glutaraldehidom iznosila je 235 IU/g a za nosač funkcionalizovan epoksi grupom 258 IU/g, dok je za nemodifikovane čestice TiO<sub>2</sub> iznosila samo 142 IU/g. Ispitana je temperaturna stabilnost dekstransaharaze imobilisane na TiO<sub>2</sub> nosače funkcionalizovane glutaraldehidom i epoksi grupom, na 40°C, kao i mogućnost vraćanja u više uzastopnih ciklusa. Nakon pet uzastopnih ciklusa, dekstransaharaza imobilisana na nosač aktiviran glutaraldehidom (TiO<sub>2</sub>/5-ASA/GA) zadržala je gotovo 70 % od početne koncentracije imobilisane aktivnosti, dok je dekstransaharaza imobilisana na TiO<sub>2</sub>/GOPTMS nosač zadržala svega 15 % od početne koncentracije imobilisane aktivnosti.

Za sintezu GLOS, dekstransaharaza je imobilisana u agar-agar matriks, a kao akceptorski molekul korišćena je maltoza. Na osnovu rezultata prinosa imobilizacije aktivnosti, finalna koncentracija agar-agar matriksa od 2 % se pokazala kao najbolja za dalji rad. Ispitivanjem mehaničkih osobina kao što su (zatezna čvrstoća, Jangov modul elastičnosti i izduženje pri kidanju) utvrđeno je da je 9:1 najbolji odnos u kome bi trebalo da se pomešaju matriks (agar) i enzim za imobilizaciju. Kada je odnos koncentracija maltose i saharoze u reakcionoj smeši bio 6:1, nastao je samo jedan proizvod, trisaharid panoza. Imobilisana dekstransaharaza pokazala je dobru operativnu stabilnost zadržavajući oko 50 % od početne koncentracije imobilisane aktivnosti nakon pet uzastopna ciklusa.

**Ključne reči:** *Leuconostoc mesenteroides* T3, dekstransaharaza, proizvodnja enzima, imobilizacija enzima, imobilizacija ćelija, agro-industrijski otpad

**Naučna oblast:** Tehnološko inženjerstvo

**Uža naučna oblast:** Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

# Application of agro-industrial waste for obtaining dextransucrase and for production of dextran and oligosaccharides using immobilized systems

## ABSTRACT

The scope of this doctoral dissertation is the optimization of the production of dextransaccharase (DS) enzyme, obtained from a new strain *Leuconostoc mesenteroides* T3, using a commercial medium and a waste substrate, as well as the immobilization of this enzyme on TiO<sub>2</sub> nanoparticles and within agar-agar and application of these immobilized systems for the production of dextran and glucooligosaccharides (GLOS).

A new strain *Lc. mesenteroides* T3, isolated from water kefir grains, was used as a microorganism for production and isolation of enzyme dextransucrase. The optimal medium for maximum enzyme production was defined by varying the growth conditions (such as temperature and aeration) and the broth/medium components (sucrose concentration and nitrogen source). The enzyme, purified by polyethylene glycol 400 (PEG) fractionation, displayed the maximum activity at 30 °C and pH 5.4. The addition of Mn<sup>2+</sup> cation caused a significant change of DS activity, with 73% increase. Zymogram analysis showed the presence of DS of approximately 180 kDa. Characterization of the dextransucrase catalyzed reaction product, when acceptor molecules were absent from the reaction mixture, was performed by FTIR spectroscopy. The results indicated that a glucan molecule synthesized by dextransucrase from *Lc. mesenteroides* T3 was dextran in which glucose molecules were dominantly linked by  $\alpha$ - (1 → 6) glycosidic bonds.

For the dextransaccharase production on waste substrate, sugar beet pulp (SBP) of grain size 500  $\mu$ m – 800  $\mu$ m, was used as a carrier in order to immobilize *Lc. mesenteroides* T3 cells, while molasses was a source of carbon, vitamins, and minerals. The influence of SBP in native form and after treatment with NaOH (SBP-NaOH) on dextransucrase production was investigated. The optimal substrate composition for maximum dextransucrase production was determined by varying the concentration of molasses, SBP-NaOH and sucrose. The maximum enzyme activity of 2,02 IU/ml was obtained on the medium composed of the following components: 2,5 % molasses, 2,5 % SBP-NaOH, and 4 % sucrose. The scanning electron microscope micrographs showed that immobilization of *Lc. mesenteroides* T3 cells had occurred on and within SBP-NaOH. The results showed that the production of dextransucrase on a substrate such as molasses can be improved by using alkali-treated sugar beet pulp as a carrier for bacterial cell immobilization.

One of the main topics of this study is the functionalization of commercial TiO<sub>2</sub> nano-powder (Degussa P25) in order to obtain high-capacity support for the immobilization of DS. Two different synthetic routes were used for the activation of TiO<sub>2</sub> support with different functional groups. The first, based on well-known silylation reaction with (3-glycidyloxypropyl) trimethoxysilane (GOPTMS), led to the development of epoxy-functionalized TiO<sub>2</sub> powders (TiO<sub>2</sub>/ GOPTMS). The second one, a novel synthetic route for surface modification of TiO<sub>2</sub> with amino and aldehyde groups was developed by taking advantage of charge transfer complex formation between surface Ti atoms and salicylate-type of ligands (5-aminosalicylic acid (5-ASA)), that first led to the production of amino-modified TiO<sub>2</sub> particles (TiO<sub>2</sub>/ 5-ASA). These particles (TiO<sub>2</sub>/ 5-ASA) were then treated with glutaraldehyde, resulting in the development of a novel carrier (TiO<sub>2</sub> / 5-ASA / GA) that has aldehyde groups on the surface which can easily form a covalent bond with the enzyme molecule.

The TiO<sub>2</sub> based hybrid supports with different functional groups: amino (TiO<sub>2</sub>/5-ASA), glutaraldehyde (TiO<sub>2</sub>/5-ASA/GA) and epoxy (TiO<sub>2</sub>/GOPTMS) were prepared and immobilization efficacy of partially purified dextransucrase on these supports was studied. The concentration of immobilized activity for the TiO<sub>2</sub>/5-ASA was 230 IU/g, for glutaraldehyde functionalized TiO<sub>2</sub> carrier was 235 IU/g, for the TiO<sub>2</sub> carrier with epoxy group it was 258 IU/g, while for the unmodified TiO<sub>2</sub> particles it was only 142 IU/g. The temperature stability of dextransucrase immobilized on TiO<sub>2</sub> carriers functionalized with glutaraldehyde and epoxy group at 40 °C was investigated, as well as the possibility of immobilized enzyme reuse in several consecutive cycles. After five consecutive cycles, dextransucrase immobilized on a glutaraldehyde-activated carrier (TiO<sub>2</sub>/5-ASA/GA) maintained almost 70 % of its initial expressed activity, while dextransucrase immobilized on the TiO<sub>2</sub>/GOPTMS carrier retained only 15 %.

For GLOS synthesis, dextransucrase was immobilized into an agar-agar matrix, while disaccharide maltose was used as the acceptor molecule. Based on the results of the immobilization yield, a final agar-agar matrix concentration of 2 % proved to be the best for further work. The examination of mechanical properties, such as tensile strength, Young's modulus of elasticity and elongation at break, determined that 9:1 is the best ratio in which matrix (agar) and enzyme needed to be mixed up for immobilization. When the ratio of maltose to sucrose concentrations in the reaction mixture was 6:1, only one product, that is trisaccharide (panose), was formed. Immobilized dextransucrase showed considerable operational stability and retained approximately 50 % of the initial enzyme activity after five consecutive application cycles.

**Keywords:** *Leuconostoc mesenteroides* T3, dextransucrase, production of enzymes, the immobilization of enzymes, the immobilization of cells, agro-industrial waste

**Scientific area:** Technological engineering

**Scientific discipline:** Biochemical Engineering and Biotechnology



# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DEO</b> .....	<b>3</b>
2.1. GLUKANSAHARAZE: DEKSTRANSAHARAZA.....	3
2.1.1. Tipovi reakcije katalizovane glukansaharazom.....	4
2.1.1.1. Mehanizam sinteze glukana.....	5
2.1.1.2. Akceptorska reakcija (reakcija sinteze oligosaharida) .....	7
2.1.1.2.1. Mehanizam akceptorske reakcije.....	7
2.2.2. Produkcija dekstransaharaze .....	8
2.2.2.1. Uticaj faktora sredine na produkciju dekstransaharaze .....	8
2.2.2.2. Optimizacija sastava hranljive podloge .....	9
2.2.2.3. Prečišćavanje dekstransaharaze.....	9
2.2.2.4. Merenje aktivnosti dekstransaharaze .....	10
2.3. UGLJENI HIDRATI KOJE SINTETIŠE DEKSTRANSAHARAZA.....	11
2.3.1. Dekstran .....	11
2.3.1.1. Struktura molekula dekstrana .....	12
2.3.1.2. Upotreba dekstrana .....	12
2.3.2. Oligosaharidi.....	13
2.3.1.1. Glukooligosaharidi (GLOS).....	13
2.3.1.2. Funkcionalni oligosaharidi koje sintetiše dekstransaharaza .....	14
2.4. POVEĆANJE EFIKASNOSTI PROCESA FERMENTACIJE – IMOBILIZACIJA ĆELIJA.....	14
2.5. UPOTREBA AGRO-INDUSTRIJSKOG OTPADA KAO NOSAČA ZA IMOBILIZACIJU ĆELIJA.....	15
2.5.1. Tipovi agro-industrijskog otpada.....	16
2.5.2. Među- i nusproizvodi šećerne repe .....	16
2.5.2.1. Izluženi repin rezanac.....	16
2.5.2.2. Melasa.....	16
2.6. IMOBILIZACIJA DEKSTRANSAHARAZE.....	17
2.6.1. Kovalentna imobilizacija .....	18
2.6.2. Imobilizacija adsorpcijom.....	19
2.6.3. Obuhvatanje enzima nosačem .....	20
2.6.4. Nove metode za imobilizaciju dekstransaharaze .....	22
2.6.5. Imobilizacija na nanonosače .....	22
<b>CILJ RADA</b> .....	<b>24</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DEO</b> .....	<b>25</b>
3.1. MATERIJALI .....	25
3.2. METODE.....	26
3.2.1. Izolovanje sirovog enzima iz fermentacione podloge.....	26
3.2.2. Određivanje aktivnosti dekstransaharaze.....	27

3.2.3. <i>Određivanje koncentracije proteina metodom po Loriju</i> .....	28
3.2.4. <i>Određivanje koncentracije šećera</i> .....	29
3.2.5. <i>Proizvodnja dekstransharaze</i> .....	30
3.2.5.1. <i>Proizvodnja dekstransaharaze u komercijalnim podlogama</i> .....	30
3.2.5.3. <i>Proizvodnja dekstransharaze na otpadnom supstratu</i> .....	31
3.2.6. <i>Skenirajuća elektronska mikroskopija</i> .....	31
3.2.7. <i>Prečišćavanje enzima dekstransaharaze</i> .....	31
3.2.7.1. <i>Određivanje molarne mase enzima i zimogramska analiza dekstransaharazne aktivnosti</i> .....	32
3.2.8. <i>Karakterizacija dekstransaharaze</i> .....	32
3.2.8.1. <i>Određivanje temperaturnog optimuma i temperaturne stabilnosti dobijenog enzima</i> .....	32
3.2.8.2. <i>Određivanje pH optimuma i pH stabilnosti dobijenog enzima</i> .....	32
3.2.8.3. <i>Ispitivanje aktivnosti enzima u prisustvu jona metala</i> .....	33
3.2.9. <i>FTIR analiza molekula dekstrana</i> .....	33
3.2.10. <i>Modifikacija nanočestica titandioksida</i> .....	33
3.2.10.1. <i>Modifikacija GOPTMS-om (TiO<sub>2</sub>/GOPTMS)</i> .....	33
3.2.10.1.1. <i>Određivanje koncentracije epoksi grupa na površini modifikovanih nanočestica TiO<sub>2</sub></i> .....	33
3.2.10.2. <i>Modifikacija 5-amino salicilnom kiselinom (5-ASA) (TiO<sub>2</sub>/5-ASA)</i> .....	34
3.2.10.2.1. <i>Modifikacija TiO<sub>2</sub>/5-ASA nanočestica glutaraldehidom</i> .....	34
3.2.11. <i>Karakterizacija modifikovanih nanočestica TiO<sub>2</sub></i> .....	34
3.2.11.1. <i>Numerički proračun</i> .....	34
3.2.12. <i>Imobilizacija enzima</i> .....	35
3.2.12.1. <i>Imobilizacija dekstransaharaze na nanočestice TiO<sub>2</sub></i> .....	35
3.2.12.2. <i>Imobilizacija dekstransaharaze zarobljavanjem u agarne filmove</i> .....	35
3.2.13. <i>Određivanje aktivnosti imobilisanih enzima</i> .....	36
3.2.14. <i>Određivanje termostabilnosti imobilisanih enzima</i> .....	36
3.2.15. <i>Određivanje operativne stabilnosti imobilisanih enzima</i> .....	36
3.2.16. <i>Sinteza oligosaharida pomoću imobilisane dekstransaharaze</i> .....	37
3.2.17. <i>HPLC analiza</i> .....	37

#### **4. REZULTATI I DISKUSIJA..... 38**

4.1. <i>PROIZVODNJA DEKSTRANSAHARAZE U KOMERCIJALNOJ PODLOZI</i> .....	38
4.1.1. <i>Optimizacija uslova gajenja</i> .....	38
4.1.2. <i>Optimizacija sastava podloge</i> .....	39
4.1.2.1. <i>Uticaj koncentracije saharoze na produkovanu aktivnost dekstransaharaze</i> .....	39
4.1.2.2. <i>Uticaj izvora azota na produkovanu aktivnost dekstransaharaze</i> .....	40
4.1.3. <i>Prečišćavanje dekstransaharaze polietilen glikolom (PEG) i određivanje molekulske mase enzima</i> .....	42
4.2. <i>KARAKTERIZACIJA DEKSTRANSAHARAZE</i> .....	43
4.2.1. <i>Određivanje optimalne temperature i optimalnog pH dekstransaharaza</i> .....	43
4.2.2. <i>Određivanje temperaturne i pH stabilnosti</i> .....	44
4.2.3. <i>Stabilnost dekstransaharaze iz <i>Lc. mesenteroides</i> T3 u prisustvu različitih jona</i> .....	44

4.3. KARAKTERIZACIJA PROIZVODA DEKSTRANSAHARAZE.....	46
4.3.1. FTIR analiza molekula polisaharida.....	46
4.4. FERMENTACIJA I PROIZVODNJA DEKSTRANSAHARAZE NA OTPADNOM SUPSTRATU .....	46
4.4.1. Uticaj koncentracije izluženog repinog rezanca kao nosača za imobilizaciju ćelija <i>Lc. mesenteroides T3</i> .....	47
4.4.2. Efekat koncentracije saharoze.....	50
4.4.3. Imobilizacija ćelija soja <i>Lc. mesenteroides T3</i> na izluženom repinom rezancu u cilju višestruke upotrebe za kontinualnu proizvodnju dekstransaharaze.....	52
4.5. IMOBILIZACIJA DEKSTRANSAHARAZA .....	53
4.5.1. Imobilizacija dekstransaharaze na nanočestice $TiO_2$ .....	53
4.5.1.1. Funkcionalizacija nanočestica $TiO_2$ .....	53
4.5.1.2. Kinetika imobilizacije dekstransaharaze na nanočestice $TiO_2$ .....	57
4.5.1.2.1. Difuzija unutar pora čestica .....	59
4.5.1.3. Efikasnost imobilizacije enzimske aktivnosti dekstransaharaze na nanočestice $TiO_2$ .....	61
4.5.1.4. Uticaj hemijske modifikacije titandioksida na imobilizaciju enzimske aktivnosti.....	61
4.5.1.5. Desorpcija dekstransaharaza imobilisanih na $TiO_2/5-ASA/GA$ i $TiO_2/GOPTMS$ .....	63
4.5.1.6. Poređenje stabilnosti dekstransaharaza imobilisanih na funkcionalizovanim nanočesticama $TiO_2$ ( $TiO_2/5-ASA/GA$ i $TiO_2/GOPTMS$ ).....	64
4.5.1.7. Poređenje termičke stabilnosti kovalentno imobilisane dekstransaharaze na $TiO_2/5-ASA/GA$ i $TiO_2/GOPTMS$ nosače i slobodnog enzima .....	64
4.5.1.8. Poređenje operativne stabilnosti kovalentno imobilisane dekstransaharaze na $TiO_2/5-ASA/GA$ i $TiO_2/GOPTMS$ nosače.....	65
4.5.2. Zarobljavanje enzima unutar agar-agar matriksa.....	66
4.5.2.1. Koncentracija agar-agara.....	66
4.5.2.2. Morfologija agar-agar filmova.....	68
4.5.2.3. Enzimska sinteza gluko-oligosaharida.....	68
4.5.2.5. Selekcija imobilisanog preparata za sintezu gluko-oligosaharida.....	69
4.5.2.6. Uticaj odnosa koncentracija saharoze i maltoze na sintezu gluko-oligosaharida.....	70
4.5.2.7. Karakterizacija dekstransaharaze imobilisane u agar-agar matriks.....	72
4.5.2.7.1. Upotreba dekstransaharaze imobilisane u agar-agar matriks tokom više ponovljenih ciklusa ..	72
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>74</b>
<b>6. REFERENCE.....</b>	<b>76</b>

## 1. UVOD

Bakterije mlečne kiseline (BMK) privlače mnogo pažnje za primenu u različitim granama industrije zbog svog GRAS (Generally Recognised As Safe) statusa i QPS (Qualified Presumption of Safety), što su kategorije kojima se u Sjedinjenim Američkim državama i u zemljama Evropske Unije označavaju mikroorganizmi čija primena u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji ne izaziva zdravstveni rizik kod ljudi (Waldherr & Vogel, 2009). Egzopolisaharidi i oligosaharidi, koji mogu biti proizvedeni *in situ* od strane BMK, predstavljaju jako atraktivno rešenje u proizvodnji hrane koja je bez aditiva, a čija potražnja je sve veća. Kulture koje imaju sposobnost proizvodnje egzopolisaharida primenjuju se u fermentaciji mleka, povrća, voća, sira i drugih mlečnih proizvoda gde egzopolisaharidi ispoljavaju različite tehnološke prednosti, kao što su kontrola sinereze i poboljšanje reologije testa (Di Cagno et al., 2006; Katina et al., 2009; Schwab, Mastrangelo, Corsetti, & Gänzle, 2008). Pored velikog broja pozitivnih efekata na senzorne osobine namirnica, postoji sve veći broj dokaza o pozitivnom uticaju oligo i polisaharida iz BMK na zdravlje potrošača, pre svega kao prebiotika, za snižavanje holesterola, imunomodulatornu i antikancerogenu ulogu (Ryan, Ross, Fitzgerald, Caplice, & Stanton, 2015; Schwab et al., 2008).

Pored *in situ* proizvodnje egzopolisaharida, nezavisna proizvodnja ovih prirodnih polimera pomoću radnog mikroorganizma (BMK) ili enzima nalazi takođe široku industrijsku primenu.

Enzim dekstransaharaze može biti poreklom iz različitih vrsta BMK među kojima su najpoznatiji rodovi *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* i *Weissella* (Zannini, Waters, Coffey, & Arendt, 2016). Glukansaharaze imaju industrijsku značaj zbog proizvodnje dekstrana i oligosaharida a biološku važnost zbog njihove uloge u procesu stvaranja karijesa (Vincent, Willemot, & Monsan, 1999).

Još od II svetskog rata kada se koristio kao zamena za krvnu plazmu, dekstran doživljava svoju ekspanziju u različitim granama industrije, a samim tim i enzim dekstransaharaze. U hemijskoj industriji, umreženi dekstrani koriste se kao standardni nosači za hromatografiju. U prehrambenoj industriji proizvodi na bazi dekstrana koriste se kao emulgatori, stabilizatori i za druge slične namene. Novo polje primene dekstrana je i u nanotehnologiji, za sintezu nanočestica koje mogu dalje imati široku primenu (Davidović, Miljković, Lazić, et al., 2015).

Proizvodnja dekstrana na svetskom nivou još uvek se odvija šaržno, gajenjem bakterija na hranljivoj podlozi i taloženjem sintetisanog dekstrana nakon završene fermentacije (Fraga Vidal et al., 2011). Iako je sinteza glukana na ovaj način i dalje najjeftiniji vid proizvodnje, on omogućava vrlo malo kontrole nad reakcionim uslovima, osim što se može uticati na sastav podloge i na početnu koncentraciju saharoze. Nedostatak ovog načina proizvodnje je i činjenica da se tokom fermentacije dobar deo supstrata (saharoze) troši i za rast bakterije. Dekstran dobijen ovakvim postupkom sadrži velike količine proteina, koji su ostatak bakterijske biomase kao i proizvode oslobođene nakon liziranja ćelija, koje je neophodno ukloniti. Prevazilaženje ovih problema je moguće primenom enzima, dekstransaharaze. Na taj način moguće je pre svega postići strožu kontrolu uslova kao što su pH, temperatura kao i odnosa enzima i supstrata a takođe bi se izbegla i kontaminacija proizvoda proteinima, tačnije dobijeni polimer (dekstran) bio bi većeg stepena čistoće.

Pored pozitivnih stvari koje bi enzimski postupak doneo, loše strane su cena enzima i njegov nepovratan gubitak tokom procesa fermentacije, koji bi stalno iziskivao njegovu ponovnu sintezu. Da bi uopšte mogli da govorimo o enzimskom postupku kao mogućoj opciji za proizvodnju dekstrana, potrebno je imobilisati dekstransaharazu. Na ovaj način imobilisani enzimski preparat mogao bi da se koristi više puta i ne bi bilo potrebe stalno ponavljati postupak za dobijanje enzima. Enzim bi svu saharozu direktno prevodio u dekstran/glukooligosaharid (GLOS) i fruktozu bez gubitaka. Proizvodnja dekstrana ovim postupkom ne bi zahtevala ni izbliza sterilne uslove kao prilikom bakterijske fermentacije. Posle završene

reakcije katalize imobilisani enzim bi se primenom metoda kao što u dekatovanje, filtracija ili centrifugiranje mogao lako izdvojiti iz reakcione smeše. Sa ovakvim imobilisanim enzimom ne bi bilo teško izvoditi ni kontinualni proces, što bi omogućilo i smanjenje troškova proizvodnje.

Sa tim u vezi, u ovoj doktorskoj disertaciji je ispitan potencijal proizvodnje dekstransaharaze iz soja *Leuconostoc mesenteroides* T3 izolovanog iz zrna vodenog kefira, na katedri za Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju, Tehnološko-metalurškog fakulteta. Po izolaciji i karakterizaciji proizvodnog organizma (Davidović, Miljković, Antonović, et al., 2015), ispitani su različiti uslovi gajenja proizvodnog mikroorganizma i pronađen je optimalni sastav hranjive podloge za maksimalnu proizvodnju dekstransaharaze. U ovu svrhu je korišćena metoda optimizacije u kojoj se tokom vremena varira samo jedan faktor dok se vrednosti ostalih drže konstantnim (one factor at the time approach). Kao metoda prečišćavanja korišćeno je prečišćavanje taloženjem polietilen glikolom, uz dodatno puferisanje podloge  $K_2HPO_4$ . Dobijena dekstransaharaza, je detaljno okarakterisana, imobilisana na različite nosače i primenjena za sintezu dekstrana i oligosaharida.

Proizvodnja enzima na komercijalnim podlogama je skup proces, a cenu diktiraju komponente podloge. U ovoj disertaciji je ispitana i upotreba sporednih proizvoda industrije šećera, koji predstavljaju pre svega jeftine a potom i ekološki prihvatljive supstrate za proizvodnju dekstransaharaze. Takođe jedan od korišćenih sporednih proizvoda, izluženi repin rezanac, je iskorišćen i kao nosač za imobilizaciju bakterijskih ćelija.

U poslednjoj fazi ove disertacije je ispitana mogućnost imobilizacije dekstransaharaze, na nemodifikovanim i modifikovanim nanočesticama  $TiO_2$  i unutar agar-agar matriksa, primenom različitih tehnika imobilizacije. U početnim fazama ovog dela disertacije biće primenjena modifikacija nanočestica  $TiO_2$ , korišćenjem dva sintetska puta, radi primene različito modifikovanih nanočestica  $TiO_2$  kao nosača za imobilizaciju dekstransaharaze adsorpcijom ili kovalentnom imobilizacijom. Ipak, derivati kod kojih je moguća imobilizacija enzima samo adsorpcijom, dodatno su modifikovani sa idejom da se dobiju imobilisani enzimski preparati povećane stabilnosti, a to je najčešće slučaj kod kovalentno imobilisanih enzima u odnosu na enzime vezane adsorpcijom. Imobilisanim preparatima, ispitana je temperaturna stabilnost kao i mogućnost ponovne upotrebe u više uzastopnih ciklusa.

Enzimski preparat dobijen zarobljavanjem u agar-agar matriksu je dodatno ispitan i u reakciji sinteze oligosaharida. Različiti parametri, među kojima su koncentracija agara, odnos enzima i agar-agar matriksa i odnos supstrata i akceptora u reakcionoj smeši, su ispitani radi dobijanja optimalnih uslova za sintezu oligosaharida. Kao akceptor je korišćen disaharid maltoza, koji se prema literaturnim podacima pominje kao jak akceptor, čijim prisustvom u reakcionoj smeši mogu da nastanu maltooligosaharidi. U ovom delu doktorske disertacije posebna pažnja je usmerena na tumačenje dobijenih rezultata, imajući u vidu ova metoda imobilizacije može efikasno da se primeni i za druge glukansaharaze, među kojima se nalaze i one čiji oligosaharidi spadaju u prebiotike.

## 2. TEORIJSKI DEO

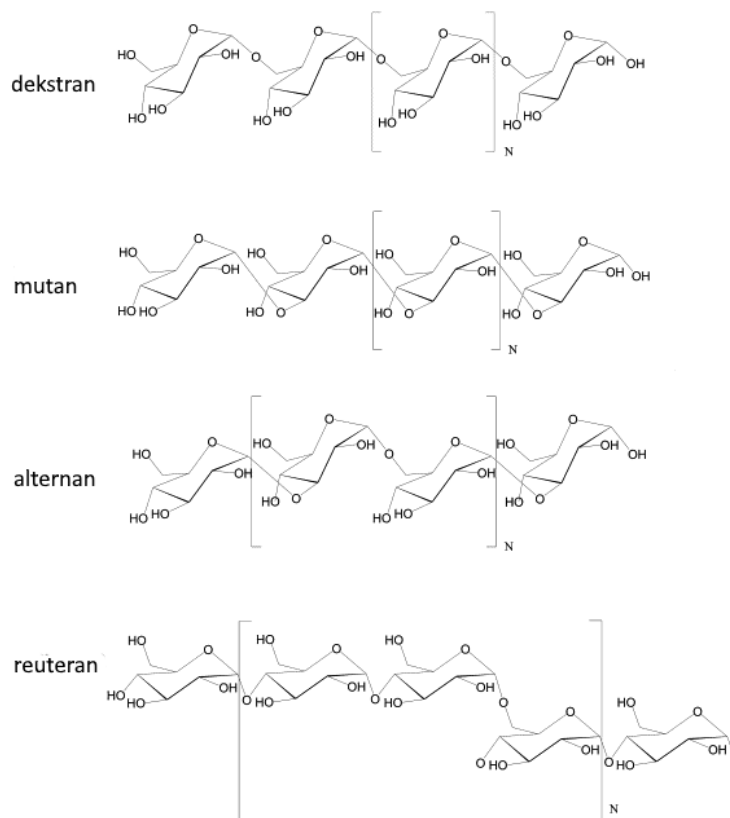
### 2.1. Glukansaharaze: dekstransaharaza

Zbog velikog interesovanja za polisaharide poreklom iz bakterija mlečne kiseline (BMK) za upotrebu u prehrambenoj i drugim granama industrije, njihov mehanizam sinteze je bio predmet brojnih studija, i tom prilikom je otkriven i okarakterisan veliki broj sintetskih enzima. Među njima, glukansaharaze su se istakle kao veoma korisne za sintezu velikog broja različitih ugljenih hidrata i glukokonjugata pre svega zahvaljujući svojoj visokoj regioselektivnosti prilikom glikozil transferaznih reakcija, postojanju velikog broja akceptorskih molekula i relativno jeftinom supstratu, saharozi (Seibel, Jördening, & Buchholz, 2010).

Glukansaharaze, takođe poznate i kao glukoziltransferaze (GTF) su ekstracelularni enzimi poreklom iz BMK koji sintetišu  $\alpha$ -glukane (Leemhuis et al., 2013). Iako su glukansaharaze transferaze prema svojoj aktivnosti, one su strukturno slične glikozid hidrolazama i klasifikuju se kao deo porodice glikozid hidrolaza 70 (GH70), koju čine uglavnom glukansaharaze (Leemhuis et al., 2013). Prema unosima u bazu podataka Ugljenohidratno-aktivni enzimi (Carbohydrate-Active Enzyme (CAZy) database) GH70 enzimi su gotovo isključivo nađeni u BMK i to pre svega u rodovima *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* i *Weissella* (Lombard, Golaconda Ramulu, Drula, Coutinho, & Henrissat, 2014).

Oni se prema vrsti  $\alpha$ -glukana koji sintetišu dele na dekstransaharaze (dekstran), mutansaharaze (mutan), alternansaharaze (alternan) i reuteransaharaze (reuteran). Ovi molekuli  $\alpha$ -glukana se razlikuju prema tipu veze koji povezuje glukozne jedinice (Slika 2.1.):

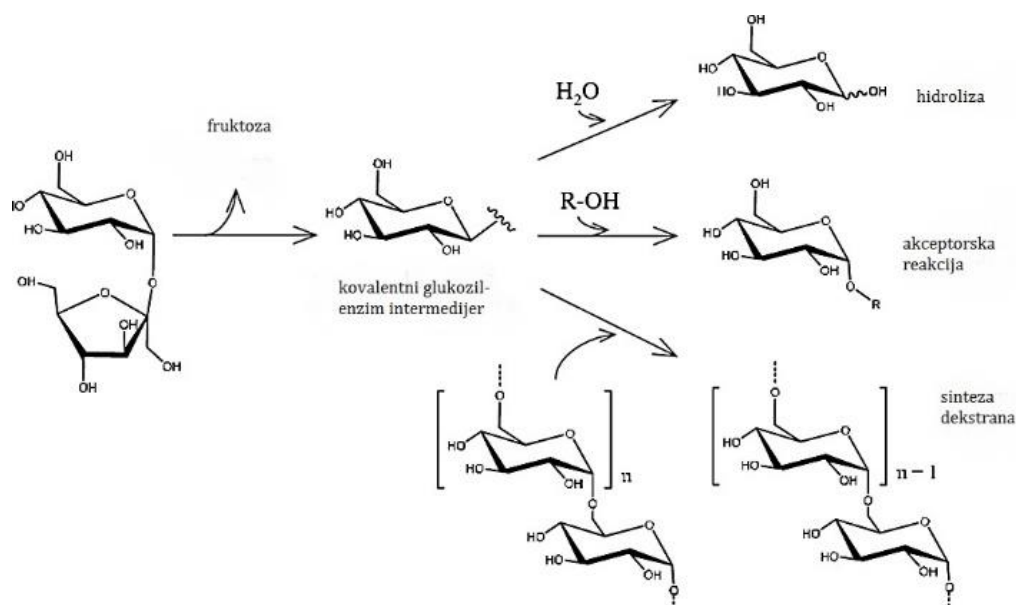
1. Dekstran, glavni lanac sastoji od molekula glukoze uzastopno povezanih  $\alpha$ -(1→6)-glikozidnim vezama, pri čemu je grananje prisutno u položajima 2, 3 i 4. Ova klasa je procentualno najzastupljenija (Brison et al., 2012; Vuillemin et al., 2016).
2. Mutan, molekuli glukoze u glavnom lancu su uzastopno povezani  $\alpha$ -(1→3)-glikozidnim vezama sa bočnim grananjem u položaju 6 (Mooser & Iwaoka, 1989).
3. Alternan, glavni lanac je izgrađen od molekula glukoze koji su naizmenično povezani  $\alpha$ -(1→3) i  $\alpha$ -(1→6)-glikozidnim vezama sa  $\alpha$ -(1→3) grananjem u bočnom lancu. Najmanji broj do sada okarakterisanih glukana pripada ovoj klasi (Argüello-Morales et al., 2000).
4. Reuteran, molekuli glukoze u glavnom lancu dominantno su povezani  $\alpha$ -(1→4) – glikozidnim vezama.



Slika 2.1. Osnovne strukture  $\alpha$ -glukana koje sintetišu glukansaharaze. (Preuzeto i modificirano iz (Leemhuis et al., 2013))

### 2.1.1. Tipovi reakcije katalizovane glukansaharazom

Katalitička aktivnost glukansaharaze je objašnjena kao dvostepeni proces, koji počinje tako što se razlaže veza između glukozidnog i fruktoznog prstena, u molekulu saharoze uz formiranje kovalentnog  $\beta$ -gluktozil enzim intermedijera i oslobađanja molekula fruktoze. U drugom koraku, glukozne jedinice se prenose na odgovarajući akceptor, zadržavajući  $\alpha$ -anomernu konfiguraciju (Leemhuis et al., 2013). Na osnovu vrste akceptorskog molekula mogu se razlikovati tri tipa reakcije koju katalizuje ovaj enzim (Slika 2.2.). Dominantna reakcija je reakcija polimerizacije/transglikozilacije u kojoj kao proizvod nastaje molekul glukana (dekstrana, mutana, alternana ili reuterana). Glukansaharaze mogu da koriste i sam molekul vode kao akceptor, pri čemu se odigrava samo reakcija hidrolize saharoze na glukozu i fruktozu. Treća vrsta je takozvana akceptorska reakcija, gde se u prisustvu pogodnih molekula male molekulske mase, na primer maltoze, preusmerava transfer glukozil jedinica sa sinteze  $\alpha$ -glukana na akceptorski molekul i sintezu oligosaharida (Slika 2.2.). Disaharidi i oligosaharidi se formiraju kada je kao akceptorski molekul prisutan neki ugljeni hidrat, dok se u prisustvu drugih akceptorskih molekula različitih od šećera formiraju glukokonjugati (Monsan, Remaud-Siméon, & André, 2010)



Slika 2.2. Vrste reakcija koje katalizuje dekstransaharaza (Preuzeto i modifikovano iz (Shi, 2016))

### 2.1.1.1. Sinteza glukana

Glukansaharaze su identifikovane pre više od 70 godina, međutim mehanizam delovanja ovih enzima još uvek nije potpuno razjašnjen. Sprovedene studije su omogućile da budu predložena dva opšta mehanizma, koji podrazumevaju postojanje ili jednog ili dva nukleofilna mesta. Razumevanje mehanizma delovanja ovih enzima dodatno komplikuje činjenica da se njihovom aktivnošću dobija veliki broj proizvoda (glukana) različitih struktura.

#### 2.1.1.1.1. Mehanizam sinteze glukana

Dva predložena mehanizma sinteze glukana (Vincent et al., 1999):

1) Elongacija neredukujućeg kraja (pretpostavlja postojanje jednog nukleofilnog mesta): Ovaj predloženi mehanizam sličan je mehanizmu delovanja glikozidaza. On podrazumeva postojanje ostatka asparaginske (ili glutaminske) kiseline koja se ponaša kao nukleofilna grupa i drugog aminokiselinskog ostatka koji predstavlja donor protona. Karboksilna grupa može da izvrši nukleofilni napad na C1 atom glukoznog dela saharoze, i na taj način formira glukozil-enzim kompleks. Drugi aminokiselinski ostatak (koji deluje kao donor protona) može da učestvuje u ubrzavanju otpuštanja fruktoze doniranjem protona atomu kiseonika uključenom u glikozidnu vezu. Na taj način omogućeno je drugom glikozil ostatku da bude aktiviran tako što primi atom vodonika iz hidroksilne grupe vezane za C6 atom (Slika 2.3.(A)).

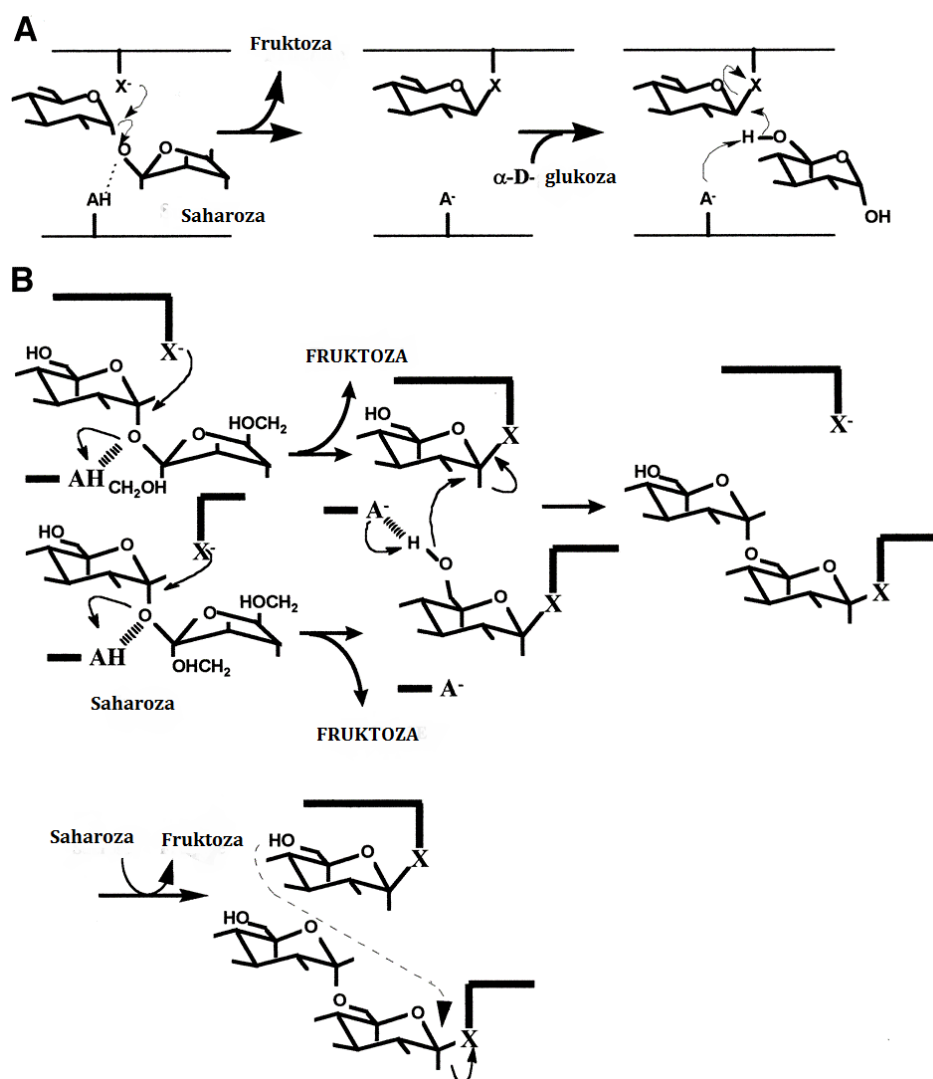
Ako se sinteza glukana odvija ovim mehanizmom, to znači da se elongacija odvija na neredukujućem kraju molekula glukana. Takođe, ovaj mehanizam predviđa postojanje samo jednog glikozil-enzim kompleksa. Od strane jedne grupe naučnika (Su & Robyt, 1994) ovaj mehanizam je osporavan pre svega zbog činjenice da je za njega potreban molekul prajmera/inicijalnog akceptora za inicijaciju sinteze glukana. Po njima saharoza ne bi mogla da učestvuje u inicijaciji sinteze lanca kao što je ranije predlagano od strane Nilija (Neely, 1961).

2) Elongacija redukujućeg kraja (pretpostavlja postojanje dva nukleofilna mesta): Ovaj mehanizam predložili su Ebert i Šenk (Ebert & Schenk, 1968) a potvrđen je 1974 (Robyt, Kimble, & Walseth, 1974) na slučaju dekstransaharaze poreklom iz soja *Lc. mesenteroides* NRRL B-512F, a slični rezultati dobijeni su sa glukoziltransferazama poreklom iz roda *Streptococcus* (Monsan et al., 2001). Ovaj mehanizam podrazumeva dva identična nukleofilna mesta koja



mogu da daju dva glukozil-enzim intermedijera iz dva molekula saharoze. Hidroksilna grupa na C6 sa jednog od ova dva glikozil ostatka nukleofilno napada C1 atom drugog glikozil ostatka (intermedijera) pri čemu se stvara  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) glikozidna veza između dva molekula glukoze. Oslobođeno nukleofilno mesto sada napada sledeći molekul glukoze da bi se stvorio novi glikozil-enzim intermedijer (Slika 2.3.(B)). Ovakvo simetrično ponašanje ovih nukleofilnih mesta kao rezultat ima elongaciju glukanskog lanca na njegovom redukujućem kraju, bez potrebe za molekulom prajmera na početku reakcije i bez odvajanja glukanskog polimera od enzima pre nego što se zakači molekul glukoze. Grananje glukanskog lanca može da se desi kada se ovaj lanac ponaša kao akceptor glukoznih jedinica (Robyt et al., 1974).

Zanimljiv aspekt ovog mehanizma je da on omogućava elongaciju molekula glukana na redukujućem kraju a da pri tome nije potrebno prisustvo molekula prajmera (eksternog/spoljnog glukana).



Slika 2.3. Predloženi mehanizam delovanja glukansaharaze. (A) Mehanizam koji podrazumeva samo jedno nukleofilno mesto (mehanizam elongacije neredukujućeg kraja). (B) Mehanizam koji podrazumeva dva nukleofilna mesta (mehanizam elongacije redukujućeg kraja). X, nukleofilna grupa; A, proton donorska grupa. (Preuzeto i modifikovano iz (Vincent et al., 1999))

I pored toga što je mehanizam po kome se sinteza molekula glukana odvija elongacijom na redukujućem kraju našao potvrdu u kinetičkim i drugim studijama velikog broja autora (Germaine & Schachtele, 1976; Kobs & Mayer, 1991; Su & Robyt, 1994), do danas je uspešno identifikovano samo jedno nukleofilno mesto (nađena je samo jedna asparaginska kiselina) za koje može da se kovalentno veže glukozil ostatak poreklom iz saharoze.

Tako da, uprkos intenzivnim istraživanjima koja su sprovedena zadnjih 25 godina, mehanizam sinteze glukana, nije potpuno razjašnjen.

### **2.1.1.2. Akceptorska reakcija (reakcija sinteze oligosaharida)**

Akceptorska reakcija je u literaturi prvi put opisana od strane Koepsela i saradnika (Koepsell et al., 1953). Oni su приметili da dodatak molekula kao što je maltoza, izomaltoza i O- $\alpha$ -metilglukozid u reakcionom medijumu, kada je u istom već prisutna saharoza, pomera reakciju sinteze glukana ka sintezi oligosaharida. Energija neophodna za odigravanje akceptorske reakcije nastaje hidrolizom saharoze.

Veliki broj šećera može da se ponaša kao akceptorski molekul za dekstransaharazu (Koepsell et al., 1953; Robyt & Eklund, 1983). Ovi različiti akseptori mogu da budu podeljeni u dve klase, na osnovu njihove sposobnosti za kompeticiju sa sintezom glukana i na osnovu njihovog efekta na brzinu reakcije: 1) jaki akseptori, kao što su maltoza i izomaltoza, koji imaju aktivacioni efekat na brzinu reakcije i jako inhibitorno dejstvo na prinos sinteze glukana (Robyt & Eklund, 1983); i 2) slabi akseptori, kao što su fruktoza i melibioza, koji imaju inhibicioni efekat na reakciju (Koepsell et al., 1953). Za slabe akseptore je karakterističan i nizak prinos oligosaharida.

Neki akseptori, kao disaharid maltoza ili oligosaharidi sa izomaltozil ostatkom na svom neredukujućem kraju, omogućavaju proizvodnju serije oligosaharida različitih dužina lanaca (Robyt & Walseth, 1978). Sinteza napreduje uzastopnim transferom glikozilnih jedinica na oligosaharide koji na smenu predstavljaju i proizvod i supstrat. Drugi akseptori, kao što je na primer fruktoza, dozvoljavaju jedino sintezu jednog disaharida (leukroza) u kome se glukozil ostatak koji potiče od hidrolize saharoze veže za molekul fruktoze. Reakcija sinteze leukroze postaje jako značajna na kraju sinteze bilo kog molekula glukana jer je tada prisutna velika koncentracija fruktoze koja se oslobađa iz molekula saharoze pod dejstvom dekstransaharaze.

#### 2.1.1.2.1. Mehanizam akceptorske reakcije

Na osnovu mehanizma za sintezu glukana predloženog od strane Robita i saradnika (Robyt et al., 1974), mehanizam sinteze oligosaharida, bi mogao da započne nukleofilnim napadom hidroksilne grupe locirane na neredukujućem kraju akceptora (C<sub>6</sub> - OH grupa, na primer maltoze) na C1 atom koji se nalazi na jednom od dva glukozil ostatka prisutnih u dva glikozil-enzim kompleksa. Isti autori su par godina kasnije, baveći se isključivo mehanizmom akceptorske reakcije, predložili da je neophodno postojanje samo jednog glukozil-enzim kompleksa i da su akceptorski molekuli inkorporirani na redukujući kraj sintetisanog molekula glukana ili oligosaharida (Robyt & Walseth, 1978). Po njima elongacija oligosaharida se verovatno dešava na redukujućem kraju. Takođe, za sada ne postoje direktni dokazi da postoji posebno mesto za vezivanje akceptora, već se pretpostavlja da jedno od dva mesta za vezivanje saharoze takođe može biti i mesto za vezivanje akceptora (Germaine & Schachtele, 1976; Kobayashi & Matsuda, 1978).

Aktivacioni efekat maltoze na brzinu reakcije može se objasniti promenom u limitirajućem koraku koji se dešava tokom akceptorske reakcije. U prisustvu maltoze, formiranje glukozil-enzim kompleksa postaje limitirajući faktor, jer je transfer na akceptor brz korak, što nije slučaj kod transfera glukozil ostatka na lanac polimera u reakciji sinteze glukana (Paul, Oriol, Auriol, & Monsan, 1986). Ovaj aktivirajući efekat može se pripisati konformacionoj promeni enzima do koje dolazi usled vezivanja maltoze (akceptora) za dekstransaharazu

(Mayer, et al., 1981). Razlog zbog čega slabi akceptorski molekuli kao što je fruktoza, inhibiraju reakciju ostaje nejasan. Jedna od hipoteza je da ovi akseptori inhibiraju hidrolizu molekula saharoze (Koepsell et al., 1953), a postoji hipoteza po kojoj fruktoza može da izazove sterne smetnje i na taj način spreči rast lanca molekula glukana. (Böker, Jördening, & Buchholz, 1994).

U akceptorskoj reakciji, koji tip veze će nastati u oligosaharidu zavisi isključivo od specifičnosti dekstransaharaze. Zahvaljujući visokoj efikasnosti, maltoza je najviše proučavan akceptor i na njenom primeru je pokazano da tip nastalog oligosaharida u akceptorskoj reakciji ima strukturu kao molekul dekstrana proizveden od strane mikroorganizma iz kog potiče dekstransaharaza (Côté & Leathers, 2005). Najbolji primer je dekstransaharaza koja dominantno sintetiše  $\alpha$ -(1→6) tip veze u molekulu dekstrana iz soja *Lc. mesenteroides* NRRL B-512F, koji je komercijalno najviše u upotrebi. Ova dekstransaharaza u prisustvu maltoze proizvodi homologne oligosaharide, pri čemu je inicijalni proizvod panoza ( $\alpha$ -D-Glcp-(1→6)- $\alpha$ -DGlcp-(1→4)-D-Glcp) (Robyt & Eklund, 1983). Za panozu se dalje, za -OH grupu na poziciji 6 neredukujućeg kraja molekula glukoze, u procesu elongacije, vezuju glikozil ostaci povezani  $\alpha$ -(1→6) glikozidnom vezom, pri čemu nastaju linearni oligosahridi slični izomaltooligosaharidima (IMO).

### 2.1.2. Proizvodnja dekstransaharaze

Na proizvodnju dekstransaharaze utiču različiti faktori kao što su temperatura gajenja, pH, aeracija i sastav podloge. Proizvodnja dekstransaharaze je detaljno proučavana i dobro dokumentovana u velikom broju radova (Cortezi, Monti, & Contiero, 2005; Goyal, Nigam, & Katiyar, 1995; Purama & Goyal, 2008d; Tsuchiya et al., 1952; Veljković, Lazić, Rutić, Jovanović, & Skala, 1992). U ovim istraživanjima korišćen je veliki broj različiti *Lc. mesenteroides* sojeva i metoda. Za optimizaciju uslova gajenja u cilju maksimalne proizvodnje dekstransaharaze, najviše su rađene metoda variranja pojedinačnih faktora i metoda odzivnih površina (Purama and Goyal 2008a).

Kod BMK, tačnije divljih sojeva *Leuconostoc* spp, ekspresija kodirajućeg gena za enzim, pa samim tim i proizvodnja dekstransaharaze indukovana je saharozom. Za razliku od njih ekspresija gena za ovaj enzim kod *Streptococcus* spp i nekih *Lactobacillus* sojeva je konstitutivna (Bounaix et al., 2010; Naessens et al., 2005). Konstitutivna ekspresija kodirajućeg gena za dekstransaharazu je posledica adaptacije na određene ekosisteme u kojima su pronađene ove bakterije, kao što je na primer usna duplja, u kojoj je koncentracija saharoze dosta promenljiva (Leemhuis et al., 2013).

#### 2.1.2.1. Uticaj faktora sredine na proizvodnju dekstransaharaze

Za proizvodnju dekstransaharaze na industrijskom nivou koriste se samo *Lc. mesenteroides* sojevi tako da su i optimalni uslovi za proizvodnju glukansaharaza najviše ispitivani na dekstransaharazama poreklom iz ovih sojeva. Od faktora sredine koji utiču na proizvodnju enzima proučavani su temperatura, pH i uticaj aeracije, dok je vezano za sastav podloge najviše pažnje posvećeno izvoru ugljenika, tj saharozi.

Sprovedene su brojne studije o optimalnoj temperaturi proizvodnje dekstransaharaze iz različitih sojeva. Za soj *Lc. mesenteroides* utvrđeno je da može da raste u opsegu temperature od 5 do 30 °C ali da mu je optimalna temperatura, od 25 do 30 °C (M. Santos, Teixeira, & Rodrigues, 2000). Sa druge strane, optimalna temperatura za proizvodnju dekstransaharaze kreće se u opsegu od 23 do 25 °C (Goyal et al., 1995; Lopretti & Martinez, 2002) iako je optimum za proizvodnju dekstrana i fruktoze od 25 do 45 °C, pri čemu se maksimalna aktivnost dostiže na 30 °C.

Početna pH vrednost u podlozi za gajenje BMK je u opsegu od 6,9 do 7,2. Tokom rasta, bakterijske ćelije izlučuju enzim u medijum i kad pH vrednost počne da opada aktivnost enzima počinje da raste i povećava se brzina konverzije saharoze u dekstran i fruktozu (Tsuchiya et al.,

1952; Veljković et al., 1992). Na osnovu svih eksperimenata nađeno je da je optimalni opseg pH, za rast ćelija od 6,0 do 6,9 (tačnije 6,7), tako da se najveća količina enzima očekuje baš u ovom opsegu pH (Tsuchiya et al., 1952). Najveći prinos dekstrana, to jest najveća aktivnost dekstransaharaze, kreće se na pH od 5,0 do 5,4. Sa stanovišta proizvodnja dekstransaharaze, veoma je važno pH vrednost održati što duže iznad 5,5 ili još bolje iznad 6,0 da ne bi došlo do masovne proizvodnje dekstrana koji otežava izolovanje a i određivanje aktivnosti enzima.

Kako je dokazano da je biosinteza dekstransaharaze povezana sa rastom bakterijskih ćelija (Tong, 1973), očekivano je da će na njenu biosintezu imati uticaj brzina prenosa mase kiseonika. Kada je ispitivan uticaj aeracije na proizvodnju dekstransaharaze iz soja *Lc. mesenteroides* NRRL B 512 F, veliki broj autora dobio je da gajenje ove bakterije u uslovima mešanja pozitivno uticalo na proizvodnju enzima, što je u skladu i sa mikroaerofilnom prirodom ovog mikroorganizma (Johnson & McCleskey, 1957; Lucey & Condon, 1986; Plihon, Taillandier, & Strehaiano, 1995). Ipak, bilo je i onih koji su bolje rezultate dobili kada su isti soj gajili pri statičnim uslovima (Goyal et al., 1995). Sa druge strane, Barker i Ajongven (Barker & Ajongwen, 1991) pokazali su da je tip kvašćevog ekstrakta, tačnije izvora azota, mogo značajniji faktor kada je u pitanju proizvodnja dekstransaharaze.

### **2.1.2.2. Optimizacija sastava hranljive podloge**

Pored toga što ima ulogu supstrata za bakterijski rast, saharoza indukuje proizvodnju ekstracelularne dekstransaharaze, a istovremeno predstavlja i supstrat za sam enzim. Svi *Lc. mesenteroides* sojevi kao jedini izvor ugljenih hidrata za proizvodnju dekstransaharaze koriste saharozu. Drugi ugljeni hidrati, kao što su glukoza, fruktoza, manoza i laktoza mogu da utiču na rast mikroorganizama dok uopšte ne indukuju proizvodnju dekstransaharaze. Kuirasko i saradnicima su gajenjem na podlozi koja je sadržala samo D-glukozu i D-fruktozu dobili značajno niži prinos dekstransaharaze (Quirasco, López-Munguía, Remaud-Simeon, Monsan, & Farrés, 1999). Ipak, postoje određeni mutantski sojevi koji mogu da proizvode enzim iako se u podlozi kao izvor ugljenika nalazi samo glukoza (D. Kim & Robyt, 1994). Kada se u podlogama koriste velike količine saharoze za proizvodnju dekstrana, povećana viskoznost medijuma utiče na rast ćelija, što za posledicu ima i otežanu produkciju i izolaciju enzima kao i otežanu separaciju bakterijskih ćelija (Goyal & Katiyar, 1997; Tsuchiya et al., 1952). Brojni autori, koji su se bavili ovim problemom, došli su do zaključka da niže koncentracije saharoze otklanjaju ove poteškoće bez negativnih uticaja na prinos dekstransaharaze.

Takođe, ovi problemi mogu biti prevaziđeni i dodatkom veće količine  $K_2HPO_4$  u fermentacioni medijum. Standardne podloge za proizvodnju dekstransaharaze sadrže 0,1 M  $K_2HPO_4$ . U istraživanju u kome je ispitivan uticaj ove puferske supstance na proizvodnju enzima, nivo  $K_2HPO_4$  u podlozi za proizvodnju dekstransaharaze povećan je na 0,3 M a kao rezultat dobijeno je i povećanje bakterijske biomase i enzimske aktivnosti (S. Rodrigues, Lona, & Franco, 2003). Upotreba ovakve podloge, obogaćene fosfatima, omogućava mnogo bolju kontrolu pH a samim tim i manju količinu dekstrana i veći prinos enzima. Sve ovo dešava se zahvaljujući tome što se u ovakvim uslovima, pH podloge održava oko 6,0 tokom većeg dela ćelijskog rasta. Kao što je već spomenuto, kontrola pH vrednosti podloge je jako važna zbog činjenice da je proizvodnja enzima optimalna kada je pH 6,0 a sinteza dekstrana kada je pH 5,0. Manja količina dekstrana dobijena gajenjem bakterije u ovakvom medijumu omogućava lakše izolovanje i prečišćavanje enzima.

### **2.1.2.3. Prečišćavanje dekstransaharaze**

Za prečišćavanje native dekstransaharaze iz BMK koristi se veliki broj različitih metoda od kojih su najviše zastupljene: taloženje solima i alkoholom, frakciono taloženje polietilen glikolom (PEG), ultrafiltracija i hromatografija (Naessens et al., 2005; Purama and Goyal 2008b).

Taloženje PEG-om je najčešće primenjivana metoda. PEG je poznato sredstvo za selektivno taloženje proteina velike molekulske mase ili onih koji postoje u formi agregata. Kako je dekstransaharaza protein velike molekulske mase (64-245 kDa) a ima tendenciju spajanja sa polimerom dekstrana i formiranja agregata, pogodna je za izdvajanje pomoću nejonskog hidrofilnog polimera PEG u cilju prečišćavanja. Činjenica da se nakon taloženja lako uklanja postupkom dijalize predstavlja još jednu pozitivnu osobinu ovog hidrofilnog polimera (Funane et al., 1995). Prečišćavanje PEG-om omogućava razdvajanje dekstransaharaze od drugih enzima koji mogu biti prisutni u fermentacionom medijumu, kao na primer levansaharaze, ali ne i od dekstrana koji u nižem ili višem procentu ostaje vezan za enzim (Majumder et al., 2007).

Ovim načinom taloženja i prečišćavanja bavilo se više grupa naučnika, pri čemu su u svojim eksperimentima uglavnom poredili efikasnost prečišćavanja polietilen glikola različitih molekulskih masa. Princip taloženja je isti bez obzira na masu korišćenog PEG-a. Supernatant dobijen nakon centrifugiranja bakterijske kulture, taloži se na hladno, rastvorima PEG-a različitih zapremina (ako je u pitanju PEG manje molekulske masa najčešće se primenjuje odnos 3:1, supernatant: PEG, dok ako se koriste oni veće molekulske mase odnos je 9:1), a da bi dekstransaharaza precipitirala, rastvor se ostavi 12 h na 4 °C. Nakon toga sledi centrifugiranje i rastvaranje taloga u odgovarjućoj zapremini acetatnog pufera. Poslednji korak u prečišćavanju dekstransaharaze ovom metodom je dijaliza, koja se vrši u cilju uklanjanja PEG-a (Goyal & Katiyar, 1994; Purama & Goyal, 2008b). U jednom koraku prečišćavanja polietilen glikolom (PEG 1500), polazeći iz supernatanta, može se dobiti 20 puta koncentrovaniji i 40 puta prečišćeniji enzimski preparat posle samo jednog koraka prečišćavanja (Purama & Goyal, 2008c).

Hromatografsko prečišćavanje dekstransaharaze primenjuje se za dobijanje enzima koji je skoro potpuno oslobođen od molekula polisaharida (dekstrana). Različiti matriksi su upotrebljavani u ovu svrhu. Dekstransaharaza je prečišćavana na hromatografskim kolonama koje su bile punjene hidroksiapatitom, DEAE-celulozom, DEAE-sephadex koloni, sephadex, Sephacryl S-200HR i ultrogel Aca 34 koloni. Za dekstransaharazu mogu biti vezani molekuli dekstrana različite molekulske mase, što predstavlja glavni razlog za korišćenje Sephadex gela, koji ima veliki afinitet ka dekstranu. Ovaj matriks/gel deluje kao afinitetni material za prečišćavanje enzima iz *Leuconostoc* i *Streptococcus* vrsta (Majumder, Purama, & Goyal, 2007). Dekstransaharaza je sa Sephadex kolona eluirana ureom, guanidine HCL-om (A. W. Miller, Eklund, & Robyt, 1986) ili natrijum dodecil sulfatom (Kobs, Husman, Cawthorn, & Mayer, 1990). Ovaj korak pratila je intenzivna dijaliza da bi se uklonile dodate hemikalije. Sephacryl S-200HR kolona često se koristi za gel-filtraciono prečišćavanje dekstransaharaze nakon precipitacije i prečišćavanja PEG (Goyal & Purama, 2009).

Dekstranaze (EC 3.2.1.11) su enzimi koji raskidaju glikozidne veze u molekulu dekstrana. Ovi enzimi su specifični i prema tipu veze koji raskidaju i prema mikroorganizmu iz koga su izolovani. Uglavnom se dobijaju iz plesni. Hidroliza dekstrana čini prečišćavanje dekstransaharaze mnogo lakšim jer na taj način fermentacioni medijum postaje manje viskozno i olakšava se razdvajanje različitih formi enzima. Najveća mana ovakvog načina prečišćavanja su dodatni koraci koji su potrebni da bi se dekstransaharaza i dekstranaza razdvojile, i u tu svrhu se najčešće koriste hromatografske metode, pre svih jonoizmenjivačka ili afinitetna hromatografija (De Segura et al., 2004; A. W. Miller et al., 1986). Veliki broj autora ovaj način prečišćavanja dekstransaharaze koristio je pre kovalentne imobilizacije, sa namerom da se ukloni što veća količina dekstrana i na taj način demaskiraju potencijalno reaktivne grupe na molekulu enzima (Alcalde et al., 1999; De Segura et al., 2004).

#### **2.1.2.4. Merenje aktivnosti dekstransaharaze**

Za merenje dekstransaharazne aktivnosti koristi se nekoliko različitih metoda (Vettori, Mukerjee, & Robyt, 2011). Sve one mogu biti podeljene u dve grupe. Jednu grupu čine metode

koje se zasnivaju na merenju količine oslobođene fruktoze, i na taj način posredno određivanje količine utrošene saharoze (primenjuje se i kod hidrolitičkih i kod transferaznih reakcija). Hidrolitička aktivnost dekstransaharaze, koja je obično niska, može se kvantifikovati i merenjem oslobođene glukoze. Metode koji se zasnivaju na merenju povećanja redukcionne moći u reakcionoj smeši (koja je rezultat oslobađanja fruktoze tokom sinteze dekstrana) se najčešće koriste za određivanje aktivnosti dekstransaharaze. Mana, to jest, ometajući faktor kod ovih metoda je što dekstran koji nastaje kao proizvod, kao i male količine sporednih proizvoda kao na primer leukroza ( $\alpha$ -D-Glcp-(1→5)-D-Frup, proizvod akceptorske reakcije sa fruktozom), glukoza i fruktoza nastala prilikom hidrolize takođe dovode do povećanja vrednosti redukcionne moći. Najpoznatije metode kojom se meri redukcionna moć i određuje dekstransaharazna aktivnost su metoda sa 3,5- dinitrosalicilnom kiselinom (DNS metoda) (G. L. Miller, 1959) i Nelson-Somodi metoda (Nelson-Somogyi method). Drugu grupu metoda čine metode koje se zasnivaju na kvantifikaciji proizvoda, dekstrana, tačnije na određivanju njegove molekulske mase. Postoje naučni radovi u kojima se koristi metoda sa radioaktivno obeleženom saharozom ( $^{14}\text{C}$ ) (Côté & Skory, 2012; Vettori et al., 2011) i ona se zasniva na merenju glukoze koja je radioaktivno obežena, a koja je bila deo saharoze, a koja se inkorporiše u rastući molekul dekstrana. Druga grupa metoda omogućava mnogo preciznija merenja i daje tačnije vrednosti aktivnosti dekstransaharaze (Germaine, Chludzinski, & Schachtele, 1974; Vettori, Blanco, Cortezi, Lima, & Contiero, 2012)

## 2.2. Ugljeni hidrati koje sintetiše dekstransaharaza

### 2.2.1. Dekstran

Luj Paster je 1861. godine objavio postojanje polisaharida sintetisanog iz saharoze. Hemijsku formulu ovog polisaharida  $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_6)_n$  i naziv 'dekstran' je prvi upotrebio Šajbler (Scheibler, 1874). Međutim, sintezu dekstrana pomoću dekstran sintetišućeg enzima, poreklom iz kulture *Lc. mesenteroides* gajene na saharoznom medijumu, prvi pominje Hehre (E. J. Hehre, 1941). Par godina kasnije ovaj ekstracelularni enzim dobija ime, dekstransaharaza odnosno, glukansaharaza (Hestrin, Avineri-Shapiro, & Aschner, 1943). Danas se molekul dekstrana definiše kao homopolisaharid glukoze, sa dominantnom  $\alpha$ -(1→6)-glikozidnom vezom.

Većina dekstrana sintetisanih prirodnim putem su derivati enzimske konverzije saharoze uz pomoć dekstransaharaze, koju dominantno produkuju rodovi *Leuconostoc*, *Streptococcus* i *Lactobacillus* (Zannini et al., 2016). Za komercijalnu proizvodnju molekula dekstrana najviše se koristi soj *Lc. mesenteroides* NRRL B-512F i njegova dekstransaharaza (Dols, Remaud-Simeon, & Monsan, 1997). Ovaj soj proizvodi velike količine dekstransaharaze, sa minimalnim učešćem drugih kontaminirajućih enzima kao što su na primer invertaza ili levansaharaza, i sintetiše dekstranski molekul koji je rastvorljiv u vodi i koji je velike molekulske mase.

Karakterizacija molekula dekstrana nije sprovedena odmah po njegovom otkriću, već kasnije, što je zadavalo dosta problema pri njegovoj primeni. I pored toga što se znalo da su to homologni polimerni lanci glukoze sa dominantnim  $\alpha$ -(1→6)-vezama, molekuli dekstrana razlikovali su se prema rastvorljivosti, viskoznosti, specifičnom uglu rotacije, sadržaju azota, fosfora i pepela. Godine 1954, izvršena je prva fizičko-hemijska karakterizacija i klasifikacija dekstrana koji su proizvedeni pomoću 96 bakterijskih sojeva, gde je utvrđeno da se njihove fizičke karakteristike veoma razlikuju (Jeanes et al., 1954). Karakterizacija ovih polisaharida izvršena je na osnovu sledećih parametara: optičke rotacije, viskoznosti, profila perjodatne oksidacije i fizičkog izgleda nakon precipitacije etanolom (Jeanes et al., 1954). Današnja karakterizacija dekstrana, obuhvata i specifičnu enzimsku hidrolizu, koju prati identifikacija oligosaharida koja se izvodi hromatografijom u tankom sloju, HPLC ili  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopijom (Naessens et al., 2005).

### 2.2.1.1. Struktura molekula dekstrana

Dekstran je ekstracelularni bakterijski homopolisaharid (Monsan et al., 2001; Sidebotham, 1974) velike molekulske mase koja se kreće od 0.5 do  $6 \cdot 10^6$  kDa (Buchholz & Monsan, 2003). Izgrađen je od molekula D-glukoze koji su dominantno vezani  $\alpha$ -(1→6)-glikozidnom (glukopiranozidnom) vezom. Različiti tipovi dekstrana takođe poseduju i bočne lance, od kojih su najzastupljeniji oni sa  $\alpha$ -(1→3) grananjem a ređe oni sa  $\alpha$ -(1→4) i  $\alpha$ -(1→2) bočnim lancima (Brison et al., 2012; Vuillemin et al., 2016). Tačna struktura svakog molekula dekstrana kao i stepen i vrsta bočnog grananja (da li je u pitanju  $\alpha$ -(1→4),  $\alpha$ -(1→2) ili  $\alpha$ -(1→3) tip grananja) zavisi od bakterijskog soja koji ih proizvodi, pa tako i od tipa dekstransaharaze (Jeanes et al., 1954).

Na sintezu i karakteristike molekula dekstrana mogu da utiču brojni faktori, ipak najvažniji su uslovi gajenja i koršćeni soj BMK. Jedan jedini enzim može da katalizuje formiranje više različitih tipova veza u molekulu dekstrana, i da na taj način omogući formiranje razgranatog molekula dekstrana (Neely & Nott, 1962; Padmanabhan & Kim, 2002). Tačnije rečeno, svaka dekstransaharaza proizvodi molekul dekstrana određenih karakteristika.

*Lc. mesenteroides* B-512F, komercijalno je najeksploatisaniji soj za proizvodnju dekstrana, sintetiše dekstran koji sadrži visok procenat  $\alpha$ -(1→6)-veza, preko 95 %, i relativno mali broj  $\alpha$ -(1→3)-veza, ispod 5 % (Dols, Remaud-Simeon, et al., 1997).

### 2.2.1.2. Upotreba dekstrana

Fizičke i hemijske osobine dekstrana variraju u zavisnosti od bakterijske vrste iz koje su dobijeni i metode kojom su dobijeni, ipak zajednička karakteristika za sve dekstrane je da su bele čvrste supstance bez ukusa. Takođe, najveći broj dekstrana je dobro rastvorljiv u vodi i ponašaju se kao Njutnovske tečnosti. Zahvaljujući svojoj nejonskoj (neutralnoj) prirodi i dobroj stabilnosti u normalnim uslovima rada, dekstran ima široku industrijsku primenu (M. Santos et al., 2000). Komercijalna upotreba dekstrana najviše je zastupljena u medicini, farmaceutskoj, prehrambenoj, tekstilnoj i hemijskoj industriji (Vettori et al., 2012). Čak i fruktoza koja nastaje kao sporedan proizvod sinteze dekstrana, kao niskokaloričan šećer ima veliku primenu u industriji hrane (M. Santos et al., 2000).

Postoji veliki broj radova posvećenih mnogobrojnim upotrebama molekula dekstrana, delimično degradiranog dekstrana i njihovih derivata (Vettori et al., 2012).

Dekstran relativno niske molekulske mase može da se koristi kao zamena za krvnu plazmu u velikom broju slučajeva. Prvi podsticaj za njegovu komercijalnu proizvodnju ticao se baš ove primene. Prirodni dekstran čija je masa otprilike  $5 \cdot 10^8$  Da nije pogodan kao takav za korišćenje, već se optimalne mase takozvanog kliničkog dekstrana kreću u opsegu od 40 do 100 kDa. U medicini se još koristi i za ublažavanje anemija kako kod ljudi tako i kod životinja i to u vidu preparata gvožđe-dekstrana (Ahsan, 1998). Novija istraživanja dala su ohrabrujuće rezultate i za primenu dekstrana (u obliku nanočestica srebrnog dekstrana) kao hemijskog senzora za selektivnu detekciju cisteina (Davidović et al., 2017).

Za farmaceutsku i industriju kozmetike, hidrogel dekstrana sa (umrežen) trans ferulinskom kiselinom ima potencijalnu primenu za transport vitamina E (Cassano, Trombino, Muzzalupo, Tavano, & Picci, 2009).

U industriji hrane dekstran se najviše koristi kao sredstvo za zgušnjavanje džemova i sladoleda. On sprečava kristalizaciju šećera, poboljšava zadržavanje vlage i održavanje ukusa i izgleda različitih prehrambenih proizvoda (Bhavani & Nisha, 2010). Dekstran može da se koristi i kao premaz u vidu filma za različite smrznute proizvode i suvo voće, i tako zaštititi hranu od oksidacije i drugih hemijskih promena (Davidović et al., 2018).

Upotreba dekstrana u hemijskoj industriji je nezamenljiva. Matriksi od umreženih dekstrana imaju široku upotrebu u hromatografijama kako u biohemijskim istraživanjima tako i u industriji. Kod gel filtracione hromatografije, kolone sa dekstranskim matriksima koriste se

za razdvajanje i prečišćavanje biomolekula čija se molekulska masa u opsegu od 0,7 do 200 kDa. Kod jonoizmenjivačkih hromatografija dekstran koji se koristi kao punjenje za kolone mora biti prethodno derivatizovan negativno ili pozitivno naelektrisanim grupama kao što su sulfopropil (SP), dietilaminoetil (DEAE), dietil(2- hidroksipropil) aminoetil (QAE) i karboksimetil (CM).

## **2.2.2. Oligosaharidi**

Sposobnost određenih sojeva bakterija mlečne kiseline da proizvode egzopolisaharide uglavnom je praćena i sintezom oligosaharida (Korakli & Vogel, 2006).

Tradicionalno, oligosaharidi se definišu kao polimeri izgrađeni iz monosaharidnih jedinica, sa stepenom polimerizacije između 2 i 10 monomernih jedinica (3 i 10 prema IUB-IUPAC nomenklaturi), mada mogu biti i duži od 20 do 25 (Barreteau, Delattre, & Michaud, 2006).

Oligosaharidi imaju sladak ukus iako je stepen slasti uvek manji od saharoze, tako da ih ova osobina čini primamljivim za eksploataciju u industriji hrane kao zamena za saharozu. Komercijalizacija oligosaharida kao niskokaloričnih punioca započela je još 1980 godine. Takođe, oligosaharidi su higroskopne supstance pa zahvaljujući svom velikom kapacitetu za zadržavanje vlage bez povećanja aktivnosti vode, oni se u formulacijama hrane koriste i kao humektanti.

Interesovanje za oligosaharide je naglo poraslo širom sveta, od trenutka kada je nekima od njih dodeljen status prebiotika. Oligosaharidi različitog porekla (bakterijski, iz algi, gljiva i viših biljaka) počeli su intenzivno da se upotrebljavaju i kao sastojci hrane i kao dijetetski suplementi. Nesvarljivi oligosaharidi bili su uključeni u sastav dijetalnih vlakna, zaslađivača, dijetetskih proizvoda i humektanata u proizvodnji pekarskih i konditorskih proizvoda. Funkcionalni oligosaharidi su se pokazali kao efikasni u prevenciji zubnog karijesa, ali i stimulaciji proliferacije probiotika u okviru mikrobiote gastrointestinalnog trakta a time i sprečavanja rasta patogena, jačanju imuniteta, olakšavanju apsorpcije minerala regulaciji glukoze u krvi kod dijabetesa i serumskih lipida u hiperlipidemijama. Osim brojnih farmakoloških primena koja pored prebiotiske uključuje i antoksidativno svojstvo, oligosaharidi su našli primenu u kozmetici, kao hrana za životinje i ribe, u poljoprivredi i tako dalje (Patel & Goyal, 2011).

Velika upotreba funkcionalnih oligosaharida u različitim granama industrije predstavlja imperativ za razvoj sintetskih metoda koje mogu da se primene u industrijskim razmerama. Oligosaharidi mogu biti dobijeni ekstrakcijom iz prirodnih izvora ili sintezom, primenom fizičkih, hemijskih ili enzimskih metoda (Mussatto & Mancilha, 2007).

Oligosaharidi su u suštini jako kompleksni molekuli: 3 različite heksopiranozne monosaharidne jedinice mogu da daju čak 720 trisaharida. Za sintezu strukturno tačno definisanih i visoko prečišćenih oligosaharida, primenjuje se ili hemijska ili enzimska metoda (Plou, de Segura, & Ballesteros, 2007). Efikasnost proizvodnje hemijskom sintezom je veoma mala u poređenju sa enzimskim postupkom koji je selektivniji, i zbog toga se većina oligosaharada danas komercijalno proizvodi primenom enzima (Kothari, Baruah, & Goyal, 2012).

Zbog svoje selektivnosti primena mikrobnih enzima glukoziltransferaza, koji na saharozu kao supstratu, sintetišu GLOS, danas se smatra najefikasnijom metodom za proizvodnju ovih oligosaharida (Patel & Goyal, 2011).

### **2.2.1.1. Glukooligosaharidi**

Iako je primarna fiziološka funkcija dekstransaharaze sinteza dekstrana velike molekulske mase, kada su u reakcionoj smeši prisutni odgovarajući akceptorski molekuli, enzimska aktivnost može biti preusmerena na sintezu oligosaharidnih molekula (Naessens et



al., 2005). Više detalja o sintezi oligosaharidnih molekula dato je u poglavlju 2.1.1.2.1. Mehanizam akceptorske reakcije.

U zavisnosti od porekla dekstransaharaze, u svojoj strukturi oligosaharidi mogu da sadrže  $\alpha(1\rightarrow6)$ ,  $\alpha(1\rightarrow4)$ ,  $\alpha(1\rightarrow3)$  i  $\alpha(1\rightarrow2)$  tip veze (Castillo et al., 1992). S obzirom da amilaze prisutne u ljudskom digestivnom traktu mogu da hidrolizuju glikozidne veze u kojima glukoza sa sledećom monosaharidnom jedinicom povezana  $\alpha(1\rightarrow4)$  ili  $\alpha(1\rightarrow6)$  glikozidnom vezom jasno je da su neki od oligosaharida koje sintetiše dekstransaharaza nesvarljivi pa time mogu imati prebiotska svojstva.

### **2.3.1.2. Funkcionalni oligosaharidi koje sintetiše dekstransaharaza**

Sinteza oligosaharida katalizovana glukansaharazama omogućava dobijanje velikog broja bioaktivnih GLOS-a a posebno su među njima značajni takozvani nedigestibilni oligosaharidi koji imaju i prebiotski efekat (Monsan et al., 2010). Prednost prebiotika u odnosu na probiotike zasnovana je na činjenici da su prebiotici potpuno otporni na agresivnu sredinu gastrointestinalnog trakta kao i na to da su znatno jeftiniji i lakši za upotrebu u različitim dijetalnim režimima ishrane (Al-Sheraji et al., 2013; Goffin et al., 2011). Prema definiciji iz 2010, prebiotici su dijetetske komponente koje selektivno stimulišu rast i/ili aktivnost jedne ili više vrsta/rodova mikroorganizama prisutnih u crevnom traktu i na taj način pospešuju zdravlje domaćina (Roberfroid et al., 2010). Tradicionalno u prebiotike su svrstavani samo nesvarljivi oligosaharidi ali je definicija prebiotika od 2017 proširena i pod prebiotikom se podrazumevaju svi supstrati koje selektivno koriste mikroorganizmi čoveka i kroz interakciju sa mikroorganizmom ostvaruju pozitivan zdravstveni efekat (Gibson et al., 2017).

Među GLOS koje proizvode dekstransaharaze, najviše pažnje sa stanovišta upotrebe kao prebiotika, privlače oni sintetisani pomoću dekstransaharaze iz bakterije *Lc. mesenteroides* NRRL B-1299. Specifičnost ovog soja, to jest dekstransaharaze koju proizvodi, je formiranje  $\alpha(1\rightarrow2)$ -veze u GLOS (izomaltooligosaharidima) nastalim kao proizvod akceptorske reakcije. Najviše je proučavana njihova sinteza upotrebom maltoze (Dols, Remaud Simeon, Willemot, Vignon, & Monsan, 1997) metil i 1-*O*- $\alpha$ -D glukopiranozida (De Segura, Alcalde, Bernabé, Ballesteros, & Plou, 2006; Plou, Martín, de Segura, Alcalde, & Ballesteros, 2002) kao akceptora.

Linearni izomaltooligosaharidi sa visokim stepenom polimerizacije takođe pokazuju prebiotski efekat kod ljudi i životinja (Goffin et al., 2011; Hu, Ketabi, Dieleman, & Gänzle, 2011; Yen, Tseng, Kuo, Lee, & Chen, 2011). Tačnije, istraživanja su pokazala da izomaltooligosaharidi sa stepenom polimerizacije od 3, 3 bivaju fermentisani u debelom crevu pacova (Iwaya et al., 2012). Industrijska proizvodnja izomaltooligosaharida uključuje enzimsku hidrolizu skroba u viskozni maltozni sirup, koja je praćena delovanjem  $\alpha$ -transglukosidaze (Goffin et al., 2011). Ipak komercijalni izomaltooligosaharidi proizvedeni na ovaj način obično sadrže i veliki udeo svarljivih ugljenih hidrata, čime se smanjuje njihova funkcija kao prebiotika (Hu, Ketabi, Buchko, & Gänzle, 2013). Izomaltoza, panoza i izomaltotrioza su glavni izomaltooligosaharidi koji tada nastaju. Nešto što bi moglo da prestavlja obećavajuću alternativu za komercijalnu sintezu izomaltooligosaharida sa kontrolisanom veličinom lanaca (uz variranje odnosa saharoze i maltoze) je akceptorska reakcija sa dekstransaharazama. Sa povećanjem saharoza/maltoza odnosa, povećava se stepen polimerizacije najzastupljenijeg i najdužeg proizvoda (C. Y. Lee, Yun, Yun, Oh, & Kim, 1997; K. W. Lee et al., 2012; Su & Robyt, 1994). Ipak, neophodne su detaljnije studije za pronalaženje optimalnih uslova sinteze izomaltooligosaharida sa većim stepenom polimerizacije.

### **2.3. Povećanje efikasnosti procesa fermentacije – imobilizacija ćelija**

Korišćenje imobilisanih ćelija predstavlja vrlo efektanu metodu za povećanje ćelijske mase u bioreaktoru kao i za povećanje efikasnosti iskorišćenja supstrata i produktivnosti fermentacionog procesa uz minimalne troškove (D. T. Santos, Sarrouh, Rivaldi, Converti, &

Silva, 2008). Najčešće korišćene tehnike za imobilizaciju celih ćelija su one kod kojih se upotrebljavaju sintetski materijali. Tu spada "zarobljavanje" unutar poroznog polimernog matriksa i zadržavanje iza mikroporozne barijere, kao i agregacija ili vezivanje ćelija za površinu nerastvornog nosača (Öztop et al., 2003). Zbog brojnih nedostataka vezanih za primenu sintetskih materijala, poslednjih godina u ekspanziji je potraga za obnovljivim, jeftinim i prirodnim biomaterijalima koji poseduju kapacitete za vezivanje ćelija.

U literaturi ima malo dostupnih podataka o imobilizaciji ćelija *Lc. mesenteroides* radi produkcije enzima, dekstrana ili oligosaharida (El-Sayed, Abdul-Wahid, & Coughlin, 1992; El-Sayed, Mahmoud, & Coughlin, 1990; Qader, Aman, & Azhar, 2011; Quirasco, Remaud-Simeon, Monsan, & López-Munguía, 1999). Među prvima radovima je imobilizacija celih ćelija soja *Lc. mesenteroides* NRRL B-512F i to korišćenjem tri različita nosača: kalcijum alginata, poroznih čestica Celite (čestice pečene dijatomejske zemlje, sastavljene od 80 % SiO<sub>2</sub>) i nerđajućeg čelika (El-Sayed, Abdul-Wahid, & Coughlin, 1992; El-Sayed, Mahmoud, & Coughlin, 1990). Kao rezultat ovog istraživanja dobijeno je da su slobodne ćelije proizvele za 18 % više dekstransaharaze od ćelija imobilisanih u kalcijum-alginatu ali i 64 % manje nego ćelije imobilisane u Celitu. Najveći problem prilikom imobilizacije celih ćelija u kalcijum-alginatni matriks javio se zbog raspadanja zrna usled produkcije molekula dekstrana. Sa tim u vezi sledeća istraživanja koja su sprovedena vezano za imobilizaciju ćelija *Lc. mesenteroides* NRRL B-1299 soja u alginatna zrna pokušala su da prevaziđu ovaj problem dodatkom maltoze u fermentacioni medijum i preusemravanjem reakcije na sintezu oligosaharida (Quirasco, Remaud-Simeon, et al., 1999). Kader (Qader) i saradnici su za potrebe proizvodnje dekstrana imobilisali ćelije *Lc. mesenteroides* HA1 soja u akrilamidni gel. Slobodne ćelije prestale su da proizvode ovaj polisaharid već nakon 144 h, dok su imobilisane ćelije nastavile da ga proizvode čak i nakon 480 h. Ipak molekul dekstrana koji su proizvele imobilisane ćelije bio je manje molekulske mase u odnosu na onaj koji je proizveden od strane slobodnih ćelija. Na osnovu ova dva parametra, oni su zaključili da akrilamid može da se koristi kao dobar nosač za imobilizaciju ćelija i proizvodnju dekstrana velike čistoće na industrijskom nivou (Qader et al., 2011). Međutim problem korišćenja ovog polimera leži u činjenici da njegova upotreba nije ekološki opravdana i da bi nakon upotrebe trebalo uložiti dodatno napore za njegovo odlaganje/uništavanje. Shodno tome postoji globalni trend koji potencira upotrebu "zelenih" materijala, koji nisu štetni za životnu sredinu.

#### **2.4. Upotreba agro-industrijskog otpada kao nosača za imobilizaciju ćelija**

Agro-industrijskim otpadom smatra se otpad koji nastaje tokom industrijske obrade poljoprivrednih ili životinjskih proizvoda. Onaj koji potiče nakon obrade poljoprivrednih proizvoda obuhvata materijale kao što su slama, lišće, kore, ljuštore, semena, pulpa iz voća, mahunarke ili žitarice (pirinač, pšenica, kukuruz, ječam...), rezanac koji nastaje nakon obrade šećerne trske ili repe, talog od kafe ili ostaci zrna koji zaostaju nakon proizvodnje piva, kao i mnogi drugi. Svake godine se generišu velike količine agro-industrijskog otpada. Ranijih godina je ovakav otpad uglavnom korišćen za ishranu životinja ili je uništavan spaljivanjem. Danas, nalaženje alternativa za ponovnu upotrebu ovog otpadnog materijala je cilj kome se sve više teži u velikom broju zemalja širom sveta, uzimajući pri tome u obzir i ekonomski aspekt i uticaj na životnu sredinu. Ponovna upotreba agro-industrijskog otpada u nekom fermentacionom procesu je od posebnog interesa pre svega zbog svoje dostupnosti, niske cene koštanja, karakteristika koje omogućavaju dobijanje velikog broja jedinjenja koja imaju ekonomsku vrednost (enzima, bioaktivna jedinjenja, mlečne kiseline, aroma i tako dalje), a pored toga ovo predstavlja i ekološki prihvatljivu alternativu za njegovo odlaganje. Agro-industrijski otpad u procesu fermentacije može da ima ulogu nosača za ćelije ili da bude izvora ugljenika, azota i/ili mineralnih materija, čime bi se znatno pojeftinio proces fermentacije i omogućio da se izbegne upotreba skupih hemikalija koje su glavne komponente fermentacionih medijuma. Kao

posledica toga, više ekonomskih procesa moglo bi biti uspostavljeno za uvođenje/realizovanje u industrijskim uslovima (Mussatto, Ballesteros, Martins, & Teixeira, 2012).

#### 2.4.1. Tipovi agro-industrijskog otpada

Većinu agro-industrijskog otpada čini lignocelulozna biomasa (nju čini hemiceluloza, celuloza i lignin) (Mussatto et al., 2012). Drugi deo otpada se može označiti kao industrijski otpad koji sadrži otpadne vode iz različitih industrijskih/fabričkih postrojenja kao i druge sporedne proizvode iz industrijske prerade različitih biljnih sirovina (šećerna repa, trska, krmno bilje, ječam, pšenica...).

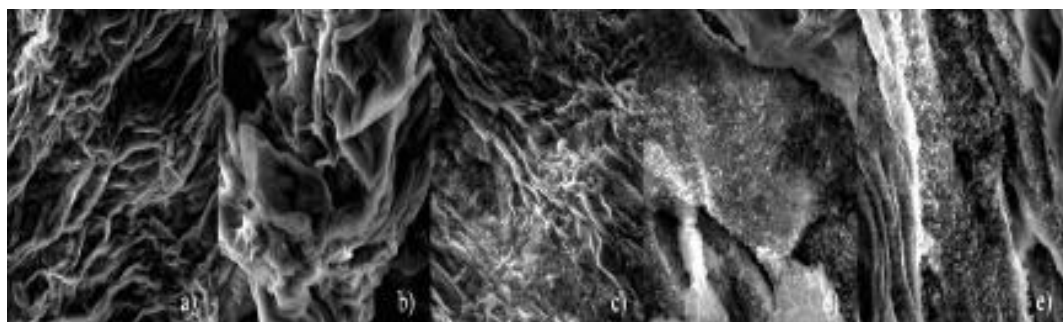
#### 2.4.2. Među- i nusproizvodi šećerne repe

Pri preradi šećerne repe u konzumne kristale šećera, javljaju se različiti međuproizvodi ovog procesa kao što su ekstrakcioni, retki i gusti sok, kao i nusproizvodi melasa i izluženi repini rezanci (D. Vučurović, 2015).

##### 2.4.2.1. Izluženi repin rezanac

Ispošćeni material iz industrije šećera, koji zaostaje nakon difuzije vrućom vodom da bi se izvukao šećer iz repe, naziva se izluženi repin rezanac. Visok sadržaj polsaharida i porozna struktura su karakteristike koje kvalifikuju ovu sirovinu u potencijalni supstrat za gajenje mikroorganizama. Kako je sporedni proizvod, njegovo odlaganje predstavlja veliki problem, pa se izluženi repin rezanac, pomešan sa melasom i ispresovan u formi briketa, uglavnom koristi kao hrana za životinje (Nigam, 1994).

Mihajlovski i saradnici koristili su repin rezanac kao nosač za imobilizaciju ćelija bakterija roda *Paenibacillus* za proizvodnju enzima amilaza (Mihajlovski et al., 2016). Imobilizacija ćelija na površini i u unutrašnjosti repinog rezanca je posledica prirodne adhezije bakterija. Kako je površina ćelija *Paenibacillus* negativno naelektrisana a površina rezanca pozitivno naelektrisana elektrostatičke interakcije omogućavaju imobilizaciju (Mihajlovski et al., 2016; V. M. Vučurović & Razmovski, 2012b). Na slici 2.4. prikazana je unutrašnja struktura repinog rezanca i ćelije bakterija koje su se imobilisale u unutrašnjosti i na površini.



Slika 2.4. Skenirajuća elektronska mikrografija repinog rezanca sa baznim pretretmanom (a) uveličanje 5000×; (b) uveličanje 10 000×; (c) *P.chitinolyticus* CKS1 imobilisan na površini (b) (5000×); na površini i u šuplinama (c) (10 000×) i (d) (5000×) (Preuzeto i modifikovano iz (Mihajlovski et al., 2016))

##### 2.4.2.2. Melasa

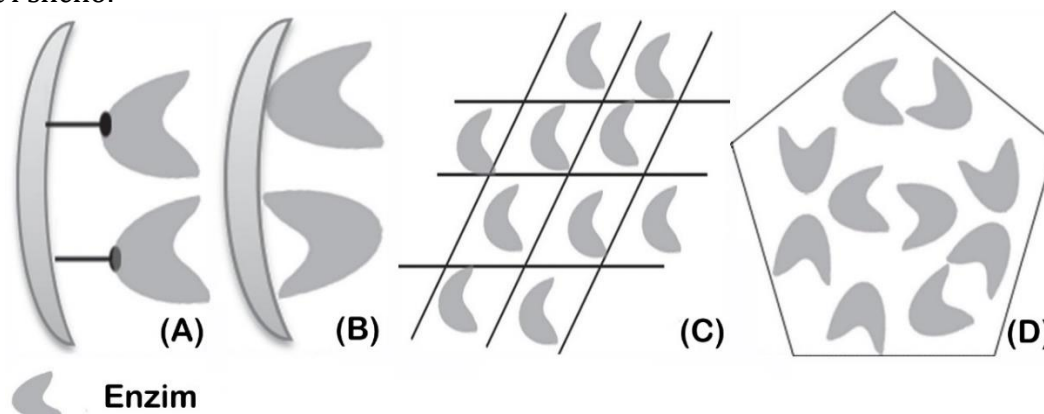
Melasa, sporedni proizvod industrije šećera, može da sadrži i do 54 % ugljenih hidrata (Nigam & Vogel, 1991) među kojima je saharoza svakako najzasatupljenija (50 %), dok se glukoza, fruktoza i rafinoza prisutne u znato manjem procentu (Harland, Jones, & Hufford, 2006). Takođe sastav melase je dosta složen i pored ugljenih hidrata sadrži i brojne

komponente kao što su mineralne materije, organske supstance i vitamini (L. R. Rodrigues, Teixeira, & Oliveira, 2006).

Pre svega zbog svog raznovrsnog i bogatog sastava, a svakako i zbog niske cene, melasa predstavlja pogodan materijal/supstrat u mikrobiološkim fermentacijama (Mihajlovski et al., 2016). Za primenu melase, kao supstrata za gajenje mlečnih bakterija, neophodno je izvršiti njenu pripremu koja se satoji iz tri koraka: razblažiti melasu, podesti odgovarajuću pH vrednost i na kraju je sterilisati. Pri visokim koncentracijama supstrata, pre svega ugljenih hidrata a onda i drugih nutrijenata kao što su neorganske soli Na, K i Fe (Ergun & Ferda Mutlu, 2000), usled visokog osmotskog pritiska može da bude inhibiran rast bakterijskih ćelija a samim tim i formiranja proizvoda metabolizma, Razblaženjem melase se postiže dobijanje optimalne koncentracije supstrata. Pri većim koncentracijama šećera može doći do delimične ili potpune inhibicije rasta. Koliko će biti razblaženje melase, koja će se koristiti kao supstrat za mikrobiološku podlogu, zavisi kako od vrste mlečne bakterije tako i od sredine iz koje je izolovana. Srbija poseduje značajne zalihe šećerne repe i 2011. godine izvoz melase bio je 59.655 t (Mojović et al., 2013).

## 2.5. Imobilizacija dekstransaharaze

Dekstransaharaza koju sintetiše *Lc. mesenteroides* NRRL B-512 je enzim koji se u industriji koristi za komercijalnu proizvodnju dekstrana i oligosaharida. Da bi se uopšte govorilo o industrijskoj (i ekonomski opravdanoj) primeni dekstransaharaze, ona mora biti imobilisana, što znači da treba da bude ograničena u slobodnom kretanju u određenom prostoru uz zadržavanje katalitičke sposobnosti čime se omogućava i njeno korišćenje u više kontinuiranih ciklusa (Knežević-Jugović, 2008). Imobilizacija mora da se odvija na veoma jednostavan i ekonomski isplativ način, u današnje vreme je poželjno da to bude i ekološki prihvatljivo, sa ciljem višestruke upotrebe enzima tokom dužeg vremenskog perioda (Guisan, 2006). Poslednjih godina, veliki broj protokola za imobilizaciju dekstransaharaze objavljen je u naučnoj literaturi, među kojima su: adsorpcija, kovalentna imobilizacija i obuhvatanje enzima nosačem/inkapsulacija (Slika 2.5.). Samo mali broj njih zadovoljava sve kriterijume kao što su jednostavnost postupka imobilizacije uz veliko poboljšanje funkcionalnih osobina enzima, od kojih se pre svega misli na katalitičku aktivnost, stabilnost (operativna, pH ili termička), specifičnost i slično.



Slika 2.5. Šematski prikaz metoda imobilizacije enzima: (A) kovalentna imobilizacija, (B) adsorpcija, (C) obuhvatanje enzima nosačem i (D) inkapsulacija (Preuzeto i modifikovano iz (Reis et al., 2019))

Kaboli i Reilly su bili prvi koji su pokušali da imobilizuju dekstransaharazu ali bez velikog uspeha (Kaboli & Reilly, 1980). Oni su još tada došli do zaključka da je dekstransaharaza enzim koji je izuzetno komplikovano imobilisati. Ipak, kao što se može videti u literaturi, sa najviše prepreka prilikom imobilizacije ovog enzima susreli su se istraživači koji su pokušali

kovalentno da imobilizuje ovaj enzim, što zbog činjenice da je dekstran maskirao reaktivne grupe na enzimu a što zbog inaktivacije enzima tokom imobilizacije (Funane, Ishii, Ono, & Kobayashi, 2005; Parlak, Ustek, & Tanriseven, 2013; Robyt, Yoon, & Mukerjea, 2008).

### 2.5.1. Kovalentna imobilizacija

Kovalentna imobilizacija enzima zasniva se na stvaranju jakih hemijskih veza između funkcionalnih grupa enzima i funkcionalnih grupa prisutnih na površini čvrstog nosača. Enzimi se uglavnom vezuju za nosač preko funkcionalnih grupa koje se nalaze na aminokiselinama (karboksilnih grupa,  $\alpha$ - i  $\epsilon$ - amino grupa, sulfhidrilnih grupa, hidroksilnih grupa, i tako dalje). Neke od ovih grupa, na primer, SH- (sulfhidrilna) ili  $\epsilon$ - amino grupa mogu da reaguju direktno sa odgovarajućim grupama na nosaču (Tischer & Wedekind, 1999). Druge grupe, kao što je hidroksilna grupa, najčešće nisu dovoljno reaktivne tako da je poželjno prethodno aktivirati ili sam enzim ili nosač. Znatno češće se pribegava aktivaciji odnosno, modifikaciji površine nosača. Postupci kovalentne imobilizacije enzima se sastoje iz dve faze: a) aktivacija ili modifikacija površine nosača i b) vezivanje enzima za nosač. Pod aktivacijom površine nosača podrazumeva se izvođenje hemijske reakcije između nosača i aktivatora, pri čemu se na njegovoj površini uvode nove funkcionalne grupe. Neke od najčešće primenjivanih metoda aktivacije matriksa su: aktivacija -OH ili -COOH grupe jedinjenjima sa aktivnim atomom hlora, aktivacija -NH<sub>2</sub> grupe diazotovanjem, aktivacija -COOH grupe epoksidnim grupama i tako dalje. Ipak, najprimenljiviji načini aktivacije nosača su aktivacija -OH grupe cijanogenbromidnom metodom koju su uveli Aksen i saradnici (Axén, Porath, & Ernback, 1967; Porath & Axén, 1976) kao i aktivacija -NH<sub>2</sub> grupe glutaraldehidom i epihlorhidrinom (Betancor et al., 2006a).

Najvažnija prednost kovalentne imobilizacije u odnosu na ostale metode imobilizacije, je ta što su ovako imobilisani enzimi stabilni u širokom opsegu spoljnih uslova pa ne dolazi do spiranja enzima sa nosača i kontaminacije proizvoda. Druga prednost je u broju postupaka i specifičnih agenasa koji se koriste, pa je prema tome ova metoda raznovrsnija od ostalih i otvara mogućnost ciljane promene svojstava imobilisanog enzima. Treća, ali ne i najmanje značajna, je da su gubici aktivnosti enzima usled difuzionih limitacija u ovim sistemima znatno manji zbog načina vezivanja enzima za nosač. Zbog svega predhodno navedenog, ova metoda imobilizacije enzima ima veliku primenu u medicini, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Osnovni nedostaci kovalentne imobilizacije su velika potrošnja skupih reagenasa, postupci aktivacije nosača i potencijalni gubitak aktivnosti enzima u samom postupku imobilizacije. Pored toga, postupci regeneracije nosača su dosta složeni i skupi (Knežević-Jugović, 2008).

Nekoliko različitih istraživačkih grupa bavilo se kovalentnom imobilizacijom dekstransaharaze. Dekstransaharaza je imobilisana na Bio-Gel P-2 (Robyt et al., 1974), poliakrilamidnom gelu, celulozno acetatnim membranama, polisulfonskim membranskim modulima sa šupljim vlaknima (Robyt & Corrigan, 1977; Robyt & Taniguchi, 1976) i alkilamin poroznoj siliki (Kaboli & Reilly, 1980). Takođe, postoji opisana u literaturi i kovalentna imobilizacija dekstransaharaze na  $\alpha$ -aminopropil i glutaraldehid aktiviranoj poroznoj siliki (Monsan & Lopez, 1981; Monsan, Paul, Auriol, & Lopez, 1987). U većini ovih studija dobijen je niski prinos imobilizacije aktivnosti, niska specifična aktivnost i mala operativna stabilnost imobilisanog enzima. Ovi rezultati ukazuju na činjenicu da su neke od reaktivnih grupa koje su prisutne u katalitičkom domenu, kao na primer lizin, reagovale sa aldehidnim i epoksi grupama nosača za kovalentnu imobilizaciju. Pored toga, dekstran vezan za enzim maskira reaktivne grupe na površini, i na taj način onemogućava kovalentnu imobilizaciju dekstransaharaze (Funane et al., 2005; Parlak et al., 2013; Robyt et al., 2008). Da bi prevazišli ovaj problem, različite grupe istraživača koristile su dodatne korake prečišćavanja radi uklanjanja molekula glukana sa površine enzima pre samog postupka kovalentne imobilizacije.

Među svim dosad korišćenim nosačima, nosači koji sadrže epoksi grupe pokazali su se kao najbolji za imobilizaciju ovog enzima kao i za potencijalnu industrijsku primenu (Katchalski-Katzir & Kraemer, 2000; Mateo, Fernández-Lorente, Abian, Fernández-Lafuente, & Guisán, 2000). Epoksi aktivirani nosači mogu hemijski da reaguju sa velikim brojem različitih nukleofilnih grupa prisutnih na površini proteina pre svega sa lizinom, histidinom, cisteinom i tirozinom (Mateo et al., 2008).

Gomez de Segura i saradnici su autori koji su imobilisali dekstransaharazu na epoksi aktivirane akrilne polimere sa drugačijim morfološkim svojstvima (Eupergit C and Eupergit C 250L) (De Segura et al., 2004). U cilju povećanja dostupnosti reaktivnih grupa na površini enzima za reakciju sa epoksi grupama na površini nosača, enzim je nakon hromatografskog prečišćavanja dodatno tretiran. Nativna dekstransaharaza, koja može da sadrži i do 80 g glukoze/ g proteina (Graebin, Schöffner, et al., 2016), tretirana je dekstranzom da bi se osiguralo potpuno uklanjanje dekstranskog sloja. Rezultati istraživanja pokazali su takođe i da kod nosača Eupergit C 250L dekstransaharaza može da se veže i unutar njegovog makroporoznog matriksa, zbog toga što ovaj nosač ima veću zapreminu i veći dijametar pora u poređenju sa Eupergit C, što objašnjava i veću aktivnost ovog nosača (do 710 U/g nosača). Korišćenjem Eupergita C 250L maksimalni prinos aktivnosti nakon imobilizacije i separacije imobilisanog enzima je 22 %, i imobilisana dekstransaharaza zadržala je tokom 2 dana na 30 °C i pH 5,4 više od 40 % od svoje početne aktivnosti.

Hašem i saradnici (A. M. Hashem, Gamal, Hassan, Hassanein, & Esawy, 2016) bavili su se proučavanjem kovalentne imobilizacije dekstransaharaze iz bakterije *Enterococcus faecalis* Esawy na karboksimetil celulozna zrna sa Fe<sup>3+</sup> umreženim alginatom modifikovanim polietilen aminom i glutaraldehidom. Novina u njihovom istraživanju u odnosu na prethodna, bila je i u načinu prečišćavanja i koncentrovanja enzima. Nakon centrifugiranja i odstranjivanja ćelija, supernatant je propušten kroz sistem membrana sa veličinom pora 10,000 NMWL, i na taj način dekstransaharazi su uklonjene sve nečistoće čija je molekulska masa bila veća od veličine pora. Prinos imobilizacije aktivnosti na ovom nosaču bio je 94,35 %. Pored toga, nakon imobilizacije dekstransaharaze za ovaj nosač u velikom obimu se povećala i temperaturna i pH stabilnost imobilisanog enzima u odnosu na slobodan, i to pre svega zahvaljujući kovalentnim vezama koje su nastale a koje su zaštile enzim od konformacionih promena (Mateo et al., 2008; Mateo et al., 2002). Vraćanjem enzima u cikluse pokazano je da enzim zadržava 60 % od svoje početne aktivnosti čak tokom 15 uzastopnih ciklusa (A. M. Hashem et al., 2016).

Alcalde sa saradnicima (Alcalde et al., 1999) ispitivao je kovalentnu imobilizaciju dekstransaharaze na aktiviranoj siliki (silica X030). Ključni korak u poboljšanju parametara imobilizacije i kod ovih autora bilo je uklanjanje sloja dekstrana sa površine enzima, što je doprinelo povećanju prinosa imobilizacije aktivnosti sa 0,6 % za nativnu dekstransaharazu na 13 % za dekstransaharazu kojoj je prethodno uklonjen dekstran. Niska vrednost prinosa imobilizacije aktivnosti može da bude objašnjena učešćem ostatka lizina prisutnih u katalitičkom domenu dekstransaharaze u formiranju kovalentnih veza sa nosačem. Interakcija lizina sa nosačem menja konformaciju proteina i na taj način se menja katalitička aktivnost imobilisanog enzima (Funane et al., 2005; Goyal & Katiyar, 1998,a 1998b). Prinos imobilizacije aktivnosti biokatalizatora imobilisanog na siliki opala je za 48 h reakcije sa 58 % na 17 %, što se nije dešavalo u slučaju imobilizacije dekstransaharaze u alginatna zrna, gde je i nakon 48 h reakcije ostala 100 % (Alcalde et al., 1999).

## 2.5.2. Imobilizacija adsorpcijom

Adsorpcija je jedna od najstarijih i najjednostavnijih metoda imobilizacije enzima. Još 1916. godine zapaženo je da je invertaza adsorbovana na aktivnom uglju zadržala svoju katalitičku aktivnost (Nelson & Griffin, 1916). Pre toga je ustanovljeno da cela ćelija može

uspešno da se adsorbuje na pogodan čvrst nosač. Ova metoda imobilizacije bazirana je na adsorpciji enzima iz vodenog rastvora na površinu nerastvornih čestica nosača. Tačnije, ona se zasniva na formiranju nekovalentnih interakcija između molekula enzima i nosača kao što su vodonične veze, jonske interakcije, hidrofobne interakcije i Vander Walls-ove sile, koje se uspostavljaju između molekula enzima i nosača (Shanmugam, 2009). Osnovne prednosti ove metode su pristupačnost i niska cena adsorbenata, jednostavnost postupka (bez upotrebe skupih i toksičnih hemikalija), jednostavnost regeneracije nosača posle upotrebe i očuvanje enzimske specifičnosti i aktivnosti. Takođe, pošto su interakcije između enzima i nosača slabe nekovalentne veze, ovaj model imobilizacije se može uporediti sa ćelijskom membranom. Glavni nedostaci ove metode imobilizacije su ti što se teško može standardizovati i to što se molekuli enzima mogu lako desorbovati usled prisustva jonskih supstanci ili drugih proteina u rastvoru (Knežević-Jugović, 2008)

Postoji samo nekoliko radova vezanih za imobilizaciju dekstransaharaze adsorpcijom. Kaboli i Reilly (Kaboli & Reilly, 1980) pokušali su da vežu dekstransaharazu dobijenu iz *Lc. mesenteroides* 512 F anjonskim jonoizmenjivačima na DEAE-celulozu, DEAE- Sephadex A-25 i A-50, i katjonske kolone SP-Sephadex C-25 i C-50, ali bez zadovoljavajućih rezultata. Hidroksiapatit (Gupta & Prabhu, 2008), Sephadex G200 (Kobs, 1991), i fenoksiacetyl celuloza (Chang, Ghim, Cho, Landis, & Reilly, 1981) su takođe ispitivani kao potencijalni nosači za imobilizaciju biokatalizatora ali bez većeg uspeha.

### 2.5.3. Obuhvatanje enzima nosačem

Obuhvatanje enzima nosačem predstavlja fizičko ograničavanje kretanja enzima unutar određenog prostora. Pod ovim pojmom podrazumevaju se procesi smeštanja enzima u matrice polimera (kao na primer silika sol gel), u/iza polupropustljive membrane uključujući i mikroinkapsulaciju (Knežević-Jugović, 2008). Ovaj metod imobilizacije najčešće zahteva postupak takozvane *in situ* polimerizacije, koji se izvodi tako što se sinteza polimernog matriksa vrši u prisustvu enzima (enzim se dodaje u rastvor monomera pa se zatim vrši polimerizacija) (Sheldon, 2007; Sheldon & van Pelt, 2013). Prednosti enzima nosačem su sledeće: metoda je jednostavna i univerzalna, enzim je zaštićen od negativnih uticaja spoljašnje sredine (tu spada i mogućnost mikrobiološke kontaminacije) i na kraju, velika mogućnost izbora polaznih monomera. Za imobilizaciju enzima u polimerne matrice se uglavnom koriste poliakrilamidni (reakcija akrilamida i N,N'-metilenbisakrilamida) i poli(2-hidroksietil metakrilatni) gelovi (PHEMA) (Shanmugam, 2009) ili pak prirodni polisaharidi (skrob, agar, alginat, karaginan i tako dalje) i proteinske materije (kolagen, želatin). Najveći nedostatak, odnosno, poteškoća u primeni ove metode je pronalaženje takve matrice gela, koja sa jedne strane treba da bude dovoljno porozna da kroz nju prolaze molekuli supstrata i proizvoda reakcije, a da enzim ne može da izađe iz matrice. Dakle, ova metoda je logičan izbor kod reakcija u kojima su supstrat i proizvod reakcije, molekuli malih molekulskih masa (Shanmugam, 2009).

Najviše proučavana tehnika imobilizacije dekstransaharaze u literaturi je obuhvatanje enzima unutar nosača to jest "zarobljavanje". Ovu metodu su koristile različite grupe autora, manje ili više uspešno, a kao najveću prednost ove metode navodili su to što omogućava imobilizaciju bez stvaranja hemijske veze između enzima i nosača (Alcalde et al., 1999; Ölçer & Tanriseven, 2010; Reischwitz, Reh, & Buchholz, 1995). U poređenju sa drugim metodama imobilizacije dekstransaharaze, obuhvatanje enzima unutar nosača daje veće prinose aktivnosti koje se kreću u opsegu od 57 % to 98 % (Alcalde et al., 1999; Berensmeier, Jördening, & Buchholz, 2006; De Segura et al., 2006; Kothari et al., 2012; Reischwitz et al., 1995).

Poslednjih 20 godina najviše naučnika bavilo se imobilizacijom dekstransaharaze u alginatne kuglice ili alginatna vlakna (Alcalde et al., 1999; A. Hashem, El-Refaei, Gebril, & Abdel-Fattah, 2012; Kothari et al., 2012; Tanriseven & Doğan, 2002). Ovaj metod imobilizacije je inače u čestoj upotrebi za imobilizaciju ćelija i delova ćelija (pre svega zato što su globularni proteini



previše mali u poređenju sa veličinom pora u alginatnom gelu) (Thu, Smidsrød, & Skjak-Brk, 1996). Ipak i imobilizacija dekstransaharaze "zarobljavanjem" (smeštanjem, inkapsulacijom) u alginatne pokazala je visoku i dobru stabilnost za dalju manipulaciju (operativnu stabilnost). Rezultati pokazuju da je imobilizacija ovog enzima u alginatu pre svega moguća zahvaljujući njegovoj jedinstvenoj supramolekulskoj strukturi (Reischwitz et al., 1995). Prednost dekstransaharaze, u odnosu na druge enzime (za ovaj način imobilizacije), upravo leži u tome što je njena površina prekrivena slojem dekstrana koji sprečava curenje ovog enzima iz matriksa (Alcalde et al., 1999).

Alcalde sa saradnicima (Alcalde et al., 1999) je pokazao da u pogledu prinosa imobilizacije i stabilnosti imobilisanog enzima, "zarobljavanje" dekstransaharaze u kalcijum alginatna zrna daje najbolje rezultate. Ovaj enzim imobilisan u alginatna zrna, uspeo je da zadrži svoju aktivnost čak nakon upotrebe u sedam uzastopnih ciklusa (Alcalde et al., 1999). Najveću manu ove metode predstavlja razaranje alginatnih zrna kao i gubitak katalitičke aktivnosti tokom više uzastopnih ciklusa, koja je najverovatnije posledica transportnih ograničenja u/iz alginatnih zrna, kao i raspadanja i cepanja samog zrna usled formiranja dekstrana (Alcalde et al., 1999; Reh, Noll-Borchers, & Buchholz, 1996). Berensmajer (Berensmeier) i saradnici su takođe u svojim radovima pokazali da velika količina dekstrana koja okružuje dekstransaharazu, verovatno predstavlja uzrok smanjenja katalitičke aktivnosti kao posledice ograničenog prenosa mase (Berensmeier, Ergezinger, Bohnet, & Buchholz, 2004). Posle ovih saznanja zaključeno je da dekstransaharaza imobilisana u alginatni matriks (zrna, kuglice), može da se koristi samo za sintezu oligosaharida, pošto dekstran velike molekulske mase ne može da difunduje iz zrna a da ne izazove raspadanje samog zrna (Parlak et al., 2013; Tanriseven & Doğan, 2002).



2.6. Ilustracija različitih alginatnih matriksa (vlakana, kapsula i kuglica) koji su korišćeni za imobilizaciju (Preuzeto i modifikovano iz (Ölçer & Tanriseven, 2010))

Od tada različite grupe naučnika pristupaju rešavanju ovog problema na dva načina. Jedan od pristupa (Ölçer & Tanriseven, 2010) podrazumeva ko-imobilizaciju dekstransaharaze i dekstranaze u cilju poboljšanja uslova proizvodnje oligosaharida, ili još preciznije izomaltooligosaharida (slika 2.6.). Dekstranaza je imobilisana sa namerom da reši problem koji stvara dekstran u alginatnim polimerima. Rezultat ko-imobilizacije enzima u alginatnim "kapsulama", dao je visok prinos imobilizacije aktivnosti od čak 71 % i što je još važnije, oba enzima zadržala su svoju aktivnost tokom 20 ponovljenih upotreba u šaržnom reaktoru. Novorazvijeni metod ko-imobilizacije dekstransaharaze i dekstranaze u alginatnim kapsulama predstavlja jednostavan ali efikasan metod koji ima veliku potencijalnu primenu za industrijsku proizvodnju oligosaharida (Ölçer & Tanriseven, 2010). Drugi naučnici (Alcalde et al., 1999; Kothari et al., 2012), su u reakcionu smešu dodavali maltozu, izomaltozu ili druge akceptorske



molekule, da bi se favorizovala reakcija sinteze oligosaharida u odnosu na reakciju sinteze dekstrana i na taj način sprečili razaranje polimernog matriksa koji je korišćen za imobilizaciju.

U oba slučaja, velika prednost ovog načina imobilizacije dekstransaharaze leži u jednostavnosti međusobnog odvajanja proizvoda, dekstrana od oligosaharida, pri čemu dekstran zahvaljujući svojoj veličini ostaje unutar zrna, dok oligosaharidi bivaju desorbovani u reakcionim medijum. Još jedna prednost leži u tome što alginatni matriks deluje kao zaštita biokatalizatora, što je i potvrđeno u brojnim radovima u kojima je polu-život dekstransaharaze imobilisane obuhvatanjem bio duži u poređenju sa polu-životom slobodne dekstransaharaze (Alcalde et al., 1999; Berensmeier et al., 2004; Dols-Lafargue, Willemot, Monsan, & Remaud-Simeon, 2001).

#### **2.5.4. Nove metode za imobilizaciju dekstransaharaze**

Da bi poboljšali neke parametre imobilizacije dekstransaharaze, kao što su katalitička aktivnost i tip proizvoda reakcije, nekoliko istraživačkih grupa koristilo se različitim metodama proteinskog inženjeringa (Fabre et al., 2005; Monchois, Remaud-Simeon, Russell, Monsan, & Willemot, 1997; Moulis et al., 2006). Ovakve strategije u kombinaciji sa različitim imobilizacionim tehnikama dale su dobre rezultate. Bioinženjerska studija u kojoj je kreirana nova dekstransaharaza udružena (fuzionisana) sa glutathion-S-transferazom (GST) omogućila je lakše formiranje kovalentne veze između ovog enzima i Eupergita C 250L (Parlak et al., 2013). Ovom modifikacijom uvedene su aminokiseline: 21 lizin, 18 asparaginskih kiselina, 16 glutaminskih kiselina i 4 cisteina. Rezultati ovih eksperimenata pokazali su koliko je značajna primena proteinskog inženjeringa, tačnije fuzije proteina, kao metode za poboljšanje imobilizacije enzima. U slučaju dekstransaharaze imobilisane na ovaj način prinos imobilizacije proteina je bio 100 % a prinos imobilizacije aktivnosti 83 %. Poređenja radi, pod optimalnim uslovima, imobilizacija dekstransaharaza bez GST imala je prinos imobilizacije proteina od 100 % ali samo 3 % prinos imobilizacije aktivnosti. Takođe, imobilisan enzim nije pokazao gubitak aktivnosti ni posle 15 uzastopnih ciklusa a zadržao je početnu aktivnost nakon skladištenja na 4 °C tokom 35 dana.

#### **2.5.5. Imobilizacija na nanonosače**

Intenzivna istraživanja na polju nanotehnologije dovela su do razvoja sintetičkih procedura koje mogu da obezbede nanomaterijale željenih osobina. Imobilizacija enzima je novo perspektivno polje za upotrebu nanomaterijala. Novija istraživanja ukazala su da imobilizacija enzima na nanomaterijale može da poboljša njegovu operativnu, termičku i pH stabilnost (J. Kim, Grate, & Wang, 2006). Za imobilizaciju enzima, esencijalne karakteristike nanočestica su veličina čestica, specifična površina i veličina pora. Porozni nanomaterijali obezbeđuju redukovane difuzione limitacije za supstrat i veliki kapacitet za vezivanje enzima po masi nosača zahvaljujući velikoj specifičnoj površini. Za uspešnu primenu poroznih nanomaterijala za imobilizaciju enzima jedan od najbitnijih zahteva je obezbediti neometanu difuziju supstrata/proizvoda u ili iz pora nanomaterijala (Garcia-Galan, Berenguer-Murcia, Fernandez-Lafuente, & Rodrigues, 2011). Imobilizacija enzima u pore nosača sprečava formiranje intermolekularnih interakcija (kao što su agregacija i proteoliza) i štiti enzim od izloženosti uticajima spoljne sredine (vazduh, kiseonik, organski rastvarači) koji mogu da izazovu neželjene konformacione promene u strukturi enzima a time i deaktivaciju (Betancor et al., 2005).

Magnetne i silika su nanočestice najčešće korišćeni nanomaterijali za imobilizaciju enzima (Banjanac, Mihailović, Prlainović, Ćorović, et al., 2016; Banjanac, Mihailović, Prlainović, Stojanović, et al., 2016; Gokhale, Lu, & Lee, 2013; M. Il Kim et al., 2006; Pashangeh, Akhond,

Karbalaei-Heidari, & Absalan, 2017). Nanočestice zlata, kalaj dioksida, cink dioksida i hitozana takođe su našle primenu kao matriksi za imobilizaciju enzima (Cipolatti et al., 2014; Graebin, Schöffner, et al., 2016).

U poređenju sa drugim nanomaterijalima,  $\text{TiO}_2$  poseduje antimikrobna svojstva (aktivnost), mehaničku snagu i visoku otpornost na koroziju (Mihailović et al., 2010; Milićević et al., 2015). Zahvaljujući tim karakteristikama, nanočestice  $\text{TiO}_2$  korišćene su kao odgovarajući nosač za imobilizaciju nekoliko različitih enzima (Bang et al., 2011; Ji, Nguyen, Hou, Hai, & Chen, 2017; Yang et al., 2014; Zhuang et al., 2017). Samo u radu Janga i saradnika (Yang et al., 2014) iskorišćena je prednost formiranja kompleksa sa prenosom naelektrisanja (CTC) između površine atoma Ti i liganda kateholat tipa (dopamina) za funkcionalizaciju  $\text{TiO}_2$  sa ciljem da se poveća sorpcioni kapacitet (kapacitet za vezivanje proteina) nosača za imobilizaciju enzima.

## CILJ RADA

Sagledavajući značaj enzimskih proizvoda dekstransaharaze u različitim granama prehrambene, hemijske i farmaceutske industrije, u ovoj doktorskoj disertaciji su postavljena 4 osnovna cilja.

1. Imajući u vidu da se pravilnom selekcijom, kombinovanjem i optimizacijom sastava hranljive podloge kao i uslova gajenja, mogu postići veći prinosi sintetisanog enzima, prvi cilj je bio ispitati i utvrditi optimalne uslove proizvodnje enzima dekstransaharaze pomoću novog bakterijskog soja *Lc. mesenteroides* T3. U okviru ovog cilja, posebno je bilo od interesa ispitati mogućnost korišćenja otpadnih sirovina agro-industrije (melase i izluženih repinih rezanaca iz proizvodnje šećera) za dobijanje enzima.

2. Da bi se sagledao potencijal primene dobijenog enzima, cilj je bio da se izvrši njegova karakterizacija, posebno sa aspekta uticaja pH, temperature i dodatka različitih jona.

3. Potencijal primene enzima u industriji, pored njegove katalitičke aktivnosti, uveliko je određen i njegovom stabilnošću. Jedan od načina stabilizacije enzima je imobilizacija na različite nosače. U tu svrhu, postavljen je cilj da se ispita mogućnost imobilizacije dekstransaharaze na nanočestice  $\text{TiO}_2$  (Degussa P25) kao i unutar agar-agar filmova uz određivanje proizvoda katalitičke aktivnosti imobilisanih enzima.

4. Kao poseban cilj, postavljeno je ispitivanje mogućnosti unapređenja imobilizacije dekstransaharaze primenom funkcionalizacije komercijalnih nanočestica  $\text{TiO}_2$  (Degussa P25) kako bi se dobili nosači povećanog kapaciteta za vezivanje dekstransaharaze.

### 3. EKSPERIMENTALNI DEO

#### 3.1. Materijali

U ovoj doktorskoj disertaciji tokom eksperimentalnog rada korišćen je sledeći mikroorganizam za proizvodnju enzima dekstransaharaze, *Lc. mesenteroides* T3, prirodni izolat iz zrna vodenog kefir (Davidović, Miljković, Antonović, et al., 2015) (Katedra za Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerzitet u Beogradu).

Kao komponente za pripremu hranljivih podloga za rast mikroorganizma i produkciju enzima korišćeni su:

- ✚ Komponente za mikrobiološke podloge:
  - Agar (Torlak, Beograd, Srbija)
  - Pepton (Torlak, Beograd, Srbija)
  - Kvašćev ekstrakt (Torlak, Beograd, Srbija)
  - Mesni ekstrakt (Torlak, Beograd, Srbija)

- ✚ Otpadne sirovine:
  - izlužen repin rezanac i
  - melasa

Korišćen je izlužen repin rezanac pod komercijalnim imenom Fibrex 620 (koji sadrži na 100 g: proteina 8,0 g; šećera 5,5 g; masti 1,0 g; vlakana 67g od kojih je hemiceluloza 42 %, celuloza 28 %, pektin 27 % i lignin 3 %; minerala 4,0 %.) (Nordic Sugar, Danska).

Melasa (sadržaj, ukupnih šećera 54,8 %; ukupni azot 1,48 %; masti 0,21 %; pepeo 11,33 %; suva materija 77,42 %) (Miljković et al., 2016) je dobijena iz fabrike etanola Alpis, Kovin, Srbija.

Za imobilizaciju enzima dekstransaharaze korišćeni su:

- ✚ Komercijalne nanočestice kao nosač za imobilizaciju enzima:
  - Degussa P-25 TiO<sub>2</sub> powder (Evonik Industries, Essen, Nemačka).
- ✚ Bifunkcionalni kuplujući agensi za modifikaciju nano-čestica TiO<sub>2</sub>:
  - (3-glicidiloksiopropil)trimetoksisilan (GOPTMS) proizvođača Fluka Analytical, SAD.
  - 5-amino salicylic acid (5-ASA) proizvođača Alfa Aesar, SAD.
  - Glutaraldehyd (GA) proizvođača Fluka Analytical, SAD.
- ✚ Pufferi:
  - Za pripremu rastvora dekstransaharaze korišćen je 20 mM natrijum-acetatni pufer pH 5,4. Pufer je pripremljen mešanjem rastvora glacijalne sirćetne kiseline CH<sub>3</sub>COOH i NaOH u odgovarajućoj razmeri. Kiselina CH<sub>3</sub>COOH proizvod je kompanije Zorka Pharm (Šabac, Srbija) a NaOH je proizvod kompanije Lach-Ner (Neratovice, Češka).
- ✚ Hemikalije i reagensi:
  - K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (E. Merck, Darmstadt, Nemačka)
  - MgSO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
  - MnSO<sub>4</sub> (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
  - Tween 80® (DIFCO®, BD, SAD)
  - Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Sigma Aldrich, St. Luis, SAD),
  - Kalijum, natrijum-tartarat (Lach-Ner, Neratovice, Češka),

- CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (Zorka Pharma, Šabac, Srbija),
  - Folinov reagens (ABCR GmbH & Co, Karlsruhe, Nemačka),
  - Coomassie briljantno plavo G-250 (Fluka analytical, SAD),
  - PEG-400 (Acros Organics, SAD)
  - H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Zorka Pharma, Šabac, Srbija),
  - Etanol (Zorka Pharma, Šabac, Srbija),
  - Natrijum-dodecil sulfat (SDS) (Sigma Aldrich, St. Luis, SAD),
  - Triton X-100 (Sigma Aldrich, St. Luis, SAD),
  - 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol (TRIS) (Sigma Aldrich, St. Luis, SAD),
  - Albumin iz goveđeg seruma (Sigma Aldrich, St. Luis, SAD),
  - Epihlorhidrin (Sigma Aldrich, St. Luis, SAD),
  - HBr (Zorka Pharma, Šabac, Srbija),
- ✚ Uređaji koji su korišćeni tokom eksperimentalnog rada:
- analitička vaga, Mettler (Mettler Toledo, Švajcarska),
  - tehnička vaga (Chyo Balance Corp., MP-3000)
  - autoklav (Sutjeska, Beograd)
  - termostat za rast mikroorganizama (Memmert, Nemačka)
  - centrifuga, (MiniSpin Eppendorf, SAD i Sigma® 2-16, Shropshire, Engleska)
  - vortex (REAX 7000, Heidolph, Schwabach, Nemačka)
  - Magnetna mešalica (IKA, SAD),
  - Roler mikser (IKA, SAD),
  - UV-spektrofotometar, Ultrospec™ 3300 pro, (Biochrom Ltd, Frajburg, Nemačka),
  - Vakuum sušnica (Binder Inc., Njujork, SAD),
  - Peristaltička pumpa, PLP 33, (behr Labor-Technik GmbH, Dizeldorf, Nemačka),
  - Aparatura za tečnu hromatografiju visokih performansi (HPLC, od engl. *High-performance liquid chromatography*) (Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific, Waltham, SAD),
  - Refraktometrijski detektor (RI ili RID, od engl. *Refractive Index Detector*) (RefractoMax 520, ERC, Riemerling, Nemačka)
  - Sušnica (Sutjeska, Srbija)
  - Skenirajući elektronski mikroskop (MIRA3 XMU, TESCAN, Češka Republika)
  - Termostat sa orbitalnim mešanjem, IKA KS 4000i (Control, Štaufen, Nemačka).
  - pH metar (inoLab pH 720, Nemačka)
  - Elektroforeza (Mini-Protean Tetra Cell, Biorad, Italija)

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Izolovanje sirovog enzima iz fermentacione podloge

U ispitivanjima proizvodnje enzima, kao inokulum je korišćena prekonoćna kultura bakterije *Lc. mesenteroides* T3, gajena u modifikovanoj MRS podlozi (10,0 g/L peptona, 10,0 g/L mesnog ekstrakta, 5,0 g/L kvašćevog ekstrakta, 2,0 g/L saharoza, 5,0 g/L natrijum acetata, 2,0 g/L amonijum citrata, 0,1 g/L magnezijum sulfata, 0,05 g/L mangan sulfata i 2,0 g/L di-kalijum hidrogenfosfata) u termostatu na 30 °C. Na osnovu preliminarnih eksperimenata utvrđeno je da je optimalna temperatura za proizvodnju mikrobne biomase za soj T3, 30 °C (Davidović, Miljković, Antonović, et al., 2015). Sve podloge koje su korišćene u eksperimentima su sterilisane u autoklavu pri temperaturi od 120 °C, u trajanju od 30 minuta, a zatim su inokulisane prekonoćnom radnom kulturom u procentu koji je definisan za dati eksperiment i inkubirane u termostatu na 23 °C (ili kako je naznačeno u pojedinačnom eksperimentu). Nakon inkubacije, vršeno je odvajanje ćelija mikroorganizma iz podloge centrifugiranjem uzorka na

6000 o/min u trajanju od 15 min. Dobijeni supernatant koji sadrži sirovi enzim je čuvan u frižideru i kao takav korišćen za određivanje enzimske aktivnosti.

### 3.2.2. Određivanje aktivnosti dekstransaharaze

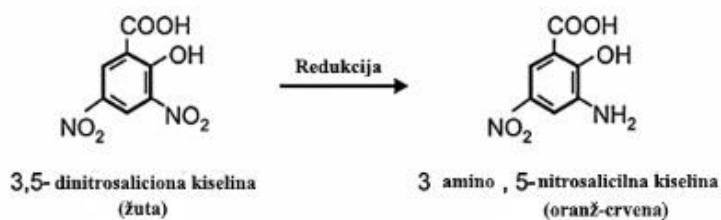
Aktivnost dekstransaharaze je određivana reakcijom redukcije 3,5-dinitrosalicilne kiseline (DNS) u prisustvu fruktoze koja se oslobađa enzimskom hidrolizom saharoze, metodom po Mileru (G. L. Miller, 1959). Dekstransaharaza hidrolizuje saharozu na glukozu i fruktozu, pri čemu molekule glukoze ugrađuje u rastući lanac molekula dekstrana dok oslobođena fruktoza reaguje sa DNS reagensom do formiranja obojenog kompleksa koji se detektuje spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 540 nm.

#### Reagensi:

10 % saharoza – 10,0 g saharoze je rastvoreno u 100 ml 0,02 M natrijum-acetatnog pufera pH 5,4.

0,02 M natrijum acetatni pufer pH 5,4 – 6 ml koncentrovane sirćetne kiseline i 3,125 g NaOH je rastvoreno u približno 500 ml destilovane vode, pH rastvora je podešen na 5,4, a zatim je rastvor prebačen u normalni sud od 500 ml i dopunjen destilovanom vodom do crte.

DNS rastvor – 5,0 g DNS je pomešano sa 8,0 g NaOH u 200 ml destilovane vode. Posebno je izmereno 150,0 g K, Na-tartarata i rastvoreno u 150 ml destilovane vode. U normalnom sudu od 500 ml oba rastvora su pomešana i dopunjena destilovanom vodom do crte. Reagens je profiltriran kroz filter papir.



Slika 3.1. Reakcija DNS reagensa sa fruktozom

Aktivnost dekstransaharaze određivana je u 20 mM natrijum-acetatnom puferu sa 10 % saharoze. Nakon 15 minuta reakcija je zaustavljena ekvimolarnom količinom DNS reagensa, i spektrofotometrijski na 540 nm je merena količina oslobođenog redukujućeg šećera (fruktoze). aktivnost enzima je izračunata korišćenjem jednačine (3.1.), a jedna internacionalna jedinica (IU) se definiše kao količina enzima koja katalizuje oslobađanje 1 μmol redukujućeg šećera u minutu pod definisanim uslovima.

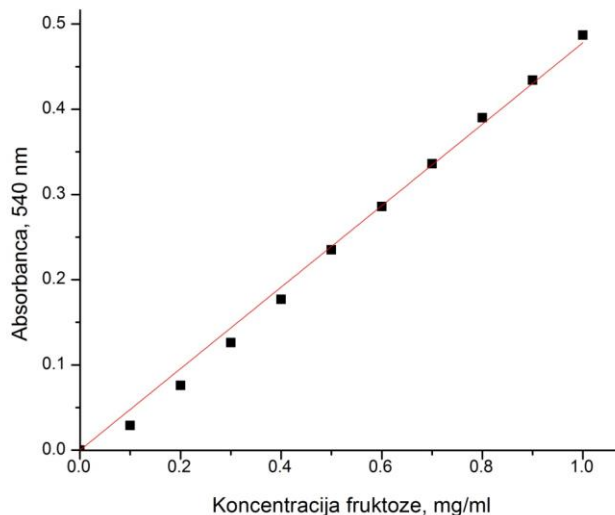
$$\text{Akt (IU/ml)} = \frac{n \times V_{rs}}{t \times V_e} \quad (3.1.)$$

gde je n količina oslobođene fruktoze (μmol), V<sub>rs</sub> zapremina reakcione smeše (ml), V<sub>e</sub> zapremina enzima (ml) i t vreme (min). Koncentracija oslobođene fruktoze određena je iz nagiba standardne prave za frukozu u opsegu koncentracija (0,1-1 mg/ml).

#### Određivanje standardne krive:

Napravljen je rastvor fruktoze koncentracije 2,0 mg/ml i odatle su napravljena razblaženja u opsegu od 0,1-1,0 mg/ml. U svaku epruvetu sipano je po 0,5 ml rastvora poznatih koncentracija a zatim je dodato po 0,5 ml DNS-a, nakon čega je smeša zagrevana na 95 °C na

vodenom kupatilu u trajanju od 5 minuta. Nakon hlađenja, u svaku epruvetu je dodato po 5 ml destilovane vode. ApSORBANCE su merene na spektrofotometru na talasnoj dužini  $\lambda=540$  nm i na osnovu dobijenih podataka konstruisana je standardna kriva za fruktozu. Standardna kriva za određivanje koncentracije redukujućih šećera, izraženih kao fruktoza, prikazana je na slici 5.1. Za crtanje grafika korišćen je softver OriginPro® v8.0.



Slika 3.2. Standardna kriva za određivanje koncentracije fruktoze

### 3.2.3. Određivanje koncentracije proteina metodom po Loriju

Koncentracija proteina u uzorcima određena je primenom metode po Loriju (Lowry et al., 1951): pomešano je 250  $\mu$ l ispitivanog uzorka, 1 ml reagensa D i dodavanjem 100  $\mu$ l reagensa F nakon 10 min, a merenja su vršena nakon 40 min spektrofotometrijski na 600 nm. Reagensi su pripremani na sledeći način:

Reagens A: 2 % rastvor natrijum-karbonata u natrijum-hidroksidu (0,1 mol/l).

Reagens B: 1 % rastvor bakar-sulfata u destilovanoj vodi.

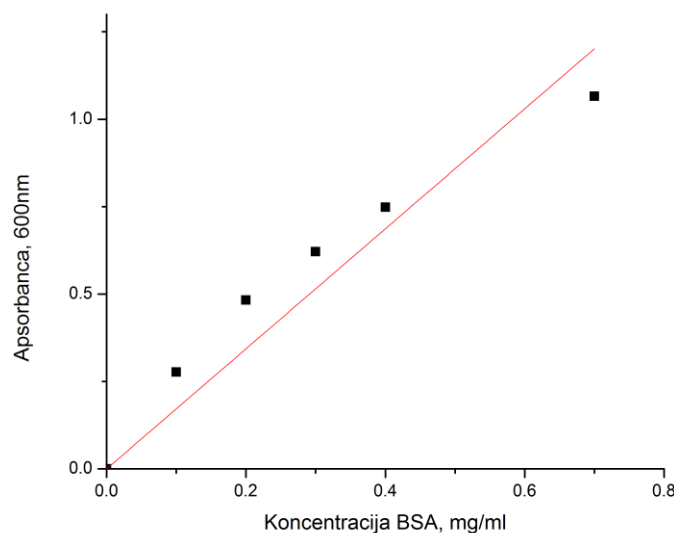
Reagens C: 2 % rasvor kalijum, natrijum-tartarata u destilovanoj vodi.

Reagens D: priprema se mešanjem 1 ml reagensa B i 1 ml reagensa C, a zatim se pomešani rastvori dopune reagensom A do 100 ml ukupne zapremine. Reagens D se priprema neposredno pred upotrebu.

Reagens F: Folin-Ciocalteu-ov reagens.

#### Određivanje standardne krive:

Standardna kriva je formirana za svaku novu količinu pripremljenih reagenasa, primenom albumina iz goveđeg seruma (BSA) (2 mg/ml) u opsegu koncentracija 0,1 - 1 mg/ml.



Slika 3.3. Standardna kriva za određivanje koncentracije proteina metodom po Loriju

Koncentracija proteina u uzorcima se računa prema jednačini:

$$C_{\text{proteina}} (\text{mg/ml}) = \frac{A(600\text{nm})}{k} \quad (3.2.)$$

gde je A (600 nm), apsorbanacija uzorka na talasnoj dužini od 600 nm, a k je nagib standardne krive.

### 3.2.4. Određivanje koncentracije šećera

Količina egzopolisaharida određivana je fenol-sumpornom metodom, a rezultati su izraženi preko koncentracije glukoze ( $\mu\text{g/ml}$ ) i preračunati na 1 l (g/l). Ova metoda se može koristiti i u slučajevima kada su uz šećer prisutni ostaci soli i proteina i u slučaju kada su šećeri zakačeni za polimer. Određivanje šećera se zasniva na merenju apsorbance obojenog aromatičnog kompleksa koji se formira između fenola i ugljenih hidrata, na 490 nm. Količina prisutnog šećera se određuje upoređivanjem sa standardnom krivom.

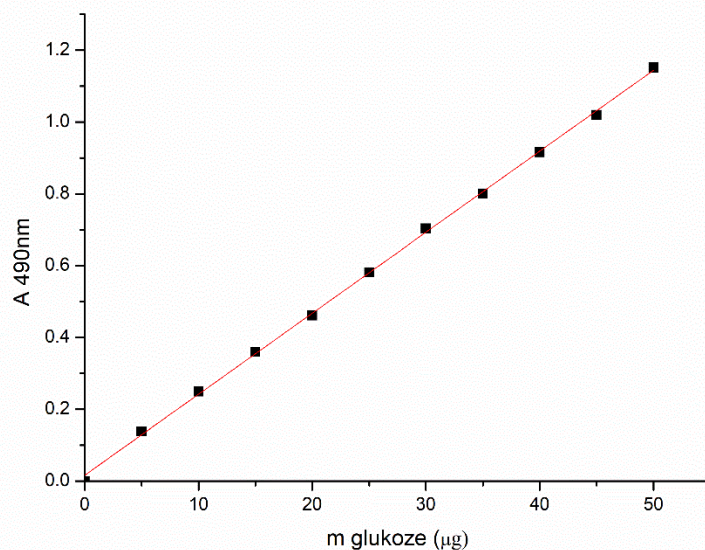
Potrebni reagensi:

- 4 % fenol: 40 g fenola rastvoriti u 1 l destilovane vode
- 96 % sumporna kiselina
- 1 mg/ml standardnog šećera (glukoza) u zatvorenim epruvetama

Određivanje standardne krive:

Kao slepa proba koristi se uzorak napravljen mešanjem 500  $\mu\text{l}$  4 % fenola i 2,5 ml 96 % sumporne kiseline. Standardna kriva se dobija merenjem apsorbance standardnog rastvora šećera, koncentracije 1 mg/ml. Uzorak se odgovarajućom pipetom raspoređuje u 10 različitih suvih epruveta, tako da se zapremina u svakoj narednoj epruveti povećava za 5  $\mu\text{l}$ , u opsegu od 5  $\mu\text{l}$  do 50  $\mu\text{l}$ , dodaje 500  $\mu\text{l}$  4 % fenola i 2,5 ml 96 % sumporne kiseline i meri na 490 nm. Dobijena standardna kriva je prikazana na slici 3.4.





Slika 3.4. Standardna kriva za određivanje mase ugljenih hidrata fenol-sumpornom metodom, standardizovano na glukozu

Izmeri se zapremina uzorka nepoznatog šećera koja se želi ispitati i prenese u epruvetu. Dodaje se 500 µl 4 % fenola i 2,5 ml 96 % sumporne kiseline i meri apsorbancu. Dobijene vrednosti apsorbance se ubacuju u dobijenu jednačinu standardne krive i izračunava koncentracija nepoznatog šećera prema jednačini 3.3

$$C_{\text{šećera}} = \frac{(A_{490nm})}{k} \quad (3.3.)$$

gde je A (490 nm), apsorbancu uzorka na talasnoj dužini od 490 nm a k je nagib standardne krive.

### 3.2.5. Proizvodnja dekstransharaze

Proizvodnja dekstransaharaze ispitana je u tečnim podlogama, sa komercijalnim supstratima i u podlogama obogaćenim otpadnim sirovinama.

#### 3.2.5.1. Proizvodnja dekstransaharaze u komercijalnim podlogama

Preliminarna proizvodnja dekstransaharaze ispitivana je u tečnoj podlozi definisanoj od strane Čučije i saradnika (Tsuchiya et al., 1952) koja je bila sledećeg sastava: kvašćev ekstrakt 20,0 g/L, saharoza 40,0 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20,0 g/L, MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O 0,1 g/L, MnSO<sub>4</sub>×4H<sub>2</sub>O 0,05 g/L, FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O 0.01g/L, CaCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O 0.01 g/L i NaCl 0.01g/L.

U cilju optimizacije produkcije dekstransaharaze ispitivan je uticaj sledećih faktora na proizvodnju enzima: uticaj faktora rasta mikroorganizma (temperature inkubacije i brzina mešanja), koncentracija optimalnog izvora ugljenika (saharoze) kao i uticaj različitih izvora azota i koncentracija optimalnog izvora azota.

Uticaj temperature na kojoj je gajena bakterija *Lc. mesenteroides* T3 na produkciju dekstransaharaze ispitivan je gajenjem mikroorganizma u termostatu na sledećim temperaturama: 17, 20, 23, 25, 27, 30, 33, 35 i 37 °C, u statičnim uslovima. Dekstransaharazna aktivnost određivana je u supernatantu nakon centrifugiranja, uzimanjem uzorka na svaka 4 h tokom 16 h fermentacije.

Uticaj aeracije ispitivan je na 90, 120, 150 i 180 obrtaja/minutu na temperaturi od 23 °C, za koju je prethodnim eksperimentom utvrđeno da je optimalna. Dekstransaharazna aktivnost je ispitivana uzimanjem uzorka na svaka 4 h tokom 16 h fermentacije.

Uticaj koncentracije različitih komponenata podloge kao što su saharoza i izvori azota (kvašćev ekstrakt, mesni ekstrakt i pepton) na produkciju dekstransaharaze ispitivan je menjanjem koncentracije jedne komponente, dok je koncentracija ostalih komponenata u Čučijinoj podlozi ostala nepromenjena. Koncentracija saharoze varirana je u opsegu koncentracije od 10,0 – 100,0 g/L, sa korakom od 10,0 g/L a izvori azota varirani su u opsegu koncentracija od 5,0 – 40,0 g/L. *Lc. mesenteroides* T3 gajen je na 23 °C, pri statičnim uslovima. Dekstransaharazna aktivnost ispitivana je uzimanjem uzorka na svaka 4 h tokom 16 h fermentacije.

### **3.2.5.3. Proizvodnja dekstransaharaze na otpadnom supstratu**

Izluženi repin rezanac, koji će u daljem tekstu biti označen kao SBP, (veličina zrna 500 µm–800 µm) korišćen je kao nosač za imobilizaciju ćelija *Lc. mesenteroides* T3 dok je melasa bila izvor ugljenika, vitamina i mineralnih materija. Pre dodavanja izluženog repinog rezanca u tečnu podlogu izvršen je alkalni pretretman NaOH sa ciljem da se odstrani lignin. Ekstrakcija NaOH izvedena je po modifikovanoj metodi Šarma i saradnika (Sharma, Mahajan, & Sharma, 2013), i takav izluženi repin rezanac u daljem tekstu biće označen kao SPB - NaOH. Ukratko, 20,0 g izluženog repinog rezanca potopljeno je u 2 % rastvor NaOH i ostavljeno 2 h na sobnoj temperaturi. Nakon toga, SBP ispiran je destilovanom vodom do neutralnog pH, autoklaviran na 121 °C u trajanju od 20 minuta i na kraju ostavljen preko noći u sušnici na 50 °C.

Eksperiment je izveden tako što je u podlozi koja je sadržala samo melasu prvo varirana koncentracija melase od 1,0 do 5,0 % (w/v). Efekat koncentracije SPB - NaOH i saharoze na produkciju dekstransaharaze praćen je menjanjem koncentracije jedne komponente dok je koncentracije melase bila fiksirana na optimalnih 2,5 %. Izluženi repin rezanac dodavan je u podlogu u opsegu koncentracija 0,5–3,0 % (w/v) sa korakom od 1,0 %, dok je saharoza dodavana u opsegu koncentracija 1,0–6,0 % (w/v) sa korakom 1,0 %. K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> je dodat u medijum kao puferišući agens u koncentraciji od 20 mM.

Ispitan je i uticaj koncentracije inokuluma na proizvodnju dekstransaharaze i to u opsegu 2,0–10,0 % sa korakom od 2 %. Svi eksperimenti izvedeni su u erlenmajerima od 50 ml, sa zapreminom fermentacionog bujona od 20 ml. Nakon sterilizacije u autoklavu 121 °C, u trajanju od 30 min, podloge su zasejane prekonoćnom bakterijskom kulturom *Lc. mesenteroides* T3 i inkubirane u termostatu na 23 °C u statičnim uslovima. Dekstransaharazna aktivnost je ispitivana uzimanjem uzorka na svaka 4 h tokom 16 h fermentacije.

### **3.2.6. Skenirajuća elektronska mikroskopija**

Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) je korišćena radi potvrde da je došlo do imobilizacije ćelija na/i unutar površine SBP - NaOH. Isprani uzorci imobilizata su 3 sata sušeni u vakuum sušnici, na temperaturi 25 °C u tankom sloju. Nakon sušenja uzorci su neparavani Au-Pd smešom pomoću raspršivača. Za mikroskopiranje je korišćen uređaj TESCAN Mira3 XMU na 20 kV.

### **3.2.7. Prečišćavanje enzima dekstransaharaze**

Dekstransaharaza je prečišćavana taloženjem bakterijskog supernatanta, prethodno oslobođenog od ćelija centrifugiranjem, dodatkom 25 % PEG 400 (Goyal & Katiyar, 1994; Purama & Goyal, 2008c). Nakon taloženja koje je trajalo 24 h na 4 °C smeša je centrifugirana 15 minuta na 10 000 rpm i 4 °C. Dobijeni talog rastvoren je u 20 mM natrijum acetatnom puferu (pH 5,4) i podvrgnut dijalizi korišćenjem creva sa veličinom pora od 10 kDa, da bi se udaljio

višak PEG-a i drugih nečistoća. Procedura taloženja, rastvaranja i dijalize ponovljena je još dva puta. Dobijenom delimično prečišćenom rastvoru dekstransaharaze određena je enzimaska aktivnost i koncentracija proteina, a za određene eksperimente i koncentracija šećera (dekstrana).

### **3.2.7.1. Određivanje molarne mase enzima i zimogramska analiza dekstransaharazne aktivnosti**

SDS – PAGE (natrijum dodecil sulfat poliakrilamid gel elektroforeza) je korišćena za određivanje molekulske mase enzima. Korišćen je 7,5 % razdvajajući i 4 % koncentrujući gel (Laemmli et al. 1970). Uzorci (supernatant oslobođen od ćelija i dekstransaharaza nakon prvog i drugog koraka prečišćavanja) su pripremljeni tako što je 50 µl uzorka rastvoreno u puferu za obradu uzoraka (sledećeg sastava: 0,0625 M 0,5 M Tris pufer pH 6,8, 10 % Glicerol, 2 % SDS, 0,002 % Brom fenil plavo, voda i 5 % β-merkaptetoetanol). Proteinske trake detektovane su bojenjem CBB-om (Coomassie Brilliant Blue).

Zimogramska analiza rađena je po metodi Holta i saradnika (Holt, Al-Sheikh, & Shin, 2001) sa modifikacijom koju su opisali Purama i Gojal (Purama & Goyal, 2008b). Uzorci proteina pripremljeni su na isti način kao i za denaturišuću SDS – PAGE, osim što je izostavljen korak sa β-merkaptetoetanolom i kuvanje uzoraka. Nakon elektroforeze (2 h, 100 V), gelovi se potapaju u 20 mM natrijum acetatni pufer (pH 5,4) koji sadrži 0,3 mM CaCl<sub>2</sub> i 0,1 % (w/v) Tween 80 na 30 °C u trajanju od 30 min u cilju uklanjanja SDS. Naredni korak traje 48 h i podrazumeva inkubaciju gelova na 30 °C u 20 mM natrijum acetatnom puferu (pH 5,4) sa saharozom (10 %, w/v), da bi se omogućilo formiranje dekstrana na onim mestima u gelu gde se nalazi enzim dekstransaharaza. Ovako tretiran gel je prvo ispran 75 %-tnim etanolom (40 min na sobnoj temperaturi), zatim rastvorom perjodatne kiseline (perjodatna kiselina, 1 %, w/v i sirćetna kiselina 3 %, w/v, u trajanju od 45 min na 30 °C) i na kraju 5 minuta na sobnoj temperature rastvorom koji sadrži 0,2 % (w/v) natrijum metabisulfita i 5 % (v/v) sirćetne kiseline. Nakon toga, ispran gel bojen je Šifovim reagensom (0.5 %, w/v Fuksin osnovni, 1 %, w/v natrijum bisulfat and 0.1 N HCl) do pojave obojenih traka, koje predstavljaju dokaz postojanja dekstransaharazne aktivnosti.

### **3.2.8. Karakterizacija dekstransaharaze**

Karakterizacija dekstransaharaze vršena je koristeći delimično prečišćen enzim, dobijen nakon taloženja PEG-om bakterijskog supernatanta prethodno oslobođenog od ćelija centrifugiranjem. Određena je temperaturna i pH stabilnost, temperaturni i pH optimum i ispitana je aktivnost enzima u prisustvu jona metala.

#### **3.2.8.1. Određivanje temperaturnog optimuma i temperaturne stabilnosti dobijenog enzima**

Da bi se odredio temperaturni optimum dobijenog enzima, primenjena je modifikacija prethodno opisane metode za određivanje aktivnosti dekstransaharaze. 10% rastvor saharoze u 20 mM natrijum-acetatnom puferu pH vrednosti 5,4 i enzim su inkubirani na ispitivanim temperaturama od 20 °C do 50 °C, u trajanju od 15 min a zatim je dodat DNS i reakcija je praćena spektrofotometrijski na već opisan način. U svrhu određivanja termičke stabilnosti enzima rastvori enzima inkubirani su na različitim temperaturama od 20 °C do 60 °C u trajanju od 30 minuta. Inaktivacija enzima praćena je merenjem zadržane aktivnosti.

#### **3.2.8.2. Određivanje pH optimuma i pH stabilnosti dobijenog enzima**

U cilju ispitivanja optimalnog pH, dekstransaharaza je inkubirana u trajanju od 30 min na temperaturi od 30 °C sa 10 % rastvorom (w/v) saharoze koji je pripreman u sledećim puferima: 0,1 M natrijum-acetatnom puferu (pH 3,5; 4,0; 4,2; 4,4; 4,6; 5,0; 5,2 i 5,4) i 0,1 M

natrijum-fosfatnom puferu (pH 5,6; 5,8; 6,0; 6,2 i 6,4). Dekstransaharazna aktivnost je određena na prethodno opisan način (poglavlje 3.2.2.) U cilju određivanja pH stabilnosti, 500  $\mu$ l delimično prečišćenog enzima inkubirano je u odgovarajućem puferu na 30 °C. Nakon 1h uziman je alikvot koji je inkubiran u 10 % rastvoru saharoze u natrijum-acetatnom puferu pH 5,4 i DNS metodom je praćena zadržana aktivnost enzima.

### **3.2.8.3. Ispitivanje aktivnosti enzima u prisustvu jona metala**

Da bi se odredio uticaj različitih jona metala ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  i EDTA) na aktivnost enzima, primenjena je modifikacija prethodno opisane metode za određivanje aktivnosti dekstransaharaze. Rastvor supstrata (saharozu) u odgovarajućem 0.02 M natrijum-acetatnom puferu, rastvor soli (hlorida ili sulfata) odgovarajuće koncentracije (od 1 mM do 10 mM) i enzim su odvojeno inkubirani na optimalnoj temperaturi, a zatim su pomešani i reakcija je praćena spektrofotometrijski na već opisan način. Rezultat je izražen u procentima kao zadržana aktivnost.

### **3.2.9. FTIR analiza molekula dekstrana**

Tip veza u molekulu dekstrana analiziran je FTIR spektroskopijom. FTIR spektri su dobijeni pomoću BOMEM (Hartmann & Braun) spektrofotometra na sobnoj temperaturi. Uzorak je usitnjen u avanu i pomešan sa 200 mg KBr. Dobijeni prah je potom stavljen u kalup i presovan pomoću hidraulične prese. Kao rezultat presovanja dobijena je tableta koja je potom analizirana. FTIR spektar je sniman između 400 and 4000  $\text{cm}^{-1}$  pri rezoluciji od 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### **3.2.10. Modifikacija nanočestica titandioksida**

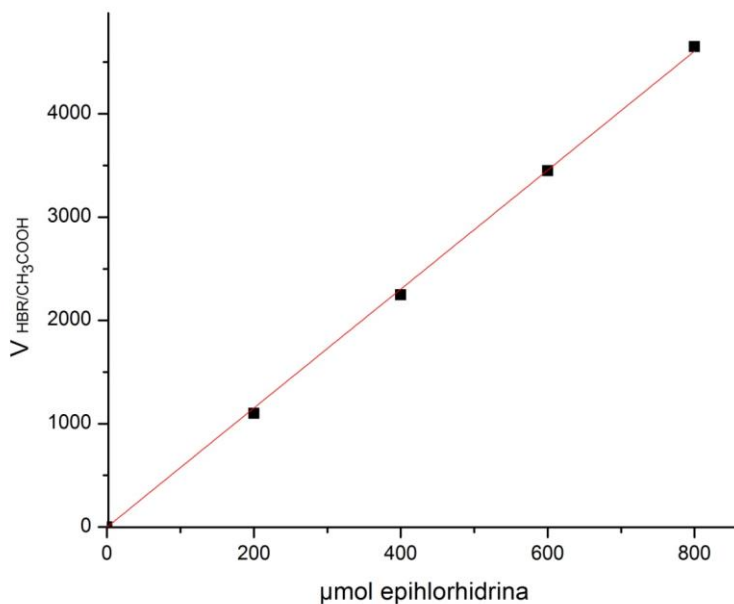
Modifikacija poroznih nanočestica titandioksida ( $\text{TiO}_2$ , Degusa P-25) rađena je sa dva različita jedinjenja: (3-glicidiloksipropil)trimetoksisilanom (GOPTMS) i 5-amino salicilnom kiselinom (5-ASA).

#### **3.2.10.1. Modifikacija GOPTMS-om ( $\text{TiO}_2$ /GOPTMS)**

U balon od 50 ml je stavljeno 300 mg čestica  $\text{TiO}_2$  i 1,2 ml 3-glicidiloksipropil)trimetoksisilan (GOPTMS) (maseni odnos između nanočestica i GOPTMS-a 1:2). Potom je dodato 36 ml anhidrovanog toluena, 50  $\mu$ l trietilamina i kontinuirano je dovođen azot tokom trajanja reakcije modifikacije. Reakcija modifikacije je izvođena na sobnoj temperaturi u trajanju od 1 h uz mešanje na magnetnoj mešalici pri brzini od 600 o/min, pri čemu je na svakih 15 min, balon u kome se nalazila reakciona smeša skidan sa aparature i ostavljan 5 min na ultrazvučnom kupatilu. Nakon završene modifikacije, modifikovane nanočestice  $\text{TiO}_2$ /GOPTMS su filtrirane, ispirane 3 puta sa po 5 ml toluena i podvrgnute ultrazvuku u trajanju od 5 min kako bi se uklonio neproreagovani GOPTMS. Ovako pripremljen nosač ostavljen je u vakum sušnici na 40 °C, 24 h.

#### **3.2.10.1.1. Određivanje koncentracije epoksi grupa na površini modifikovanih nanočestica $\text{TiO}_2$**

Epoksi-grupe nastale reakcijom modifikacije nosača  $\text{TiO}_2$  kvantifikovane su titracijom suspenzije nosača rastvorom HBr/ $\text{CH}_3\text{COOH}$  (6 ml 45% HBr u 250 ml sirćetne kiseline). Pre titracije napravljena je standardna kriva. U pet erlenmajera odmereno je po 20 mL benzenu i 10 mL glacialne sirćetne kiseline i u kiselinu je dodato nekoliko kapi 1% boje kristalviolet. Prvi erlenmajer je služio kao kontrola, dok je u ostala četiri dodata poznata količina epihlorhidrina (200 – 800 mol). Svi rastvori su titrisani do promene boje iz blede ljubičaste u zelenu (boja je bila stabilna 2 min). Zapremina utrošenog HBr je iskorišćena za konstruisanje standardne krive (slika 3.5.).



Slika 3.5. Standardna kriva za određivanje koncentracije uvedenih epoksi grupa na površinu nanočestica  $\text{TiO}_2$ .

Na isti način titrisani su i uzorci nosača, samo je umesto epihlorhidrina u rastvoru benzena i sirćetne kiseline resuspendovano 100 mg nosača. Količina epoksi grupa na površini nosača izračunata je na osnovu standardne krive i izražena kao  $\mu\text{mol/g}$  nosača.

### 3.2.10.2. Modifikacija 5-amino salicilnom kiselinom ( $\text{TiO}_2/5\text{-ASA}$ )

Za modifikaciju nanočestica  $\text{TiO}_2$  (Degussa P-25), odmereno je 100 mg nanočestica i rastvoreno u 20 ml dejonizovane vode u koju je dodato i 30,6 mg 5-ASA (molarni odnos između nanočestica  $\text{TiO}_2$  i 5-ASA je 6.25:1). Smeša je ostavljena preko noći na magnetnoj mešalici. Modifikovane čestice  $\text{TiO}_2$  odvojene su centrifugiranjem, isprane 4 puta destilovanom vodom i ostavljene da se osuše u vakuum sušnici na 40 °C (Milićević et al., 2015).

#### 3.2.10.2.1. Modifikacija $\text{TiO}_2/5\text{-ASA}$ nanočestica glutaraldehydom

Za aktivaciju modifikovanog nosača  $\text{TiO}_2/5\text{-ASA}$  monoslojem glutaraldehyda (GA) prema proceduri Bezbradice i saradnika (Bezbradica, Mateo, & Guisan, 2014), odmereno je 100 mg modifikovanih čestica u 1,12 ml 200 mM natrijum-fosfatnog pufera u koji je dodato 56  $\mu\text{L}$  25 % rastvora GA. Aktivacija se odvijala na rotacionoj mešalici na sobnoj temperaturi u trajanju od 1 h, a nakon toga uzorci su više puta isprani 20 mM natrijum-acetatnim puferom (pH 5,4) radi uklanjanja neizreagovanog GA.

### 3.2.11. Karakterizacija modifikovanih nanočestica $\text{TiO}_2$

#### 3.2.11.1. Numerički proračun

Za bliže definisanje formiranih kompleksa sa prenosom naelektrisanja između  $\text{TiO}_2$  i 5-ASA, korišćeni su DFT proračuni sa periodičnim uslovima vezivanja (PBC). Za sve kalkulacije korišćen je softver Gaussian 09 (Frisch, 2009), dok je za formiranje nanočestice  $\text{TiO}_2$  korišćen

Heyd-Scuseria-Ernzerhof klaster (HSE06) (Heyd, Scuseria, & Ernzerhof, 2003) zajedno sa Pople 6-31G(d,p) osnovnim setom (W. J. Hehre, Ditchfield, & Pople, 1972). Geometrijska optimizacija koordinata svih atoma unutar kristala je odrađena unutar ćelijske jedinice ( $7.57 \times 10.54 \text{ \AA}$ ), dok su konstante rešetke bile fiksirane. Ovi modeli su rađeni u beskonačnom vakuum prostoru duž z-ose. Za sve proračune je korišćena specifična ultrafina integraciona mreža. Ćelijske jedinice koje su korišćene za periodične kalkulacije konstruisane su na osnovu defekta slobodne kristalne strukture anataze  $\text{TiO}_2$  (101), za koji se veruje da učestvuje u stvaranju veza sa enzimom. Korišćenjem ovog modela, 5-ASA je vezana za površinu  $\text{TiO}_2$ , tako što se formira kompleks sa prenosom naelektrisanja (CTC).

### **3.2.12. Imobilizacija enzima**

#### **3.2.12.1. Imobilizacija dekstransaharaze na nanočestice $\text{TiO}_2$**

Imobilizacija dekstransaharaze na nemodifikovane ( $\text{TiO}_2$ ), amino-modifikovane ( $\text{TiO}_2/5\text{-ASA}$ ), GA aktivirane amino-modifikovane nanočestice ( $\text{TiO}_2/5\text{-ASA/GA}$ ) i epoksi-modifikovane nanočestice  $\text{TiO}_2$  ( $\text{TiO}_2/\text{GOPTMS}$ ) izvođena je pod istim uslovima nezavisno od toga koja nanočestica je korišćena. Početni rastvor dekstransaharaze dobijen nakon prečišćavanja supernatanta PEG-om sadržao je 0,16 mg/ml proteina i 1,5 mg/ml ugljenih hidrata u 20 mM natrijum acetatnom puferu pH 5,4. Za dobijanje dekstransaharaze upotrebljene u ovim eksperimenima korišćena je podloga iz poglavlja 3.2.5.1. sa malom izmenom. Da bi sintetisao enzim za koji je vezana što manja količina ugljenih hidrata (dekstrana) u podlogu je dodato 60 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  kao puferišuće supstance. Ova količina  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  je dovoljna da spreči pad pH vrednosti fermentacione podloge na vrednost pH 5,4, koja je optimalna za aktivnost enzima i samim tim sintezu dekstrana. Izolovanjem i prečišćavanjem dekstransaharaze iz ove podloge dobija se enzimski preparat sa značajno manjom (1,5 mg/ml naspram 40 mg/ml) količinom dekstrana vezanom za enzim, što omogućava njegovu dalju upotrebu za kovalentnu imobilizaciju bez dodatnih koraka prečišćavanja.

U endorficama je odmereno 5 mg nanočestica  $\text{TiO}_2$  i pomešano sa 500  $\mu\text{l}$  rastvora dekstransaharaze. Svi uzorci su inkubirani na 25 °C i sa mešanjem (13 000 o/min). Ispitana je kinetika imobilizacije tako što su pripremljeni uzorci uzimani nakon 0,25, 0,5, 0,75, 1, 3 i 5 h, za svaki od četiri nosača. Nakon isteka predviđenog vremena, uzorci su centrifugirani i uziman je uzorak supernatanta za određivanje zadržane aktivnosti dekstransaharaze. Izdvojeni imobilizat je ispiran 3 puta sa po 1 ml pufera koji je korišćen za imobilizaciju, zatim osušen u vakuum sušnici na 40 °C tokom 2 h i korišćen za ispitivanje aktivnosti suvog imobilizata.

#### **3.2.12.2. Imobilizacija dekstransaharaze zarobljavanjem u agarne filmove**

Početni rastvor dekstransaharaze dobijen nakon prečišćavanja supernatanta PEG-om sadržao je 0,16 mg/ml proteina i 40 mg/ml ugljenih hidrata i enzimsku aktivnost 4,6 IU/ml u 20 mM natrijum acetatnom puferu pH 5,4. Za dobijanje dekstransaharaze korišćene u ovim eksperimenima korišćena je podloga čiji je sastav dat u poglavlju 3.2.5.1. Zarobljavanje enzima započeto je mešanjem rastvora dekstransaharaze i rastvora agara u različitim odnosima (1:1, 1:4 i 1:9), pri čemu je finalna koncentracija agara u svim filmovima bila 2,0 %. Rastvor agara pripremljen je rastvaranjem definisanih koncentracija agara u destilovanoj vodi uz dodatak 30 masenih % glicerola (računato na masu agara) pri konstantnom mešanju na magnetnoj mešalici na temperature od 60 °C. Nakon toga rastvor agara je sterilisan u autoklavu na 121 °C, u trajanju od 20 min i pre mešanja sa enzimom ostavljen je da se ohladi do temperature od približno 40 °C. Nakon mešanja rastvora enzima i agara, smeša je izlivena u Petri kutije i ostavljena preko noći na sobnoj temperature da bi se filmovi osušili. Polimerni filmovi, bez (kontrola) i sa dodatkom dekstransaharaze su dalje analizirani tako što je određivan prinos imobilizacije aktivnosti, prinos dobijenih oligosaharida i mogućnost vraćanja u cikluse. Pre svakog eksperimenta svi

filmovi su po tri puta isprani dejonizovanom vodom a zatim i natrijum acetatnim puferom (pH 5,4). Svi eksperimenti rađeni su u triplikatu.

### 3.2.13. Određivanje aktivnosti imobilisanih enzima

Da bi se odredila koncentracija imobilisane aktivnosti dekstransaharaze, odmereno je 5 mg osušenog imobilizata i inkubirano u 500  $\mu$ l supstrata (10 % saharoza u 20 mM natrijum-acetatnom puferu pri pH 5.4). Reakcija je zaustavljena nakon 5 minuta sa 500  $\mu$ l DNS reaagensa, i merena je apsorbancija na 540 nm. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti tri merenja. Koncentracija imobilisane aktivnosti (IU/g nosača) računata je prema formuli:

$$\text{Akt (IU/g nosača)} = \frac{n \times V_{rs}}{t \times m_e} \quad (3.1.)$$

gde je *Akt*-koncentracija imobilisane aktivnosti (IU/g nosača), *V<sub>rs</sub>*-ukupna zapremina (ml), *m<sub>e</sub>*-masa suvog imobilizata (g), *n*-molovi fruktoze ( $\mu$ mol) *t*- vreme reakcije.

Specifična aktivnost imobilisanog enzima (IU/mg proteina) računata je po formuli:

$$\text{Specifična aktivnost (IU/mg proteina)} = \frac{\text{koncentracija imobilisane aktivnosti } \left(\frac{\text{IU}}{\text{g nosača}}\right)}{\text{koncentracija imobilisanog enzima } \left(\frac{\text{mg}}{\text{g nosača}}\right)}$$

Prinos imobilizacije aktivnosti je računat po formuli:

$$\text{Prinos imobilizacije aktivnosti (\%)} = \frac{\text{aktivnost slobodnog enzima } \left(\frac{\text{IU}}{\text{ml}}\right) * V_{rs} \text{ (ml)}}{\text{koncentracija imobilisane aktivnosti } \left(\frac{\text{IU}}{\text{g nosača}}\right) * m_e \text{ (g)}} \times 100$$

Prinos imobilizacije proteina (%) je računat po formuli:

$$\text{Prinos imobilizacije proteina (\%)} = \frac{\text{koncentracija imobilisanih proteina}}{\text{koncentracija unetih proteina}} \times 100$$

### 3.2.14. Određivanje termostabilnosti imobilisanih enzima

Da bi se odredila stabilnost imobilisanih enzima na povećanoj temperaturi pripremljeni su, po prethodno opisanim postupcima, odabrani imobilizati TiO<sub>2</sub>/5-ASA/GA i TiO<sub>2</sub>/GOPTMS u 20 mM natrijum-acetatnom puferu pH 5,4.

Za oba imobilizata je korišćena ista procedura:

U više ependorfa je odmereno po 5 mg imobilisanog enzima i suspendovano u 0,5 ml odgovarajućeg pufera. Ependorfi su potom stavljeni u termostatirano vodeno kupatilo na 40 °C. Uzorci su uzimani u određenim vremenskim intervalima, centrifugirani, isprani 3 puta sa po 1 ml pufera koji je korišćen za imobilizaciju, sa ciljem da im se odredi aktivnost.

Nakon hlađenja uzorka određena je aktivnost imobilizata pomoću DNS metode po prethodno definisanim metodama u poglavljima 3.2.13., a dobijeni rezultati predstavljeni su kao relativna aktivnost (procentualno u odnosu na aktivnost pre izlaganja povišenoj temperaturi).

### 3.2.15. Određivanje operativne stabilnosti imobilisanih enzima

Operativna stabilnost imobilisane dekstransaharaze na TiO<sub>2</sub>/5-ASA/GA i TiO<sub>2</sub>/GOPTMS je testirana DNS metodom. Tokom jednog ciklusa 5 mg imobilisanog enzima inkubirano je sa 0,5 ml 10% saharoze u 20 mM natrijum-acetatnom puferu pH vrednosti 5,4 u trajanju od 5

minuta. Nakon toga reakciona smeša je centrifugirana na 13000 o/min, u trajanju od 30 sekundi kako bi se reakcioni medijum odvojio od imobilisanog enzima. U odvojeni reakcioni medijum dodato je 0,5 ml DNS reagensa kako bi se zaustavila reakcija i aktivnost imobilisanog enzima je određivana na osnovu količine oslobođene fruktoze određene DNS metodom merenjem absorbance na 540 nm. Imobilisani enzim koji je odvojen od supernatanta je opran sa 2 ml natrijum acetatnog pufera pH 5,4 i potom korišćen u narednom ciklusu na isti način. Dobijena aktivnost imobilisanog enzima u svakom ciklusu je predstavljena kao relativna aktivnost u odnosu na početni (prvi) ciklus.

Operativna stabilnost imobilisane dekstransaharaze u agar filmovima rađena je takođe DNS metodom, u malo modifikovanim uslovima.

### **3.2.16. Mehaničke osobina agar-agar filmova sa imobilisanom dekstransaharazom**

Mehanička svojstva agar-agar filmova bez i sa imobilisanim enzimom (zatezna čvrstoća, izduženje pri kidanju i Jangov modul elastičnosti) određena su prema ASTM standardnoj metodi D882-10 (ASTM, 2010) na uređaju Instron M1185. Uzorci filma su isečeni u pravougaone trake dužine 50 mm i širine 5 mm. Brzina istezanja podešena je na 5 mm/min.

### **3.2.17. Sinteza oligosaharida pomoću imobilisane dekstransaharaze**

Reakcija sinteze oligosaharida je izvedena u erlenmajerima (50 ml) koji su stavljeni u tresilicu na 100 obrtaja u minuti i 30 °C tokom 24 h. Reakciona smeša se sastojala od rastvora saharoze i maltoze u molarnom odnosu (1:6) u 20 mM natrijum acetatnom puferu pH 5,4 i filmom sa imobilisanim enzimom. Prilikom izvođenja reakcije sa slobodnim enzimom njegova aktivnost je podešena da odgovara aktivnosti imobilisane dekstransaharaze (npr. 3,5 IU/ml). Uzorci su uzimani u određenim vremenskim intervalima i reakcija je prekidana zagrevanjem uzetih uzoraka na 100 °C tokom 5 minuta kako bi se inaktivirao enzim. Potom su uzorci razblaženi 10 puta dejonizovanom vodom, centrifugirani i analizirani pomoću HPLC-a. Paralelno, kontrolni uzorci bez enzima su pripremljeni i tretirani na isti način, i analizirani na HPLC uređaju.

### **3.2.18. HPLC analiza**

Analiza prethodno pripremljenih uzoraka, dobijenih u reakciji dekstransaharaze sa saharozom i akceptorskim molekulom (maltoza) je vršena na Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific HPLC uređaju. Za razdvajanje GLOS-a, kao i glukozida drugih šećera korišćene su kolone za šećere (Hyper REZ XP Carbohydrate Ca<sup>2+</sup>, 300 mm × 7.7 mm, 8 μm i Hypersil™ APS-2, 250 mm × 4 mm, 5μm) na 80 °C. Kao mobilna faza korišćena je dejonizovana voda sa protokom od 0,6 ml/min tokom analize. Detekcija proizvoda je vršena pomoću RI detektora (RefractoMax 520). Dobijeni podaci nakon merenja obrađeni su pomoću Chromeleon softvera.



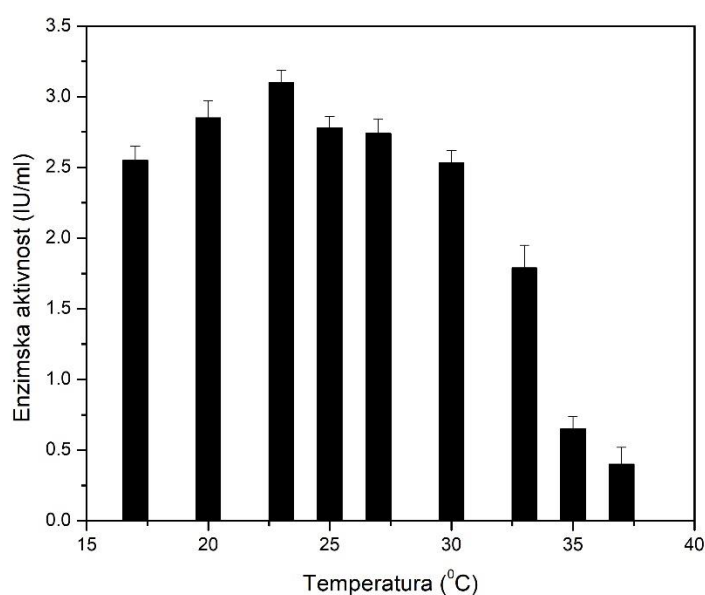
## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1. Proizvodnja dekstransaharaze u komercijalnoj podlozi

Za dobijanje maksimalne aktivnosti dekstransaharaze i samim tim najveće količine proizvoda, u istraživanjima su korišćene različite kombinacije faktora sredine i sastava podloge. Od faktora sredine koji utiču na proizvodnju enzima najviše su proučavani temperatura i uticaj aeracije, dok je iz sastava podloge najviše pažnje posvećeno izvoru ugljenika, tj saharozi i nešto manje različitim izvorima azota.

#### 4.1.1. Optimizacija uslova gajenja

Na proizvodnju dekstransaharaze veliki uticaj ima rast bakterijskih ćelija, pa samim tim i optimalni uslovi za njihov rast. Uzimajući to u obzir, temperatura inkubacije je jedan od najuticajnijih faktora. Ipak nije retkost da se optimalni uslovi za rast mikrobnog biomase ne poklapaju sa optimalnim uslovima za sintezu različitih ćelijskih sekundarnih metabolita, među koje spadaju i enzimi. Sa namerom da se utvrde optimalni uslovi za maksimalnu proizvodnju enzima dekstransaharaze pomoću soja *Lc. mesenteroides* T3, prvo je ispitan uticaj temperature gajenja mikroorganizma na produkovanu aktivnost dekstransaharaze (slika 4.1).



Slika 4.1. Uticaj temperature gajenja *Lc. mesenteroides* T3 na proizvodnju dekstransaharaze

Za soj T3, optimalna temperatura inkubacije za proizvodnju dekstransaharaze je 23 °C, jer odgovara maksimalnoj enzimskoj aktivnosti koje je iznosila  $3,10 \pm 0,09$  IU/ml (slika 4.1.). Na osnovu literaturnih podataka ovaj rezultat je očekivan i poklapa se sa rezultatim drugih autora za optimalne temperature za proizvodnju dekstransaharaze koje se kreću u opsegu od 23 do 25 °C (Cortezi et al., 2005; Goyal et al., 1995; Lopretti & Martinez, 2002; M. Santos et al., 2000) iako je optimum za proizvodnju dekstrana i fruktoze od 25 do 45 °C, pri čemu se maksimalna aktivnost dostiže na 30 °C.

Sa slike 4.1. se može videti da je dekstransaharazna aktivnost izmerena na ovoj temperaturi (23 °C) veća u poređenju sa aktivnostima dobijenim na ostalim testiranim temperaturama. Inkubacija na 37 °C dala je najmanju izmerenu aktivnost od samo  $0,40 \pm 0,12$

IU/ml, što je čak za 87 % niže nego na 23 °C. Ovaj rezultat je takođe u skladu sa rezultatima drugih autora (Cortezi et al., 2005; Goyal et al., 1995) i može biti objašnjen deaktivacijom enzima na višim temperaturama. Povećanjem temperature dolazi do termičke denaturacije enzima usled raskidanja veza koje čine nativnu konformaciju enzima (sekundarne, tercijarne i kvaternarne), što za posledicu ima gubitak njegove aktivnosti. Na 17 °C, najnižoj ispitanoj temperaturi inkubacije, enzimska aktivnost je za 18 % manja nego na 23 °C, što se može objasniti nešto sporijim metabolizmom bakterije na nižim temperaturama, pa samim tim i sporijom proizvodnjom enzima.

Opšte je poznato da je biosinteza dekstransaharaze usko povezana sa rastom bakterija (Tong, 1973), i stoga se može očekivati da na biosintezu ovog enzima može da utiče prenos mase kiseonika. U cilju utvrđivanja optimalnih uslova za maksimalnu proizvodnju dekstransaharaze pomoću *Lc. mesenteroides* T3, u narednim eksperimentima, ispitan je uticaj mešanja kao važnog procesnog parametra na produkovanu aktivnost dekstransaharaze (rezultati nisu prikazani). Čak i pri najmanjoj brzini mešanja (90 rpm) aktivnost je bila niža za 12 % ( $2,70 \pm 0,12$  IU/ml) od one izmerene pri statičnim uslovima gajenja. Imajući u vidu mikroaerofilnu prirodu mikroorganizma bolji prinos enzima kod kultura gajenih u stacionarnim uslovima nego na termostatiranoj tresilici je očekivan.

U istraživanjima Gojala (Goyal) i saradnika pokazano je da je za najbolju proizvodnju dekstransaharaze iz *Lc. mesenteroides* NRRL B 512 F ovu bakteriju potrebno gajiti u statičnim uslovima. Iako postoji veliki broj studija u kojima kiseonik pozitivno utiče na produkciju enzima, postoji i mnogo oprečnih rezultata o tome kako mešanje ili statični uslovi pri gajenju bakterije utiču na proizvodnju dekstransaharaze (E. J. Hehre, 1955; Koepsell & Tsuchiya, 1952; Tsuchiya et al., 1952). U jednom od najsistematičnijih istraživanja sprovedenog na ovu temu pokazano je da je gajenjem bakterija u statičnim uslovima dobijena za 30 % veća aktivnost dekstransaharaze (Goyal et al., 1995). Sa druge strane Veljković i saradnici istraživali su uticaj prenosa mase kiseonika na proizvodnju dekstransaharaze u biorektoru. Oni su pokazali da je u uslovima u kojima je brzina prenosa kiseonika u biorektoru jednaka maksimalnoj brzini potrošnje kiseonika od strane mikroorganizma, sinteza enzima dvostruko veća nego pri stacionarnim uslovima (Veljković et al., 1992).

#### 4.1.2. Optimizacija sastava podloge

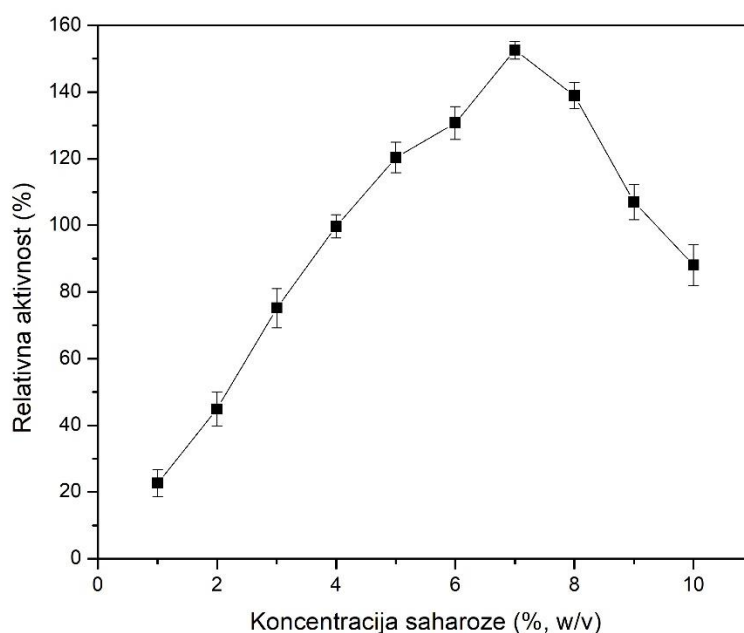
Poznato je da je su dekstransaharaze iz *Streptococcus* vrsta konstitutivni dok su oni iz *Leuconostoc* sp vrsta inducibilni enzimi. Svi *Lc. mesenteroides* sojevi kao jedini izvor ugljenih hidrata za produkciju dekstrana koriste saharozu. Drugi ugljeni hidrati, kao što su glukoza, fruktoza, manoza i laktoza mogu da utiču na rast mikroorganizama, ali uopšte ne podstiču proizvodnju dekstransaharaze i dekstrana. Ipak, postoje izuzeci tj. određeni mutantski sojevi koji mogu da proizvode enzim iako u podlozi kao izvor ugljenika sadrže samo glukoza (D. Kim & Robyt, 1994).

Takođe, zna se da transformacija izvora ugljenika od strane mikroorganizma nije odvojena funkcija metabolizma, već predstavlja samo deo ukupnog niza biohemijskih reakcija u kojima azot ima važnu ulogu (Lopretti & Martinez, 2002). Prema tome jako je važno ispitati kako i u kom odnosu različiti izvori azota utiču na produkovanu aktivnost enzima u ovom slučaju dekstransaharaze, što je pored optimizacije koncentracije saharoze bio i cilj u sledećem setu eksperimenata.

##### 4.1.2.1. Uticaj koncentracije saharoze na produkovanu aktivnost dekstransaharaze

Prilikom ispitivanja optimalne količine saharoze za proizvodnju dekstransaharaze iz *Lc. mesenteroides* T3, maksimalna enzimska aktivnost dekstransaharaze od  $4,71 \pm 0,13$  IU/ml dobijena je pri koncentraciji saharoze od 7 % (Slika 4.2.). Aktivnost dobijena za ovu vrednost koncentracije saharoze bila je statistički značajno veća ( $P < 0.05$ ) u poređenju sa aktivnostima

dobijenim za druge koncentracije. Dalje povećanje koncentracije saharoze dovodi do smanjenja proizvodnje enzima. Pri koncentraciji saharoze od 10 % enzimski aktivnost bila je za 70 % manja u odnosu na aktivnost pri koncentraciji saharoze od 7 %.



Slika 4.2. Aktivnost dekstransaharaze u podlozi za proizvodnju enzima sa različitim koncentracijama saharoze na 23 °C.

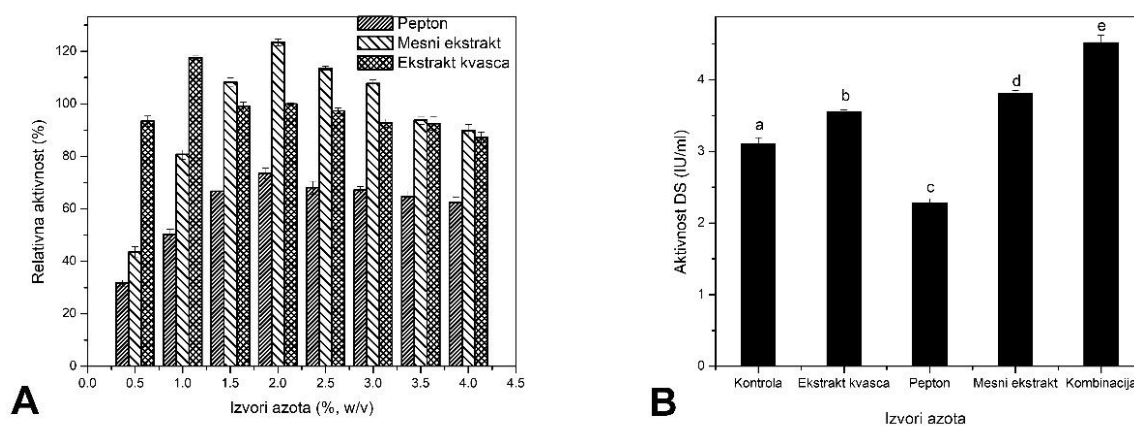
Kada se u podlogama za proizvodnju enzima koriste velike količine saharoze, povećana viskoznost medijuma usled sinteze dekstrana utiče na rast ćelija, što za posledicu ima i uticaj na produkciju enzima kao i na otežano odvajanje bakterijskih ćelija (Goyal & Katiyar, 1997; Tsuchiya et al., 1952). Samim tim otežana je i izolacija enzima iz ovakvog medijuma. Brojni autori, koji su se bavili ovim problemom, došli su do zaključka da niže koncentracije saharoze otklanjaju ove poteškoće bez negativnih uticaja na prinos dekstransaharaze. Čučija (Tsuchiya) je u svojim eksperimentima došao do zaključka da se u podlozi, pri koncentraciji saharoze od 2 % postiže najbolji balans između prinosa enzima i efikasnosti njegovog prečišćavanja (Tsuchiya et al., 1952). Drugi autori dobili su bolje rezultate sa nešto višom početnom koncentracijom saharoze u medijumu, 3 – 4 % (Cortezi et al., 2005), dok ima i radova u kojima je koncentracija saharoze bila 5 % i više procenata da bi se postigla maksimalna proizvodnja dekstransaharaze iz sojeva *Weissella confusa* Cab3 (S. Shukla & Goyal, 2011a) i *Lactobacillus plantarum* DM5 (Das & Goyal, 2014). Na osnovu svega navedenog, može se zaključiti da je rezultat za optimalnu koncentraciju saharoze od 7 % dobijen za soj T3 nešto viši od očekivanog. Problem koji su imali i drugi autori, javio se i u ovom slučaju, a to je određivanje dekstransaharazne aktivnosti nakon povećane viskoznosti medijuma usled sinteze dekstrana. Ovaj problem je prevaziđen dodatnim pufersanjem podloge dodatkom 60 g/L  $K_2HPO_4$ . Na ovaj način, pH vrednost podloge je održavana iznad 5,4 i pored produkcije mlečne kiseline tako da nije došlo do prekomerne sinteze dekstrana.

#### 4.1.2.2. Uticaj izvora azota na proizvodnju aktivnosti dekstransaharaze

Rezultati eksperimenata u kojima je ispitivan uticaj izvora azota na proizvodnju dekstransaharaze, prikazani na slici 4.3, pokazali su da na proizvodnju ovog enzima ima uticaj

kako vrsta tako i koncentracija izvora azota. Mesni ekstrakt, kao pojedinačni izvor azota, u koncentraciji od 2 % pokazao je najveći pozitivan efekat na proizvodnju dekstransaharaze. Dobijena aktivnost od  $3,81 \pm 0,04$  IU/ml, bila je čak za 15 % veća od aktivnosti u kontrolnom uzorku (2 % kvašćevog ekstrakta). Podloga koja je sadržala pepton, kao jedini izvor azota, imala je najnižu izmerenu vrednost enzimske aktivnosti ( $2,28 \pm 0,06$  IU/ml) u poređenju sa mesnim i kvašćevim ekstraktom. Aktivnost dekstransaharaze u podlozi koja je sadržala samo mesni ekstrakt kao izvor azota nije bila značajno veća od enzimske aktivnosti u podlozi koja je sadržala samo kvašćev ekstrakt.

Sa povećanjem koncentracije izvora azota iznad 2 %, primećen je mali pad enzimske aktivnosti za sva tri ispitivana izvora azota u podlozi, kada su korišćeni kao pojedinačni. Ipak, kada su korišćeni u kombinaciji, pri čemu je njihova ukupna koncentracija u podlozi prelazila 3 %, došlo je do povećanja proizvodnje dekstransaharaze.



Slika 4.3. A) Aktivnost dekstransaharaze proizvedene u podlozi sa različitim izvorima azota na 23 °C. B) Aktivnost dekstransaharaze u podlogama sa ekstraktom kvasca (1 %), peptonom (2 %) i mesnim ekstraktom (2 %) kao pojedinačnim izvorima azota u koncentracijama pri kojima su dali najveću aktivnost i kombinacija dva izvora azota koja je dala najveću aktivnost (sa 2 % mesnog ekstrakta i 1 % ekstrakta kvasca). Simboli koji imaju iste slovne oznake nisu statistički značajno različiti (Tuckey test,  $P < 0.05$ ).

Eksperimenti u kojima je ispitivan uticaj kombinacije različitih izvora azota na proizvodnju dekstranasaharaze izvedeni su tako što je u podlogu u kojoj je izmerena najveća aktivnost u prisustvu samo jednog izvora azota (2 % mesni ekstrakt) dodat ili kvašćev ekstrakt ili pepton u koncentraciji u kojoj su u pojedinačnim eksperimentima davali najveću enzimsku aktivnost. Podloga koja se sastojala od kombinacije 2 % peptona i 2 % mesnog ekstrakta imala je za 31 % veću aktivnost u odnosu na kontrolnu podlogu. Međutim najveća dobijena dekstransaharazna aktivnost izmerena je u podlozi koja je sadržala 2 % mesnog i 1 % kvašćevog ekstrakta (Slika 4.3. B). Ova podloga imala je aktivnost od  $4,52 \pm 0,10$  IU/ml što je čak za 47 % više nego u kontrolnoj podlozi i čak 19 % više nego u podlozi sa 2 % mesnog ekstrakta koja se pokazala kao najbolja prilikom testiranja pojedinačnih izvora azota (Slika 4.3. B). Ova kombinacija izvora azota imala je dekstransaharaznu aktivnost statistički značajno veću ( $P < 0,05$ ) u poređenju sa rezultatima dobijenim za enzimsku aktivnost u podlogama koje su sadržale pojedinačne izvore azota. Slični rezultati dobijeni su i za druge sojeve koji proizvode ovaj enzim. *Lc. mesenteroides* NRRL B-640 (Purama & Goyal, 2012), *Lc. mesenteroides* PCSIR-3 (Ul-Qader, Iqbal, Rizvi, & Zuberi, 2003) i *Lb. plantarum* DM5 (Das & Goyal, 2014) su pokazali veću proizvodnju enzima kada su se u podlogama nalazila dva izvora azota nego samo jedan.

Dobijeni rezultati za uticaj izvora azota na proizvodnju dekstransaharaze su u skladu sa očekivanim. Kako je bakterija iz koje je enzim izolovan, *Lc. mesenteroides* T3 poreklom iz zrna vodenog kefir, koje raste i razmnožava se u sredini koja je siromašna sa azotnim materijama,

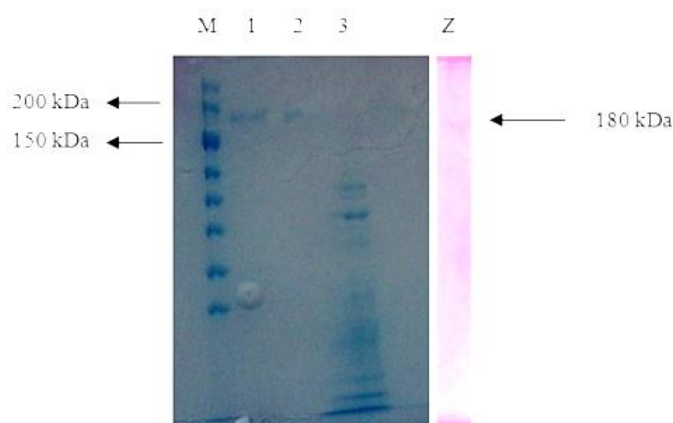
ovaj mikroorganizam je prilagodio svoj metabolizam ovakvim uslovima sredine. Samim tim, možemo da zaključimo da je za sintezu različitih metabolita dovoljna mala količina azotnih materija.

#### 4.1.3. Prečišćavanje dekstransaharaze polietilen glikolom (PEG) i određivanje molekulske mase enzima

Nakon pronalaženja optimalnih uslova za maksimalnu proizvodnju dekstransaharaze, prečistili smo dobijeni enzim u cilju detaljne karakterizacije i određivanja molekulske mase, to jest određivanja veličine molekula enzima. Kao metoda za prečišćavanje primenjena je tehnika taloženje PEG-om kao jedna od najviše korišćenih metoda za prečišćavanje dekstransaharaze (Goyal & Katiyar, 1994; Purama & Goyal, 2008c). Za taloženje je korišćen 25 % PEG 400, jer se u eksperimentima drugih autora pokazao kao selektivniji od polietilen glikola veće molekulske mase, tačnije zajedno sa enzimom staloži se manja količina molekula dekstrana i/ili drugih molekula (Purama & Goyal, 2008b). Rezultati koraka prečišćavanja prikazani su u tabeli 4.1., a elektroforegram na slici 4.4.

Tabela 4.1. Koraci prečišćavanja dekstransaharaze

Faza prečišćavanja	Aktivnost (IU)	Proteini (mg)	Sp.aktivnost (IU/mg prot)	Faktor prečišćavanja	Prinos (%)
<b>Sirov enzim</b>	160	280	0,56	1	100
<b>PEG 1.taloženje</b>	100	28	11,9	21	62,5
<b>PEG 2.taloženje</b>	85	4	16,7	30	53



Slika 4.4. Elektroforeza dekstransaharaze prečišćene taloženjem PEG-om i zimogram aktivnosti prečišćene dekstransaharaze: traka M - protein marker (od 60 kDa do 250 kDa), traka 1 - Prečišćena dekstransaharaza nakon dva koraka taloženja 25 % PEG-om 400 pri denaturišućim uslovima, traka 2 - Prečišćena dekstransaharaza nakon jednog koraka taloženja 25 % PEG-om 400 pri denaturišućim uslovima, traka 3- sirovi uzorak, Z - zimogram aktivnosti dekstransaharaze nakon dva koraka prečišćavanja 25 % PEG-om 400 na kome se pomoću PAS bojenja vidi formiranje glukana na saharozi kao supstratu.

Molarna masa prečišćene dekstransaharaze (25 % PEG 400), određena u denaturišućim uslovima korišćenjem 7,5 % (w/v) SDS poliakrilamidnog gela, pokazuje postojanje jedne

izoforme od otprilike 180 kDa kao što se vidi na elektroforegramu (Slika 4.4., traka 1 i 2). Prema literaturnim podacima dekstransaharaze iz BMK imaju molekulske mase od 120 do 200 kDa (Leemhuis et al., 2013).

U cilju određivanja *in situ* aktivnosti prečišćene dekstransaharaze rađena je i SDS elektroforeza u nenedenurišućim uslovima. Bojenje gelova radi utvrđivanja aktivnosti (PAS) nakon ove elektroforeze kao rezultat daje jednu traku koja je pokazivala aktivnost na 180 kDa kada je inkubacija rađena u rastvoru sa 10 % saharoze (Slika 4.4., traka Z).

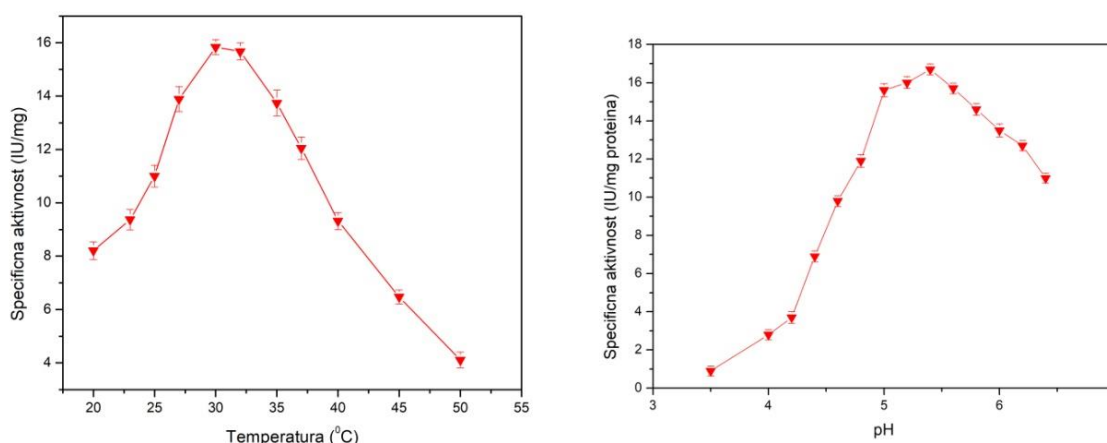
## 4.2. Karakterizacija dekstransaharaze

U okviru karakterizacije delimično prečišćene dekstransaharaze određene su optimalne vrednosti temperature i pH pri kojima je dekstransaharazna aktivnost najveća. Takođe ispitan je i opseg temperaturne i pH stabilnosti enzima. Nakon ovih eksperimenata ispitan je i uticaj dodatka različitih jona na aktivnost delimično prečišćene dekstransaharaze.

### 4.2.1. Određivanje optimalne temperature i optimalne pH vrednosti dekstransaharaza

Temperatura ima izražen uticaj na brzinu enzimskih reakcija. Prvo, može da ima uticaj na specifičnost enzima to jest da utiče na afinitet enzima ka supstratu. Isto tako, prekomernim povećanjem temperature dolazi do termalne denaturacije enzima usled raskidanja veza koje čine nativnu konformaciju enzima (sekundarne, tercijarne i kvaternarne), što za posledicu ima gubitak njegove aktivnosti (Knežević-Jugović, 2008).

Na slici 4.5. prikazan je temperaturni profil dekstransaharaze. Delimično prečišćena dekstransaharaza maksimalnu aktivnost ispoljila je u opsegu od 30 do 33 °C, i kao što se sa slike 4.5. može videti, nešto veću specifičnu aktivnost enzim ima na 30 °C. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa do sada objavljenim literaturnim podacima za optimalnu temperaturu dekstransaharaza iz BMK (25–45 °C). Kobajaši (Kobayashi) i Macuda (Matsuda) su kao optimalnu temperaturu za intracelularnu dekstransaharazu izolovanu iz *Lc. mesenteroides* NRRL B-1299 odredili 45 °C (Mukihiko Kobayashi & Matsuda, 1975). Ipak, do danas, 30 °C je temperatura koje se najčešće spominje od strane velikog broja autora kao optimalna za aktivnost dekstransaharaza iz drugih sojeva mlečnih bakterija (Erhardt, Kügler, Chakravarthula, & Jördening, 2008; Iliev et al., 2008; Kaboli & Reilly, 1980; Naessens et al., 2005; Purama & Goyal, 2008a).



Slika 4.5. Efekat temperature i pH na aktivnost dekstransaharaze.

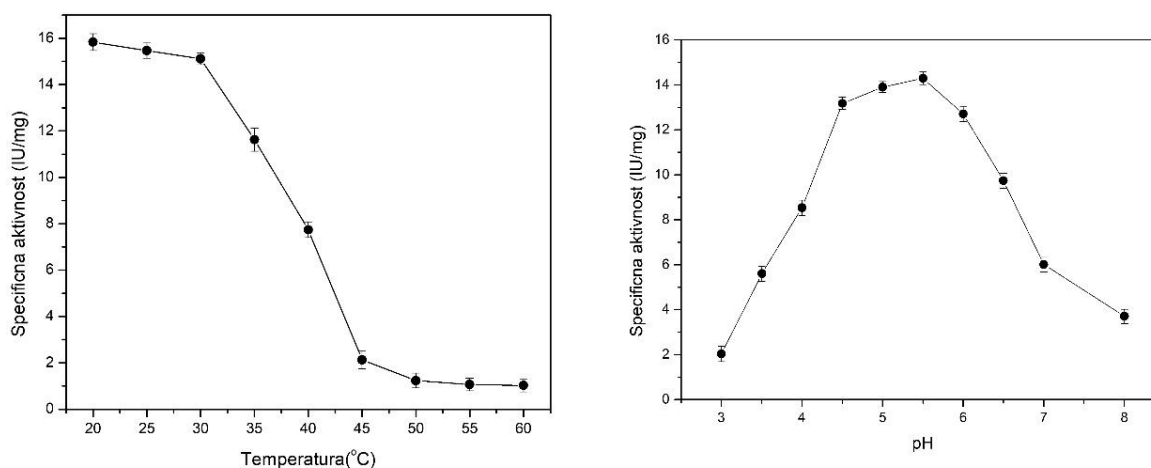
Kao i u slučaju temperature, pri ekstremnim pH vrednostima može doći do narušavanja native strukture enzima, koje se javlja kao posledica protonovanja, odnosno deprotonovanja

određenih jonizujućih grupa koje učestvuju u obrazovanju intramolekulskih veza u strukturi enzima, što dovodi do ireverzibilnog gubitka aktivnosti (Knežević-Jugović, 2008).

Kada govorimo o pH profilu dekstransaharaze, prema literaturnim podacima može se zaključiti da je ovaj enzim najstabilniji i najaktivniji u pH opsegu od 5,0 do 5,5. Na slici 4.5., na kojoj je prikazan pH profil delimično prečišćene dekstransaharaze iz soja *Lc. mesenteroides* T3, može se videti da je pH optimum ovog enzima 5,4. Kao i za temperaturni optimum, i vrednost dobijena za pH optimum je u korelaciji sa rezultatima koje su istraživači dobijali za glukansaharaze iz mlečnih bakterija kao što su na primer *Lc. mesenteroides* NRRL B-640 (Purama & Goyal, 2012), *W. confusa* Cab3 (S. Shukla & Goyal, 2011a) i *Lb. plantarum* DM5 (Das & Goyal, 2014).

#### 4.2.2. Određivanje temperaturne i pH stabilnosti

Sa slike 4.6. vidi se da je enzim stabilan u pH opsegu od 4,5 do 6,0, slično kao i glukansaharaze izolovane iz *L. dextranicum* NRRL B-1146 i *P. pentosaceus* SPA. Rezultati termičke stabilnosti za dekstransaharazu pokazuju da je enzim stabilan na temperaturama nižim od 30 °C dok se na temperaturama višim od 35 °C aktivnost naglo gubi, što je verovatno posledica denaturacije enzima.



Slika 4.6. Efekat temperature i pH na stabilnost dekstransaharaze.

#### 4.2.3. Stabilnost dekstransaharaze iz *Lc. mesenteroides* T3 u prisustvu različitih jona

Uticaj jona metala na aktivnost dekstransaharaze praćen je dodavanjem hlorida jona metala  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$  i sulfata jona metala  $\text{Mn}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{2+}$  u opsegu koncentracija od 1 mM do 10 mM.

Metalni joni  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Co}^{2+}$  u niskim koncentracijama izazvali su samo marginalno povećanje aktivnosti dekstransaharaze dok je dodatak jona  $\text{Mn}^{2+}$  imao mnogo značajniji efekat na povećanje enzimske aktivnosti, što se može videti iz Tabele 4.2. Blago povećanje dekstransaharazne aktivnosti dodatkom divalentnih jona primećeno je i drugim studijama (Das & Goyal, 2014; Majumder, Mangtani, & Goyal, 2008; Purama, Agrawal, & Goyal, 2010). Ovaj efekat na enzim postiže se zahvaljujući stabilizujućem efektu dvovalentnih jona na terciarnu strukturu enzima (Majumder et al., 2008; A. W. Miller & Robyt, 1984).

Tabela 4.2. Efekat jona metala na aktivnost delimično prečišćene dekstransaharaze iz *Lc. mesenteroides* T3

Soli	Zadržana aktivnost (%) <sup>a</sup>			
	Maksimum	Koncentracija jona	Minimum	Koncentracija jona
CaCl <sub>2</sub>	106,2 ± 2,1	(1mM)	67,2 ± 1,4	(9mM)
MgCl <sub>2</sub>	108,1 ± 1,1	(1mM)	85,3 ± 1,6	(10mM)
CoCl <sub>2</sub>	112,1 ± 1,1	(1mM)	67,4 ± 1,6	(10mM)
MnSO <sub>4</sub>	172,9 ± 2,1	(4mM)	125,7 ± 1,2	(10mM)
FeSO <sub>4</sub>	112,3 ± 1,3	(1mM)	38,9 ± 1,2	(9mM)
FeCl <sub>3</sub>	98,0 ± 1,2	(1mM)	7,9 ± 1,0	(5mM)
EDTA	83,8 ± 0,9	(1mM)	46,2 ± 0,8	(9mM)

Dodatak jona Mn<sup>2+</sup> u celom opsegu testiranih koncentracija ima značajan aktivacioni efekat na ispitivanu dekstransaharazu. Najveća izmerena enzimaska aktivnost bila je za 73 % veća od aktivnosti enzima u odsustvu jona (kontrola) a postignuta je pri koncentraciji jona od 4 mM MnSO<sub>4</sub>. Dalje povećanje koncentracije Mn<sup>2+</sup> ima nešto manje pozitivan efekat ali čak i pri koncentraciji od 10 mM nije imao inhibitorski efekat na aktivnost dekstransaharaze. Ovi rezultati ukazuju na jedinstvenost dekstransaharaze iz soja *Lc. mesenteroides* T3 zbog toga što prema rezultatima mnogih autora Mn<sup>2+</sup> ima negativan efekat na enzimsku aktivnost (Das & Goyal, 2014; Mikihiro Kobayashi & Matsuda, 1976; Majumder et al., 2008). Prema literaturnim podacima, postoji samo još jedan soj kod koga je pokazano da Mn<sup>2+</sup> ima pozitivan efekat na aktivnost dekstransaharaze tokom proizvodnje enzima. Naime, Majumder i Gojal (Majumder & Goyal, 2008) su u svom radu pokazali da dodatak Mn<sup>2+</sup> jona u minimalnoj koncentraciji soli od 1 mM u fermentacioni medijum, ima pozitivan efekat na produkciju dekstransaharaze kod soja *Lc. mesenteroides* CGMCC 1.544. Sa druge strane, ne postoje literaturni podaci o pozitivnom uticaju ovog jona na aktivnost izdvojenog enzima.

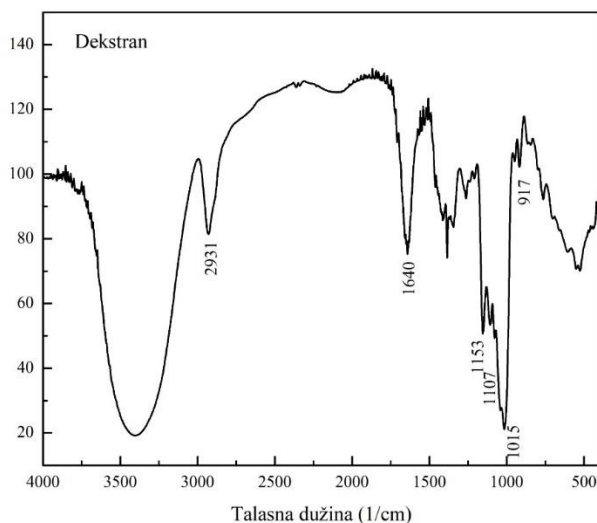
Od svih ispitivanih jona, samo Fe<sup>3+</sup> su imali inhibitorski efekat na aktivnost dekstransaharaze za sve testirane koncentracije, dok je pri koncentraciji od 5 mM došlo do kompletnog gubitka enzimске aktivnosti. Kobajaši i Macuda (Mikihiro Kobayashi & Matsuda, 1976) i Majumder sa saradnicima (Majumder & Goyal, 2008) su primetili isti negativan efekat Fe<sup>3+</sup> na aktivnost dekstransaharaze.

EDTA je pri svim testiranim koncentracijama pokazao denaturišući efekat na dekstransaharazu, pri čemu je pri koncentraciji od 9 mM EDTA aktivnost enzima opala za 54 %. Sličan rezultat o uticaju EDTA na aktivnost enzima zabeležen je i za glukansaharazu izolovanu iz soja *Lactobacillus plantarum* DM5 (Das & Goyal, 2014).



### 4.3. Karakterizacija proizvoda dekstransaharaze

#### 4.3.1. FTIR analiza molekula polisaharida



Slika 4.7. FTIR spektar molekula dekstrana

U cilju potvrde da je sintetisani glukozni dekstran snimljen je FTIR spektar (Slika 4.7.). Intenzivna i široka traka u oblasti  $3200\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$  potiče od valencionih vibracija O-H grupe (R. Shukla et al., 2011). Pik na  $2931\text{ cm}^{-1}$  je posledica valencionih vibracija C-H grupe, karakterističnih za molekul polisaharida (Ahmed, Siddiqui, Arman, & Ahmed, 2012; Davidović, Miljković, Lazić, et al., 2015). Široki signal koji potiče od C-O-C i C-O veze u opsegu od  $1000$  do  $1200\text{ cm}^{-1}$ , takođe predstavlja karakterističan signal za ugljene hidrate (Bremer & Geesey, 1991). Signal na  $1153\text{ cm}^{-1}$  potiče od valencionih vibracija C-O-C veze i glikozidne veze dok signal na  $1107\text{ cm}^{-1}$  predstavlja C-O vezu na C-4 atomu molekula glukoze (Han et al., 2014; Shingel, 2002). Intenzivan pik koji se vidi na spektru na  $1015\text{ cm}^{-1}$  nastaje kao posledica velike fleksibilnosti prisutne u molekulu dekstrana koja nastaje zahvaljujući  $(1\rightarrow6)$  glikozidnoj vezi (Ahmed et al., 2012; Azmeera, Adhikary, & Krishnamoorthi, 2012). Na kraju, potvrdu da su u molekulu dekstrana monomerne jedinice vezane  $\alpha$ -glikozidnom vezom, predstavlja signal na  $917\text{ cm}^{-1}$  (Han et al., 2014; Shingel, 2002).

Na osnovu prikazanih rezultata FTIR spektra zaključeno je da glukozna saharza koju sintetiše bakterija *Lc. mesenteroides* T3 proizvodi polisaharid  $\alpha$ -glukoze u kome su monomerne jedinice povezane  $(1\rightarrow6)$  glikozidnom vezom, to jest dekstran. Shodno tome i enzim je identifikovan kao dekstransaharaza.

Struktura dekstrana dodatno je potvrđena NMR spektroskopijom a podaci su prikazani u radu (Davidović et al., 2018).

Nakon karakterizacije enzima i određivanja temperaturne i pH stabilnosti, kao i stabilnosti u prisustvu različitih jona metala, u nastavku eksperimentalnog rada ispitana je mogućnost proizvodnje dekstransaharaze na otpadnom supstratu.

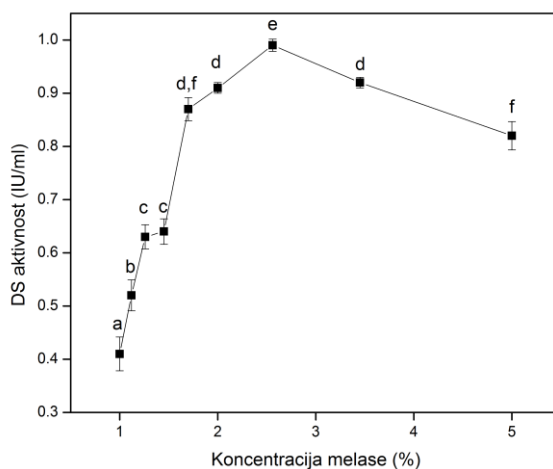
#### 4.4. Fermentacija i proizvodnja dekstransaharaze na otpadnom supstratu

Različiti otpadni materijali, uključujući i melasu, korišćeni su kao izvor ugljenika za proizvodnju dekstransaharaze (Abedin, El-Borai, Abo Shall, & El-Assar, 2013; Queiroz & Maugerio Filho, 1989). Činjenica da je bogata saharozom, melasu kao otpadni supstrat čini

jeftinom alternativom (komercijalnim šećerima) za dodatak podlozi koja se koristi za sintezu dekstransaharaze. U ovom eksperimentu za proizvodnju dekstransaharaze, korišćeni su melasa kao glavna komponenta podloge i izluženi repin rezanac kao nosač za imobilizaciju ćelija *Lc. mesenteroides* T3.

Velike količine ukupnih šećera u melasi čine je pogodnim izvorom ugljenika i samim tim i pogodnim supstratom za rast mikroorganizama. Posebno činjenica da oko 40-55 % šećera u melasi (Nigam & Vogel, 1991; Razmovski & Vučurović, 2012) čini saharoza, kao dominantan šećer, predstavlja logičan izbor za korišćenje melase kao glavne komponente podloge za proizvodnju dekstransaharaze. Melasa je već korišćena za sintezu dekstransaharaze u laboratorijskim istraživanjima (Abedin et al., 2013; Vettori, de Lima, Blanco, Cortezi, & Contiero, 2012). Takođe, pored šećera melasa sadrži i azotne materije, pa tako kada se razblaži do željene koncentracije suve materije, melasa i samostalno može da predstavlja dovoljan izvor hranljivih materija za rast bakterije *Lc. mesenteroides* T3. Ovo je potpuno u saglasnosti sa sredinom iz koje je ovaj soj izolovan a to je zrno vodenog kefir. BMK iz zrna vodenog kefir žive i razmnožavaju se u okolini koja je siromašna u sadržaju azotnih materija, tako da su ove bakterije prilagodile svoj metabolizam ovakvim uslovima sredine.

Da bi se pronašla optimalna koncentracija melase za proizvodnju dekstransaharaze, napravljena su različita razblaženja fermentacionog medijuma. Najveća aktivnost dekstransaharaze od  $0,99 \pm 0,01$  IU/ml dobijena je u podlozi u kojoj je koncentracija melase bila 2,5 % (w/v) (Slika 4.8.). Enzimska aktivnost dobijena sa ovom koncentracijom melase bila je statistički značajno veća ( $P < 0,05$ ) u poređenju sa aktivnostima dobijenim za ostala razblaženja melase. U svim narednim eksperimentima koncentracija melase držana je fiksno na 2,5 % dok su koncentracije ostalih komponenata varirane.



Slika 4.8. Aktivnost dekstransaharaze dobijena inkubacijom bakterije *Lc. mesenteroides* T3 u podlozi sa različitim koncentracijama melase. \*Na grafiku su predstavljene srednje vrednosti tri nezavisna merenja  $\pm$  standardna devijacija. Simboli (oznake) koji imaju ista slova znače da se vrednosti međusobno statistički značajno ne razlikuju (Tukey test,  $P < 0.05$ ).

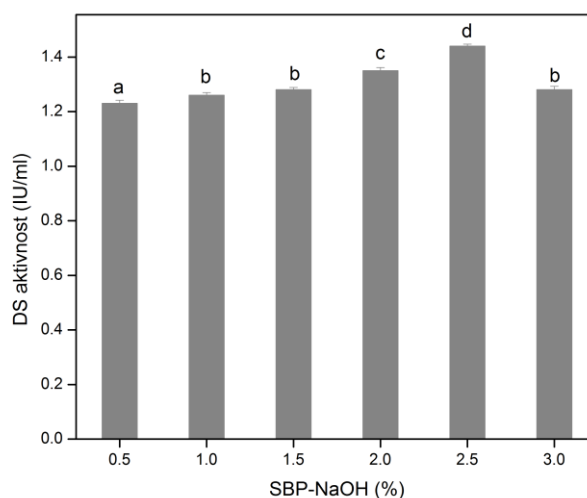
#### 4.4.1. Uticaj koncentracije izluženog repinog rezanca kao nosača za imobilizaciju ćelija *Lc. mesenteroides* T3

U ovom eksperimentu ispitivan je uticaj izluženog repinog rezanca (SBP) na proizvodnju dekstransaharaze pomoću soja *Lc. mesenteroides* T3 u podlozi sa melasom. Korišćena su dva oblika izluženog repinog rezanca: netretiran (SPB-N) i tretiran natrijum-hidroksidom (SPB-NaOH).

Tabela 4.3. Uticaj vrste izluženog repinog rezanca na proizvodnju dekstransaharaze

Podloga	Melasa	SBP-N	SBP-NaOH
DS aktivnost	0,97 ± 0,013	0,91 ± 0,019	1,26 ± 0,027

Maksimalna enzimaska aktivnost od  $1,26 \pm 0,02$  IU/ml dobijena je u podlozi koja je sadržala 1 % SBP-NaOH i melase. Ova dekstransaharazna aktivnost je za skoro 30 % veća u odnosu na izmerenu maksimalnu aktivnost u podlozi koja je sadržala samo melasu, dok je u podlozi sa 1 % SBP-N i melasom enzimaska aktivnost bila najniža (Tabela 4.3.).



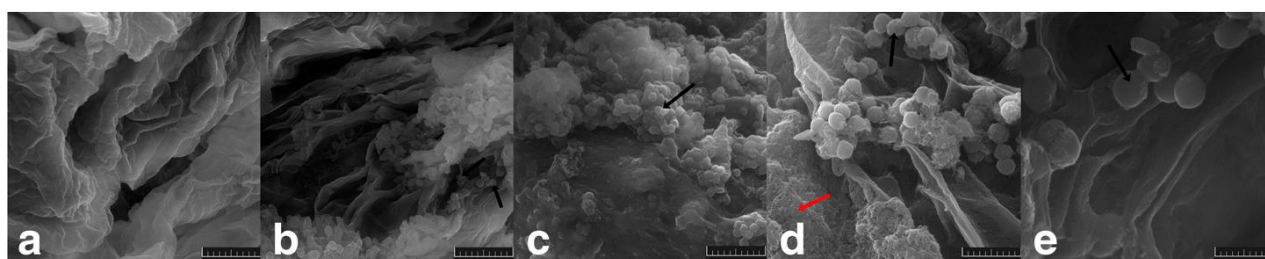
Slika 4.9. Aktivnost dekstransaharaze dobijenom inkubacijom bakterije *Lc. mesenteroides* T3 u podlozi sa različitim koncentracijama izluženog repinog rezanca koji je prošao alkalni pretretman (SBP-NaOH). \*Na grafiku su predstavljene srednje vrednosti tri nezavisna merenja ± standardna devijacija. Simboli (oznake) koji imaju ista slova znače da se vrednosti međusobno statistički značajno ne razlikuju (Tukey test,  $P < 0.05$ ).

Alkalni pretretman izluženog repinog rezanca ima pozitivan uticaj na proizvodnju dekstransaharaze. Najveća enzimaska aktivnost iznosila je  $1,42 \pm 0,01$  IU/ml (Slika 4.9.) pri koncentraciji od 2,5 % SBP-NaOH. Ova dekstransaharazna aktivnost bila je čak za 44 % veća u poređenju sa podlogom koja se sastojala samo od melase. Do povećanja aktivnosti dekstransaharaze dodatkom SBP-NaOH, najverovatnije dolazi usled povećanja koncentracije bakterijske biomase u fermentacionom medijumu, kao posledice imobilizacije bakterijskih ćelija na SBP, prema već poznatom fenomenu za druge mikrobnе vrste (Djukić-Vuković, Mojović, Jokić, Nikolić, & Pejin, 2012; Razmovski & Vučurović, 2012). Na SEM mikrografijama vide se razlike u površini repinog rezanca pre i posle fermentacije, sa akcentom na veoma hrapavu i poroznu površinu SBP-NaOH (Slika 4.10.a). Ovako rasprostranjene šupljine i udubljenja su pogodna površina za imobilizaciju bakterijskih ćelija, a da je do imobilizacije došlo može se videti na mikrografijama SEM-a (Slika 4.10. b–e). Ako se produži vreme fermentacije, pH vrednost opada na vrednost optimalnu za sintezu dekstrana tako da sintetisani enzim konvertuje višak saharoze u dekstran, koji ostaje u blizini bakterijskih ćelija kao neka vrsta zaštite (Slika 4.10. d) (Barker & Ajongwen, 1991).

Izluženi repin rezanac je i ranije korišćen kao nosač za imobilizaciju ćelija. Na ovom nosaču uspešno je imobilisan kvasac *Saccharomyces cerevisiae* radi poboljšanja uslova za

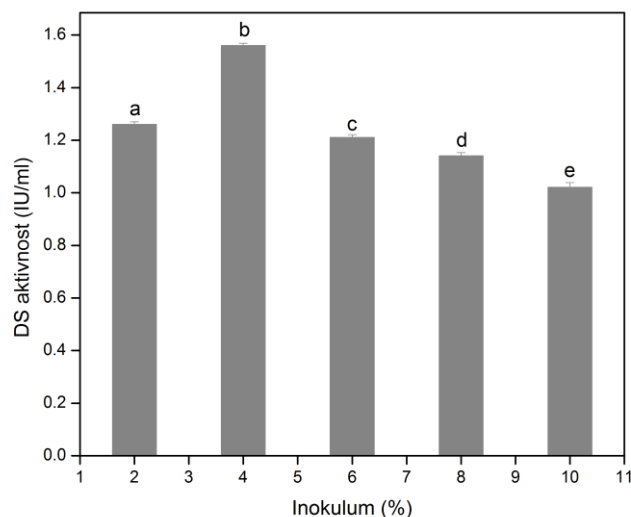
produkciju bioetanolu kao i bakterija *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1 za proizvodnju enzima  $\beta$ -amilaze (Mihajlovski et al., 2016; V. M. Vučurović & Razmovski, 2012a). Ova studija je prva o imobilizaciji ćelija bakterije *Lc. mesenteroides* na SBP. Prethodne sprovedene studije odnosile su se na prednosti imobilizacije ćelija *Lc. mesenteroides* u alginatne ili akrilamidne nosače radi proizvodnje dekstrana i GLOS-a (Qader et al., 2011). Glavnu prednost korišćenja SBP za imobilizaciju ćelija predstavlja njegova cena i dostupnost, a ne treba zaboraviti ni ekološku stranu korišćenja ovog nosača.

U zavisnosti od pH vrednosti okoline u kojoj se nalazi SBP, na njegovoj površini se mogu nalaziti i pozitivno i negativno naelektrisana mesta za vezivanje (V. M. Vučurović & Razmovski, 2012a). Tokom bakterijske fermentacije pH vrednost podloge opada zbog sinteze mlečne kiseline od strane bakterije *Lc. mesenteroides* T3, što konsekvantno dovodi do povećanja pozitivno naelektrisane površine na SBP, a kao rezultat dolazi do boljeg vezivanja bakterijskih ćelija za ovaj nosač. Prirodna adhezija ćelija *Lc. mesenteroides* T3 na SBP nosač je jeftin i jako jednostavan metod imobilizacije koji omogućava veliku gustinu bakterijskih ćelija u fermentacionom sistemu za proizvodnju enzima dekstransaharaze.



Slika 4.10. Skenirajuća elektronska mikrofografija izluženog repinog rezanca predhodno tretiranog natrijum hidroksidom: a) pre fermentacije ( $\times 10,000$ ), b) i c) ćelije *Lc. mesenteroides* T3 (crna strelica) imobilisane na površinu i unutar šuplina ( $\times 10,000$ ), d) sa dekstranom (crvena strelica) ( $\times 25,000$ ), i e) ( $\times 50,000$ ).

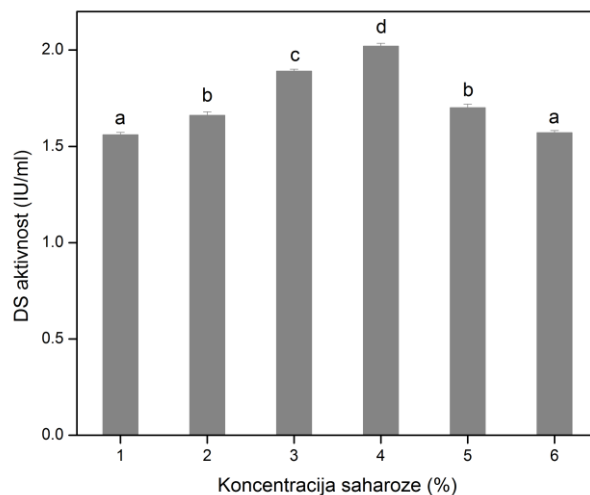
Ispitivanjem efekata koncentracije inokuluma na proizvodnju dekstransaharaze dobijeno je da je prekonoćna bakterijska kultura koncentracije 4 % dala maksimalnu enzimsku aktivnost (Slika 4.11.). Dobijena dekstransaharazna aktivnost od  $1,56 \pm 0,01$  IU/ml pri koncentraciji inokuluma od 4 % statistički je značajno veća ( $P < 0,05$ ) u poređenju sa aktivnostima dobijenim pri drugim koncentracijama inokuluma. Ova koncentracija inokuluma dala je za 53 % veću enzimsku aktivnost, u poređenju sa koncentracijom inokuluma od 10 % (Slika 4.19). Ovakav rezultat može se objasniti intenzivnom proizvodnjom dekstrana zbog veće koncentracije bakterijskih ćelija, što može znatno da utiče na tačnost određivanja enzimske aktivnosti (Purama & Goyal, 2008d; M. Santos et al., 2000). Korišćenjem velike koncentracije inokuluma, pH vrednost fermentacionog medijuma brže opada usled proizvodnje mlečne kiseline koja nastaje tokom bakterijskog rasta. Kada pH vrednost podloge opadne na optimalnu vrednost za maksimalnu aktivnost enzima, sintetisani enzim koji bakterija izlučuje direktno u fermentacionu tečnost koristi saharozu iz podloge i za kratko vreme proizvede veliku količinu dekstrana.



Slika 4.11. Aktivnost dekstransaharaze dobijena inkubacijom sa različitim koncentracijama inokuluma bakterije *Lc. mesenteroides*. \*Na grafiku su predstavljene srednje vrednosti tri nezavisna merenja  $\pm$  standardna devijacija. Simboli (oznake) koji imaju ista slova znače da se vrednosti međusobno statistički značajno ne razlikuju (Tukey test,  $P < 0.05$ ).

#### 4.4.2. Efekat koncentracije saharoze

Saharoza kao glavni supstrat za proizvodnju dekstransaharaze dodata je u fermentacionu podlogu i na taj način maksimalna aktivnost enzima povećana je na vrednost od  $2,02 \pm 0,02$  IU/ml. Konačni sastav optimalne podloge za proizvodnju dekstransaharaze od nusproizvoda agro-industrije je 2,5 % melase, 2,5 % SBP-NaOH i 4 % saharoze. Dobijena enzimaska aktivnost nakon dodatka saharoze u podlogu bila je za 42 % veća nego u istoj podlozi bez saharoze. Melasa sama po sebi sadrži velike količine saharoze ali i drugih šećera i jona metala. Da bi se smanjila koncentracija ovih šećera ali i ostalih supstanci koje mogu imati inhibitorski efekat na rast bakterija, melasa mora da se razblaži bar deset puta. Varirajući koncentraciju melase, najveća aktivnost dekstransaharaze a u isto vreme i najbolji kompromis između dovoljne koncentracije saharoze i niske koncentracije inhibitorskih supstanci postignuta je pri razblaženju melase od 40 %. Ipak, dodatna suplementacija saharoze može dodatno da poveća proizvodnju dekstransaharaze pokazujući na taj način da za optimalnu proizvodnju ovog enzima samo deo potrebne saharoze može da se obezbedi iz melase. Kada se melasa razblaži na koncentraciju od 2,5 %, sadržaj saharoze je oko 1 %. To je dovoljna koncentracija za indukciju sinteze dekstransaharaze. Povećanje koncentracije saharoze dovodi do povećanja proizvodnje dekstransaharaze (Slika 4.12.). Maksimalna dekstransaharazna aktivnost dobijena je dodatkom 4 % saharoze, čime je ukupno postignuto oko 5 % saharoze u fermentacionom medijumu. Aktivnost dekstransaharaze dobijena dodatkom 4 % saharoze bila je statistički značajno veća od aktivnosti dobijene dodatkom drugih koncentracija ovog šećera ( $P < 0,05$ ). Slična koncentracija saharoze pokazala se kao optimalna za sintezu dekstransaharaze poreklom iz drugih vrsta koje sintetisju dekstran kao što su *Weissella confusa* Cab3 (S. Shukla & Goyal, 2011b) i *Lactobacillus plantarum* DM5 (Das & Goyal, 2014). Dalje povećanje koncentracije saharoze u fermentacionoj podlozi dovelo je do smanjenja proizvodnje dekstransaharaze. Das i Goyal su ovaj fenomen objasnili činjenicom da se pri visokim koncentracijama saharoze stvara prekomerna količina molekula dekstrana, koji ostaje vezan za dekstransaharazu i na taj način ometa tačno određivanje aktivnosti ovog enzima (Das & Goyal, 2014).



Slika 4.12. Aktivnost dekstransaharaze dobijene pri različitim koncentracijama saharoze u podlozi. \*Na grafiku su predstavljene srednje vrednosti tri nezavisna merenja  $\pm$  standardna devijacija. Simboli (oznake) koji imaju ista slova znače da se vrednosti međusobno statistički značajno ne razlikuju (Tukey test,  $P < 0.05$ ).

Prema podacima dostupnim u literaturi, koncentracija saharoze u melasi može da varira (40 do 55 % od ukupnih šećera). Imajući ovo na umu, može se pretpostaviti da ako je melasa izuzetno bogata saharozom, količina saharoze koja se treba dodati u podlogu da bi se postigla maksimalna proizvodnja dekstransaharaze može biti i niža nego u ovoj studiji. Proizvodnja dekstransaharaze iz BMK na otpadnim supstratima proučavana je od strane malog broja naučnika, a rezultati dobijeni u ovim istraživanjima teško su uporedivi zbog različitog načina izražavanja enzimske aktivnosti. Takođe, u velikom broju eksperimenata meri se samo koncentracija sintetisanog dekstrana, bez kvantifikacije aktivnosti dekstransaharaze (Behravan, Fazly Bazzaz, & Salimi, 2003; M. Santos, Rodrigues, & Teixeira, 2005; Vedyashkina, Revin, & Gogotov, 2005).

Različiti otpadni materijali korišćeni su za proizvodnju i povećanje dekstransaharazne aktivnosti. Soj *Lc. mesenteroides* FT 045B, na primer, pokazuje maksimalnu aktivnost nakon 24 sata fermentacije na podlozi koja sadrži melasu i tečnu kukuruznu sladovinu kao izvor azota (Vettori et al., 2012). Visoka aktivnost dekstransaharaze od 7 UDS/10  $\mu$ l (UDS jedinica aktivnosti dekstransaharaze po  $\mu$ l) zabeležena je i kada je soj *Lc. mesenteroides* NRRL B512F gajen na podlozi koja se sastojala od pulpe, koja kao otpadni materijal zaostaje nakon prerade indijskog oraha, uz dodatak 50 g/L saharoze i 20 g/L kvašćevog ekstrakta (Chagas, Honorato, Pinto, Maia, & Rodrigues, 2007). Sa druge strane, niska dekstransaharazna aktivnost od samo 4,3 U/mL/h zabeležena je od strane Abedina i sardnika kada su gajili soj *Lactobacillus acidophilus* ST76480.01 na podlozi koja je sadržala samo melasu, u cilju proizvodnje dekstransaharaze (Abedin et al., 2013).

Objašnjenje za relativno nizak rezultat aktivnosti dekstransaharaze od 2,02 IU/mL dobijene gajenjem soja *Lc. mesenteroides* T3 na novoj podlozi sastavljenoj od nus proizvoda iz agro-industrije može biti posledica limitiranih potencijala samog soja za bolju proizvodnju ovog enzima.



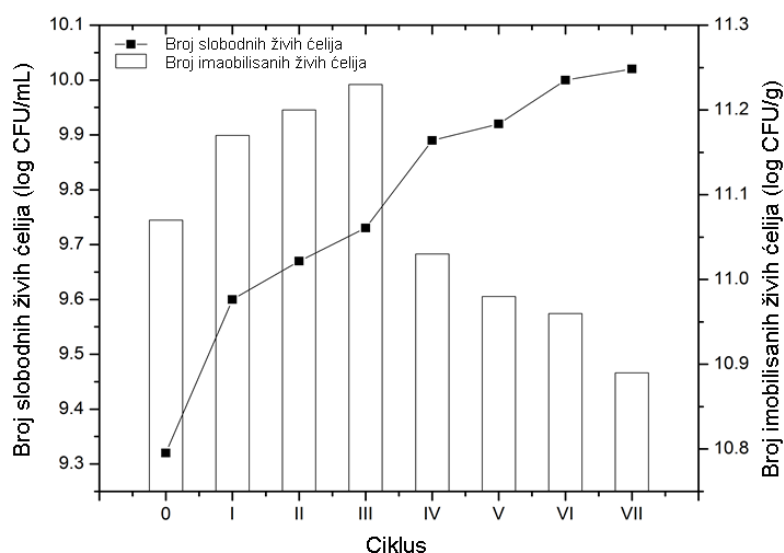
#### 4.4.3. Imobilizacija ćelija soja *Lc. mesenteroides* T3 na SBP-NaOH u cilju višestruke upotrebe za kontinualnu proizvodnju dekstransaharaze

Rezultati proizvodnje dekstransaharaze u nekoliko ponovljenih ciklusa fermentacije bakterije *Lc. mesenteroides* T3 imobilisane na SBP-NaOH pokazuju da nakon četiri uzastopna ciklusa sa imobilisanim ćelijama proizvodnja enzima opadne za 60 % (Tabela 4.4.).

Tabela 4.4. Dekstransaharazna aktivnost supernatanta dobijena inkubacijom *Lc. mesenteroides* T3 na SBP-NaOH u sedam ponovljenih ciklusa

Ciklusi	I	II	III	IV	V	VI	VII
DS akt. (IU/ml)	1,31±0,04 <sup>a</sup>	1,07± 0,02 <sup>b</sup>	0,78 ± 0,04 <sup>c</sup>	0,59±0,03 <sup>d</sup>	0,29±0,02 <sup>e</sup>	0,28±0,03 <sup>e</sup>	0,14±0,01 <sup>f</sup>

Nakon prvog ciklusa zadržana enzimaska aktivnost je čak 82 %. Nakon četvrtog ciklusa proizvodnja dekstransaharaze opadne na 40 %, dok je na kraju petog, šestog i sedmog ciklusa zadržana enzimaska aktivnost 22 % za peti, 21 % za šesti i svega 11 % za sedmi ciklus (Tabela 4.4.). Broj preživelih ćelija bakterija na kraju trećeg ciklusa iznosio je više od  $10^{11}$  CFU/g ali je nakon četvrtog ciklusa zabeležen pad kolonizacije nosača, to jest SBP-NaOH. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da je nagli pad enzimske aktivnosti nakon četvrtog ciklusa posledica desorpcije bakterija sa nosača (Slika 4.13.). Još jedan razlog pada aktivnosti dekstransaharaze nakon više uzastopnih ciklusa, može biti i posledica starenja bakterijske kulture, metaboličkih promena i primene u imobilisanom sistemu (Djukić-Vuković et al., 2012).



Slika 4.13. Broj živih ćelija soja *Lc. mesenteroides* T3 tokom fermentacije i vraćanja u cikluse. Oznake: puna linija - broj slobodnih živih ćelija soja *Lc. mesenteroides* T3 (izraženih kao log CFU mL<sup>-1</sup> izražen na fermentacioni medium); stubići – broj živih bakterijskih ćelija soja *Lc. mesenteroides* T3 imobilisanih na izluženom repinom rezancu (izraženo kao log CFU g<sup>-1</sup> na izluženom repinom rezancu kao nosaču)

Na osnovu prikazanih rezultata evidentno je da je rast bakterija *Lc. mesenteroides* T3 bio intenzivan tokom tri ciklusa što ukazuje na veoma dobru stabilnost celog sistema, čime je zadovoljena najvažnija premisa za višestruku upotrebu imobilisanih ćelija (biomase). Imobilizacija ćelija, pre svega, omogućava lako odvajanje ćelija od fermentacione podloge a samim tim i proizvoda koji nastaju tokom fermentacije što dalje omogućava lakšu manipulaciju i njihovu višestruku upotrebu (Djukić-Vuković et al., 2012). Na kraju, adsorpcija mikrobnih ćelija na SBP predstavlja jednostavnu tehniku imobilizacije, koja može da se koristi u reaktorima bez upotrebe hemikalija, što ovakav proces proizvodnje dekstransaharaze čini jeftinijim i ekološki prihvatljivim.

#### **4.5. Imobilizacija dekstransaharaza**

Jedan od glavnih ciljeva ove doktorske disertacije bio je da se doprinese široj primeni dekstransaharaze, upravo razvijanjem novih tehnika imobilizacije radi dobijanja jeftinijih i efikasnijih imobilisanih enzimskih preparata, koji bi našli potencijalnu primenu u reakcijama sinteze dekstrana i oligosaharida. U ovoj disertaciji ispitana je mogućnost imobilizacije native dekstransaharaze izolovane iz *Lc. mesenteroides* T3, na više nosača primenom tri različite tehnike. Primenjene su sledeće metode imobilizacije: adsorpcija na nemođifikovane i 5-aminosalicilnom kiselinom mođifikovane nanočestice TiO<sub>2</sub>, potom kovalentno vezivanje na mođifikovane nanočestice TiO<sub>2</sub> uvođenjem različitih funkcionalnih grupa (aldehidne i epoksi) i na kraju zarobljavanje enzima unutar agar-agar matriksa (procedure su opisane u poglavljima 3.2.12.1. i 3.1.12.2.). Nakon optimizacije procesa imobilizacije, za imobilisane preparate kod kojih je došlo do kovalentne imobilizacije enzima za nosač, izvršeno je poređenje temperaturne stabilnosti i mogućnost višestruke upotrebe imobilisanog i slobodnog enzima.

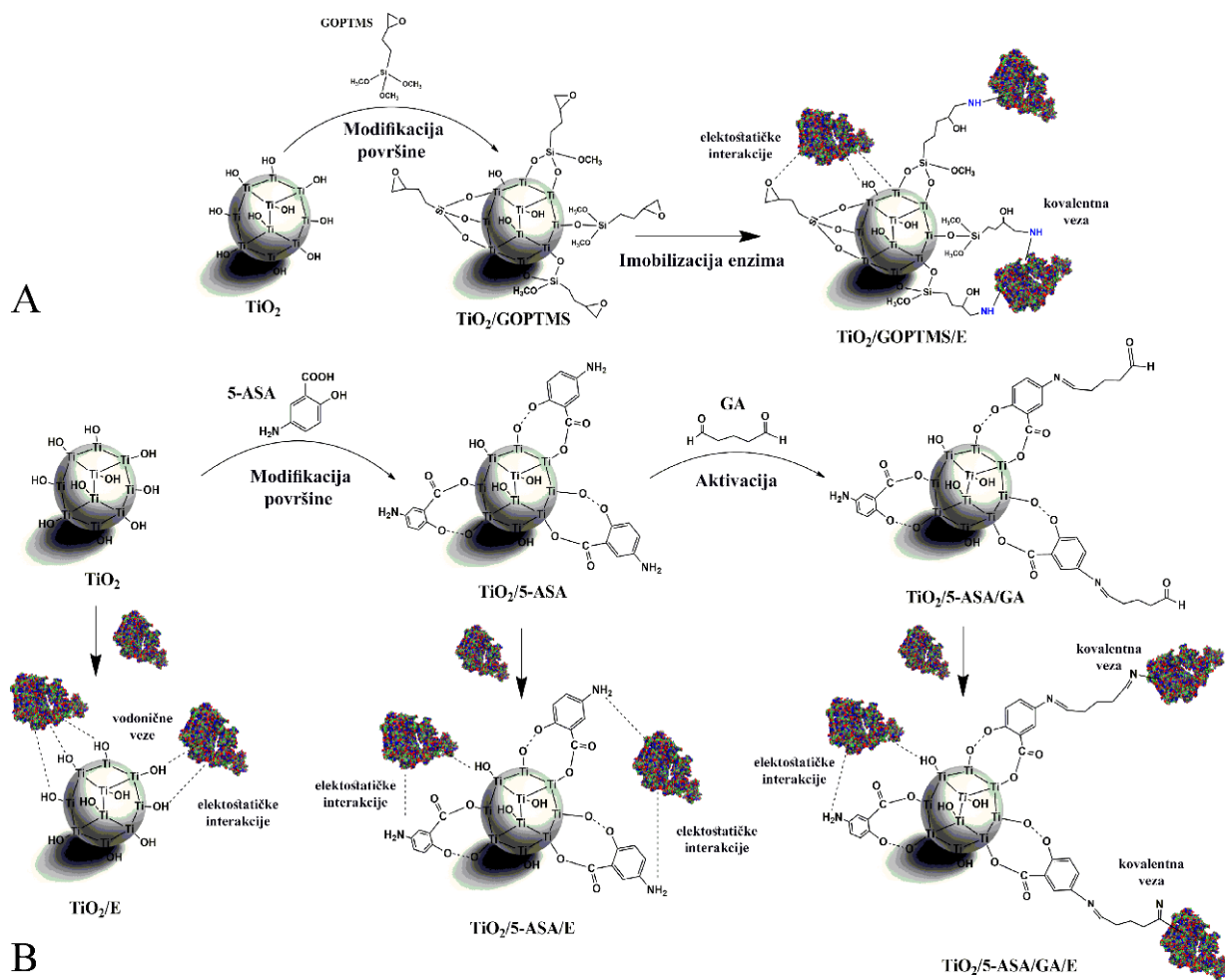
##### **4.5.1. Imobilizacija dekstransaharaze na nanočestice TiO<sub>2</sub>**

Komercijalne, široko rasprostranjene i okarakterisane nanočestice TiO<sub>2</sub> (Degussa P25) izabrane su za imobilizaciju dekstransaharaze izolovane iz *Lc. mesenteroides* T3. Površina nosača nanočestica TiO<sub>2</sub> mođifikovana je različitim funkcionalnim grupama (Slika 4.14.) i njihov uticaj na efikasnost imobilizacije dekstransaharaze poređena je sa nemođifikovanim nanočesticama TiO<sub>2</sub>.

###### **4.5.1.1. Funkcionalizacija nanočestica TiO<sub>2</sub>**

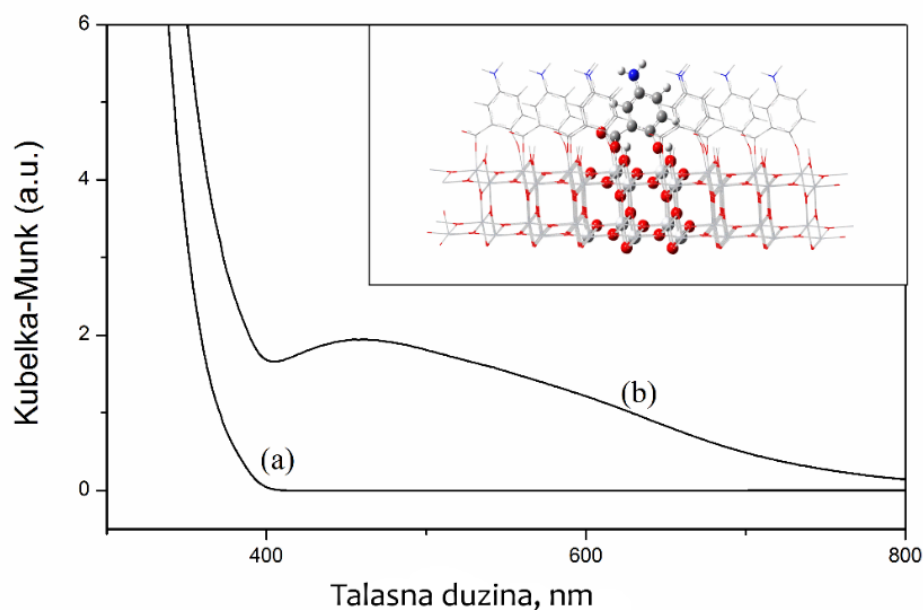
Morfološke karakteristike Degusse P25 su dobro poznate u literaturi (veličina: 20-30 nm; specifična površina: 50-60 m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup>; prečnik pora: 17,5 nm) (Almquist & Biswas, 2002; Suttiponparnit et al., 2011). Takođe, dobro je poznato da su ove nanočestice amfoterne prirode kao i to da im je izoelektrična tačka na pH=5,9 (Kosmulski, 2002). Bitno je naglasiti da je u svim eksperimentima pH vrednost bila 5,4 što znači da je najveći broj hidroksilnih grupa na površini nanočestica bio protonovan.





Slika 4.14. Funkcionalizacija nanočestica  $\text{TiO}_2$  i imobilizacija dekstranoharaze: a) uvođenje epoksi grupe u reakciji sa GOPTMS-om, b) u dva koraka uvođenje amino-grupe na površinu nosača u reakciji sa 5-ASA-om i aktivacija glutaraldehydom

U cilju da se površina nanočestica  $\text{TiO}_2$  funkcionalizuje amino grupom izvršena je modifikacija površine  $\text{TiO}_2$  5-aminosalicilnom kiselinom (5-ASA). Rezultati Kubelka-Munkove transformacije difuzione refleksije nemođifikovanih i 5-aminosalicilnom kiselinom modifikovanih čestica  $\text{TiO}_2$  prikazane su na slici 4.15.



Slika 4.15. Kubelka-Munk transformacija podataka difuzije refleksije nemođifikovanih nanočestica  $\text{TiO}_2$  (a) i nanočestica  $\text{TiO}_2$  čija je površina modifikovana 5-aminosalicilnom kiselinom (b); umetak: prostorna orijentacija kompleksa sa prenosom naelektrisanja, dobijena DFT kalkulacijama, 5-ASA vezana na kristalnoj ravni (101) anataze  $\text{TiO}_2$ .

Pojava apsorbanace u vidljivom delu spektra nakon modifikacije površine nanočestica  $\text{TiO}_2$  5-aminosalicilnom kiselinom posledica je formiranja kompleksa sa prenosom naelektrisanja (CT kompleks). Pomeranje apsorpcionog pika ka vidljivom delu spektra (od 400 nm do 700 nm) je u saglasnosti sa literaturnim podacima vezanim za modifikaciju površina nanočestica  $\text{TiO}_2$  sa salicilatnim tipom liganada (Janković, Šaponjić, Čomor, & Nedeljković, 2009; Milićević et al., 2015; Savić et al., 2013, 2015).

Dobro je poznato iz literaturnih podataka da se vezivanje 5-ASA za površinu nanočestica  $\text{TiO}_2$  dešava preko hidroksilne i karboksilne grupe (u susednom položaju na fenolnom prstenu), ostavljajući tako slobodnu amino grupu (Milićević et al., 2015). Ovako predloženo formiranje veza potkrepljeno je detaljnom FTIR analizom nemođifikovanih i 5-ASA modifikovanih čestica  $\text{TiO}_2$ . Prisustvo vibracija koje pripadaju amino grupama (Mourdikoudis & Liz-Marzán, 2013), primećeno je zahvaljujući apsorpciji na malo pomerenom položaju usled vezivanja 5-ASA na  $\text{TiO}_2$  (Milićević et al., 2015). Imajući na umu reaktivnost amino grupa, njihova dostupnost na površini nosača je jako važna za buduću primenu ovako funkcionalizovanih nanočestica  $\text{TiO}_2$ .

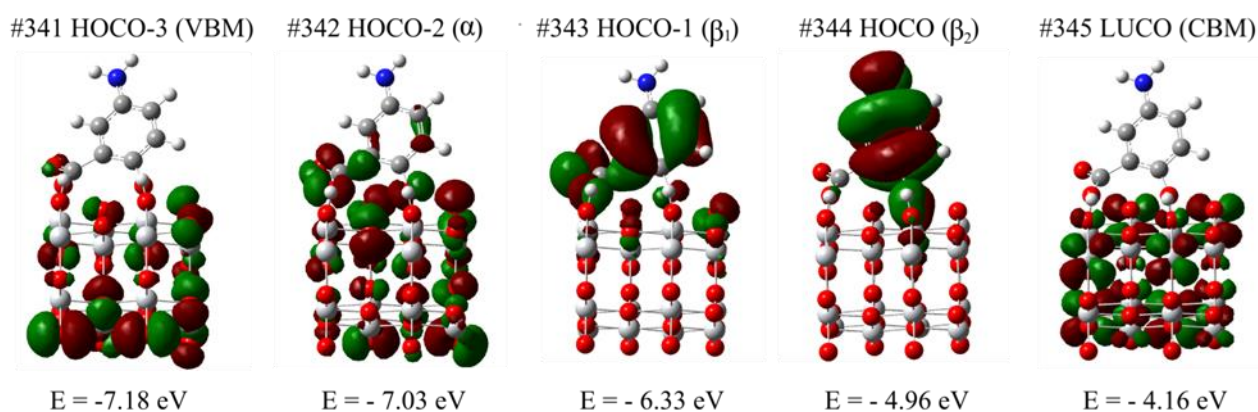
Tabela 4.5. Poređenje eksperimentalno procenjenih vrednosti energetskog procepa za  $\text{TiO}_2$ /5-ASA CT kompleks sa vrednostima dobijenim pomoću DFT metode sa periodičnim graničnim uslovima.

Struktura	Donorski nivo (eV) <sup>a</sup>	CBM (eV)	$E_g$ (eV) <sup>b</sup>	$E_g$ (eV) <sup>c</sup>
5-ASA/ $\text{TiO}_2$	-6.33	-4.16	2.17	1.77

<sup>a</sup>Donorski nivo se nalazi iznad maksimuma valentne trake  $\text{TiO}_2$ .

<sup>b</sup>Vrednost energetskog procepa je izračunata kao razlika između donorskog nivoa i minimuma provodne trake (CBM)  $\text{TiO}_2$ .

<sup>c</sup>Eksperimentalno dobijena vrednost energetskog procepa.



Slika 4.16. Granične kristalne orbitale predstavljene na ponavljajućoj jediničnoj ćeliji  $\text{TiO}_2/5\text{-ASA}$ . HOCO i LUCO predstavljaju najviše popunjene i najniže nepopunjene kristalne orbitale.

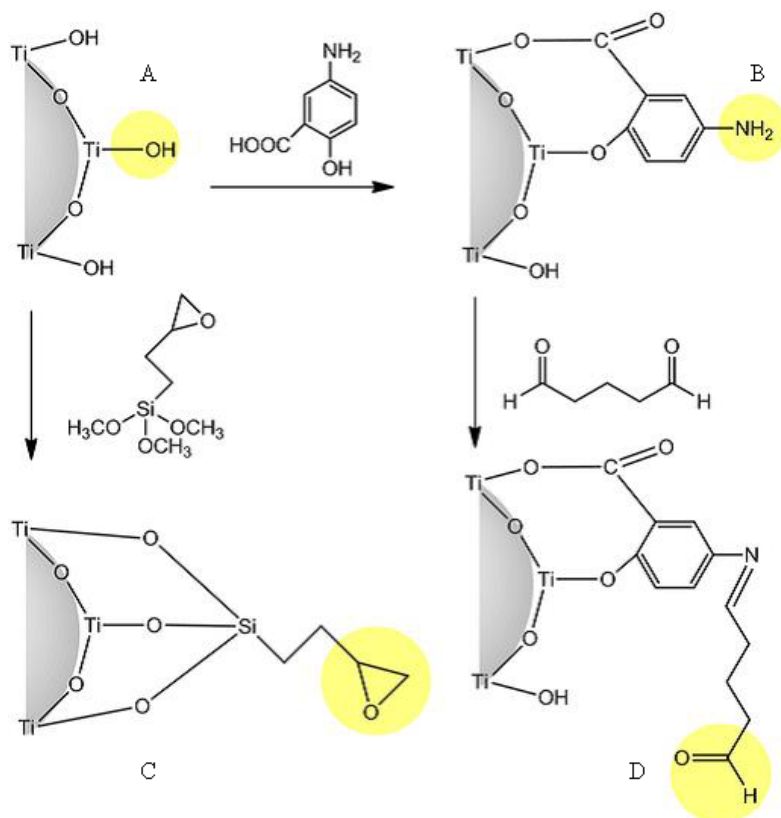
Kvantnom hemijskom analizom, baziranom na DFT proračunima određena je energija formiranih kompleksa sa prenosom naelektrisanja. Na slici 4.15. prikazana je optimizovana prostorna struktura CT kompleksa formiranog između nanočestica  $\text{TiO}_2$  i molekula 5-ASA, gde se vidi da se površinska modifikacija nanočestice  $\text{TiO}_2$  odvija na (101) prostornoj ravni anataza oblika nanočestica  $\text{TiO}_2$ , što je u skladu sa literaturnim podacima (Janković et al., 2009; Milićević et al., 2015; Savić et al., 2013, 2015). Možemo takođe primetiti da se izračunata vrednost energetskog procepa za CT kompleks od 2,17 eV, slaže sa eksperimentalno dobijenom od 1,77 eV (Tabela 4.5.), što potvrđuje predloženu vezu između nanočestice  $\text{TiO}_2$  i molekula 5-ASA.

Nosač nastao modifikacijom nanočestica  $\text{TiO}_2$  sa 5-ASA ( $\text{TiO}_2/5\text{-ASA}$ ) korišćen je kao osnova za sintezu nosača funkcionalizovanog aldehidnim grupama u reakciji sa GA. Praćenjem dobro ustanovljene procedure u literaturi (Betancor et al., 2006b; Bezbradica et al., 2014), modifikacija nosača  $\text{TiO}_2/5\text{-ASA}$  glutaraldehidom dešava se aktivacijom primarne amino grupe uvedene na površini nanočestica reakcijom sa GA (Šema 1) (Vazquez-Ortega, Alcaraz-Fruccioso, Rojas-Contreras, López-Miranda, & Fernandez-Lafuente, 2018).

Za uvođenje epoksi grupa na nanočestice  $\text{TiO}_2$  korišćen je sledeći sintetički put: Reakcija sililacije između (3-glicidiloksi)propil)trimetoksisilana (GOPTMS) i nanočestica  $\text{TiO}_2$ ; ova kondenzaciona reakcija između silanola i hidrosilnih grupa na površini  $\text{TiO}_2$  dešava se na isti način kao epoksi silanizacija silika nanočestica (Šema 1) (Banjanac, Mihailović, Prlainović, Ćorović, et al., 2016; Banjanac, Mihailović, Prlainović, Stojanović, et al., 2016).

Imobilizaciji dekstransaharaze na nanočestice  $\text{TiO}_2$  sa uvedenim epoksidnim grupama ( $\text{TiO}_2/\text{GOPTMS}$ ) prethodilo je određivanje koncentracije epoksi grupa na površini ovog nosača. Koncentracija epoksi grupa koja je ovom metodom uvedena na površinu nanočestica  $\text{TiO}_2$  iznosila je 500  $\mu\text{mol/g}$ . Ova vrednost je bliska vrednostima za neke komercijalne nosače, kao što je na primer Eupergit®, koji je već i korišćen za imobilizaciju dekstransaharaze (De Segura et al., 2004; Katchalski-Katzir & Kraemer, 2000). Određivanje optimalne koncentracije epoksidnih grupa jako je važno zbog problema koji se javlja kada je koncentracija reaktivnih grupa velika i može da utiče na smanjenje enzimske aktivnosti zbog vezivanja enzima za funkcionalizovan nosač u više tačaka (*engl.* multi point attachment) (Banjanac, Mihailović, Prlainović, Ćorović, et al., 2016; Grazu, López-Gallego, & Guisán, 2012; Mateo, Abian, Fernandez-Lafuente, & Guisan, 2000; Zhang, Peng, Wang, & Li, 2015).

Na Šemi 1 i (Slici 4.14.) ilustrovani su sintetski putevi modifikacije površine nanočestica  $\text{TiO}_2$  korišćenih u ovoj doktorskoj disertaciji za potrebe ispitivanja uticaja različito funkcionalizovanih nosača na imobilizaciju dekstransaharaze.



Šema 1. Šematski prikaz sintetskih puteva za pripremu funkcionalizovanih nosača  $\text{TiO}_2$  sa četiri različite grupe: a) protonovna hidrosilna grupa, b) amino grupa koja je uvedena na nosač funkcionalizacijom  $\text{TiO}_2$  sa 5-ASA-om, c) epoksi grupa koja je uvedena sililacijom  $\text{TiO}_2$  sa GOPTMS-om i d) aldehidna grupa uvedena reakcijom između amino grupe i glutaraldehida.

#### 4.5.1.2. Kinetika imobilizacije dekstransaharaze na nanočestice $\text{TiO}_2$

Krive nastale fitovanjem eksperimentalnih podataka dobijenih za kinetiku adsorpcije dekstransaharaze na funkcionalizovane nanočestice  $\text{TiO}_2$  sa hidrosilnim, amino, aldehidnim i epoksi grupama korišćenjem Lagergrenove jednačine (Tseng, Wu, & Juang, 2010) pseudo-prvog reda prikazane su na slici 4.9. Lagergrenove jednačina i njen nelinearni oblik glasi:

$$q_t = q_e(1 - e^{-k_1 t}) \quad (4.1)$$

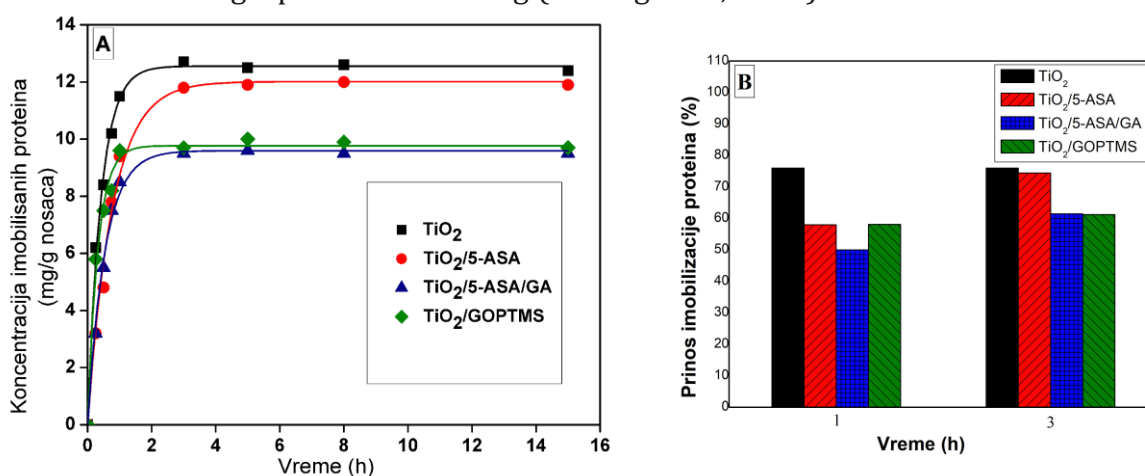
gde je  $q_e$ -ravnotežna koncentracija adsorbovanog enzima (mg/g),  $q_t$ -koncentracija adsorbovanog enzima u bilo kojem vremenu  $t$ ,  $k_1$ -konstanta brzine adsorpcije pseudo-prvog reda (1/min) i  $t$ -vreme trajanja adsorpcije (min).

Kinetički parametri (količina adsorbovane dekstransaharaze u ravnotežnom stanju i konstanta prvog reda) dobijeni na osnovu modela prikazani su u Tabeli 4.6. Enzimska aktivnost dekstransaharaze korišćene u eksperimentima imobilizacije na nanočestice  $\text{TiO}_2$  bila je 3,8 IU/mL a koncentracija proteina 0,16 mg/mL.

Tabela 4.6. Kinetički parametri imobilizacije dekstransaharaze na nanočestice  $\text{TiO}_2$ .

Nosač	Funkcionalna grupa	Maksimalna koncentracija imobilisanih proteina (mg/g nosača)	Adsorpciona konstanta (1/h)	$R^2$
$\text{TiO}_2$	Hidroksilna	12,6	3,80	0,992
$\text{TiO}_2$ -5/ASA	Amino	12,0	1,30	0,990
$\text{TiO}_2$ -5/ASA/GA	Aldehydna	9,6	1,85	0,996
$\text{TiO}_2$ /GOPTMS	Epoksi	9,8	3,80	0,992

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 4.6. i na slici 4.17.A, mogu se izvući dva ključna zaključka vezano za imobilizaciju dekstransaharaze na nemođifikovane i modifikovane nanočestice  $\text{TiO}_2$ . Imobilizacija dekstransaharaze na sva četiri proučavana nosača ( $\text{TiO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ /5-ASA,  $\text{TiO}_2$ /5-ASA/GA,  $\text{TiO}_2$ /GOPTMS) se može opisati Lagergrenovim jednačinama pseudo-prvog reda za adsorpcionu kinetiku, pošto odgovarajuće modelovane krive imaju visoke koeficijente korelacije ( $\geq 0,990$ ). Drugi zaključak koji se nameće na osnovu rezultata prikazanih na slici 4.17.A je da se maksimalna koncentracija imobilisanih proteina brže dostiže na nemođifikovanim česticama  $\text{TiO}_2$  u poređenju sa modifikovanim nosačima  $\text{TiO}_2$ . Za otprilike sat vremena imobilizacije postiže se maksimalna koncentracija imobilisanih proteina u prvom slučaju, dok je za modifikovane čestice optimalno vreme oko tri sata. Konsekventno, konstante brzine adsorpcije za imobilizaciju proteina na nemođifikovane nanočestice  $\text{TiO}_2$  su značajnije veće u odnosu na konstante brzine za  $\text{TiO}_2$ /5-ASA i  $\text{TiO}_2$ /5-ASA/GA nosače (Tabela 4.6.). Iz Tabele 4.6. se vidi i da je sorpcioni kapacitet (maksimalna koncentracija imobilisanih proteina) za nemođifikovane nanočestice  $\text{TiO}_2$  najveći u poređenju sa ostala tri nosača. Nešto niža je maksimalna koncentracija imobilisanih proteina za nosač modifikovan 5-ASA-om ( $\text{TiO}_2$ -5/ASA). Ovaj rezultat je u saglasnosti sa rezultatima koje u svojim eksperimentima imobilizacije adenozin deaminaze na nemođifikovanim nanočesticama  $\text{TiO}_2$ , kao i nanočesticama  $\text{TiO}_2$  sa uvedenim amino grupama dobio Žuang (Zhuang et al., 2017).



**Slika 4.17.** (A) Podaci adsorpcione kinetike za dekstransaharazu imobilisanu na nanočestice  $\text{TiO}_2$  (crno),  $\text{TiO}_2$ /5-ASA (crveno),  $\text{TiO}_2$ /5-ASA/GA (plavo) i  $\text{TiO}_2$ /GOPTMS (zeleno), kao i odgovarajuće "fitovane" krive dobijene korišćenjem jednačine pseudo prvog reda za adsorpcionu kinetiku. (B) Prinos imobilizacije proteina, IYp (%), u funkciji vremena.

Iz tabele 4.6. vidi se da je maksimalna koncentracija imobilisanih proteina na nosače TiO<sub>2</sub>/5-ASA/GA i TiO<sub>2</sub>/GOPTMS za 20 % manja nego na nemodifikovane čestice TiO<sub>2</sub>. Takođe, rezultati koji se odnose na prinos imobilizacije proteina (slika 4.17. B) u skladu su sa rezultatima kinetike adsorpcije. Na primer, čak 80 % od početne koncentracije proteina (mg/g) se adsorbuje na nemodifikovane čestice TiO<sub>2</sub> tokom prvog sata imobilizacije. Produžavanje vremena imobilizacije ne utiče na povećanje prinosa imobilizacije proteina na ove čestice. Sa druge strane, vrednost za prinos imobilizacije proteina na TiO<sub>2</sub>/5-ASA je slična onoj za nemodifikovane čestice i dostiže se tek nakon 3 sata imobilizacije. I na kraju, rezultati za prinos imobilizacije proteina na TiO<sub>2</sub>/5-ASA/GA i TiO<sub>2</sub>/GOPTMS nosače nakon 3 sata imobilizacije bili su značajnije manji u odnosu na nemodifikovane nanočestice. Za istu maksimalnu koncentraciju imobilisanih proteina, brzina imobilizacije dekstransahraze na TiO<sub>2</sub>/5-ASA/GA nosač je manja u poređenju sa brzinom imobilizacije za TiO<sub>2</sub>/GOPTMS nosač.

Dobijeni rezultati se najbolje mogu objasniti formiranjem elektrostatičkih interakcija između TiO<sub>2</sub> nanočestica i enzima. Kao što je poznato, TiO<sub>2</sub> je nenaelektrisan na pH<sub>zpc</sub>=5,9 (Kosmulski, 2002), a izoelektrična tačka za dekstransaharazu je oko pH=4 (Chludzinski, Germaine, & Schachtele, 1974; Itaya & Faculty, 1975). Zbog toga u navedenim eksperimentalnim uslovima imobilizacije, u kojima je pH vrednost održavana na 5,4, elektrostatičko privlačnije između pozitivno naelektrisane površine nanočestica TiO<sub>2</sub> i pretežno anjonskog karaktera enzima ubrzava proces adsorpcije. Neorgansko/organski nosači, sintetisani primenom dve različite metode (šema 1), dizajnirani su sa ciljem da se olakša kovalentno vezivanje enzima za nanočestice TiO<sub>2</sub>. Ipak, imobilizacija dekstransaharaze na TiO<sub>2</sub>/5-ASA/GA i TiO<sub>2</sub>/GOPTMS nosače, takođe prati Lagergrinovu kinetiku pseudo prvog reda, što se objašnjava činjenicom da se pre uspostavljanja kovalentnih veza enzima sa nosačem dešava nespecifična adsorpcija između makromolekula, u ovom slučaju enzima dekstransaharaze i nosača (De Segura et al., 2004). Niži sorpcioni kapacitet TiO<sub>2</sub>/5-ASA/GA i TiO<sub>2</sub>/GOPTMS nosača u odnosu na nemodifikovani TiO<sub>2</sub> i TiO<sub>2</sub>/5-ASA nosač može se objasniti manjim brojem slobodnih funkcionalnih grupa na površini nosača, usled modifikacije površine, u poređenju se brojem pozitivno naelektrisanih hidroksilinih grupa na površini nemodifikovanog TiO<sub>2</sub> ili pozitivno naelektrisanih primarnih amino grupa na površini TiO<sub>2</sub>/5-ASA nosača. Tokom imobilizacije dekstransaharaze na TiO<sub>2</sub>/5-ASA i TiO<sub>2</sub>/5-ASA/GA, dešava se brza adsorpcija preko elektrostatičkih interakcija između enzima i nosača (Barbosa et al., 2014). Takođe, u slučaju nosača aktiviranog glutaraldehidom brza adsorpcija je praćena "intramolekulskom" reakcijom između nukleofilnih grupa na enzimu i susednih aldehidnih grupa na nosaču. Nešto sporija imobilizacija na TiO<sub>2</sub>/5-ASA/GA nosaču u poređenju sa imobilizacijom na TiO<sub>2</sub>/5-ASA nosaču može se tumačiti kao posledica otežanog pristupa velikog molekula kao što je dekstransaharaza sekundarnoj amino grupi, koja nastaje nakon aktivacije glutaraldehidom (Guisan, 2006). Adsorpcija je praćena i formiranjem slabih interakcija između enzima i nosača, kao što su vodonične veze, Van Der Valsove (van der Waals) privlačne sile i elektrostatičke interakcije, što važi za imobilizaciju za nemodifikovani TiO<sub>2</sub> nosač i TiO<sub>2</sub>/5-ASA nosač.

#### 4.5.1.2.1. Difuzija unutar pora čestica

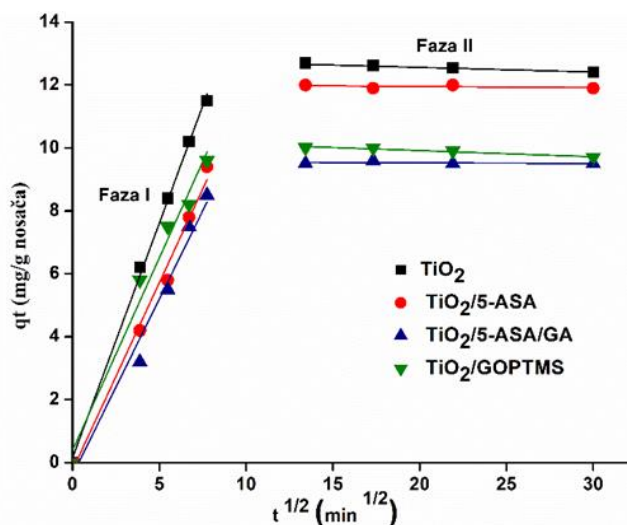
Sa namerom da dobijemo više informacija o mehanizmu adsorpcije, podaci su dalje analizirani primenom mehanizma difuzije unutar čestica (intra-particle diffusion mechanism). Mogućnost difuzije unutar nanočestica ispitana je primenom modela difuzije unutar čestica (Weber – Morris model) na dobijene rezultate (Abdel-Ghani, Rawash, & El-Chaghaby, 2016; Darzi, Gilani, Farrokhi, Nouri, & Karimi, 2019).

Weber-Morris jednačina:

$$q_t = k * t^{\frac{1}{2}} + C \quad (4.2.)$$



Gde je  $q_t$ -koncentracija imobilisanih proteina u trenutku  $t$  (mg/g nosača);  $k$ -konstanta koja opisuje brzinu adsorpcije na i unutar čestica (mg/(gmin<sup>1/2</sup>)); i  $C$  –konstanta koja opisuje uticaj debljine formiranog sloja adsorbensa na površini čestica (mg/g nosača).



Slika 4.18. Difuzija u pore  $\text{TiO}_2$  nanočestica. Weber-Morris model.

Ako eksperimentalne podatke za kinetiku adsorpcije dekstransaharaze na nemodifikovane i modifikovane  $\text{TiO}_2$  nanočestice modelujemo jednačinom  $q_t-t^{1/2}$  dobijamo da se kriva za svaki nosač sastoji iz dva linearna dela. Što znači da postoje dve faze adsorpcije dekstransaharaze na sve testirane nosače. Prva faza opisuje difuziju molekula enzima kroz rastvor do površine nanočestica, kao i difuziju molekula kroz formirani sloj enzima na površini čestica. Druga faza opisuje difuziju molekula enzima sa površine nanočestica unutar pora nanočestica. Obe faze difuzije mogu biti limitirajući faktor za adsorpciju enzima. Dobijeni parametri nakon primene Weber-Morris modela su dati u Tabeli 4.7.

Tabela 4.7. Kinetički parametri imobilizacije dekstransaharaze na nanočestice  $\text{TiO}_2$ .

	Faza I		Faza II	
<b>TiO<sub>2</sub></b>	$k_1$	1,49	$k_2$	0,016
	$C_1$	0,15	$C_2$	12,7
	$R_1$	0,99		
<b>TiO<sub>2</sub>/5-ASA</b>	$k_1$	1,19	$k_2$	0,003
	$C_1$	0,23	$C_2$	12,03
	$R_1$	0,97		
<b>TiO<sub>2</sub>/5-ASA/GA</b>	$k_1$	1,12	$k_2$	0,019
	$C_1$	0,39	$C_2$	9,38
	$R_1$	0,97		
<b>TiO<sub>2</sub>/GOPTMS</b>	$k_1$	1,22	$k_2$	0,004
	$C_1$	0,39	$C_2$	9,48
	$R$	0,973		

Na osnovu dobijenih rezultata za  $k_1$  vidi se da se u prvoj fazi odigrava brza adsorpcija molekula enzima na površinu nanočestica, dok male vrednosti parametra  $C_1$  govore da monosloj još uvek nije kompletno formiran tj. da još uvek postoji veliki broj slobodnih mesta za vezivanje enzima. U drugoj fazi velike vrednosti  $C_2$  a male vrednosti  $k_2$  govore da je monosloj formiran, kao da je veći deo molekula enzima vezan za spoljašnju površinu čestica. Znatno

manje vrednosti parametra  $k_2$  u odnosu na  $k_1$  upućuju da je prilikom vezivanja dekstransaharaze na korišćene nanočestice nema slobodnih mesta za difuziju enzima u pore ili da su pore blokirane. S obzirom da je korišćena dekstransaharaza relativno veliki molekul od 180 kDa a da je prosečan prečnik pora 17,5 nm pretpostavka je da to otežava difuziju unutar pora i da se vezivanje unutar pora skoro uopšte ne odigrava. Dodatna potvrda je i činjenica da vrednosti parametra  $C_2$  odgovaraju vrednostima koje su dobijene za maksimalne koncentracije imobilisanih proteina primenom kinetike pseudo prvog reda, što znači da su skoro svi molekuli enzima vezani za spoljašnju površinu čestica.

#### **4.5.1.3. Efikasnost imobilizacije enzimske aktivnosti dekstransaharaze na nanočestice $TiO_2$**

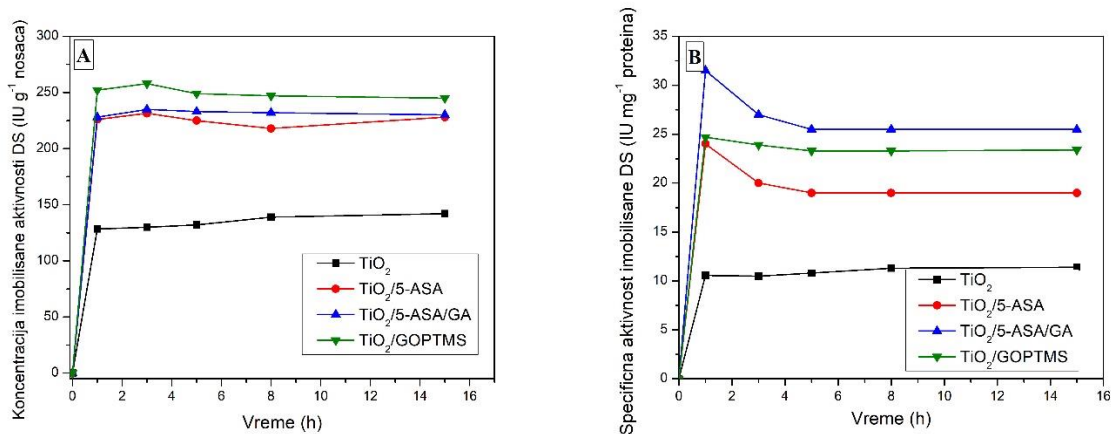
Ispitivan je uticaj tipa nanočestica  $TiO_2$  na osnovne parametre koji karakterišu efikasnost imobilizacije enzimske aktivnosti: koncentraciju imobilisane aktivnosti (IU/g) i specifičnu aktivnost (IU/mg proteina) dobijenih imobilisanih preparata. Koncentracija imobilisane aktivnosti dekstransaharaze je određivana DNS metodom u reakciji na način opisan u poglavlju 3.2.13.

#### **4.5.1.4. Uticaj hemijske modifikacije $TiO_2$ na imobilizaciju enzimske aktivnosti**

Prednost adsorpcije kao metode imobilizacije enzima je u tome što izaziva manji stepen konformacione promene i gubitka aktivnosti imobilisanog enzima u poređenju sa kovalentnim vezivanjem ( $TiO_2/5-ASA/GA$  i  $TiO_2/GOPTMS$  nosači). Sa druge strane najveću manu adsorpcije kao metode predstavlja curenje (engl. leakage) enzima tokom primene u reakciji. Za dobijanje povoljne orijentacije imobilisanog enzima, sa najvećom aktivnošću i najboljom stabilnošću, mnogo je bolje kovalentno vezivanje enzima na nosač. Zato modifikacija nanočestica  $TiO_2$  ima za cilj dobijanje takvog nosača koji omogućava kovalentno vezivanje to jest imobilizaciju dekstransaharaze.

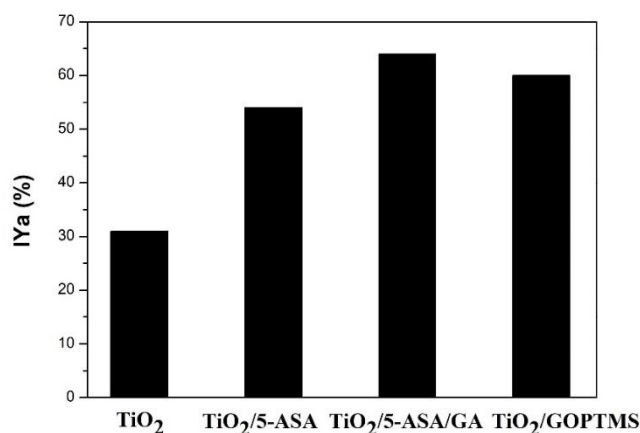
Često aktivnost dobijenog imobilisanog preparata nije direktno proporcionalna koncentraciji imobilisanih proteina na nosaču, pošto specifična aktivnost, koja zavisi i od mikrookoline i od konformacione fleksibilnosti molekula enzima, može da bude smanjena usled velike koncentracije imobilisanih proteina (Banjanac, Mihailović, Prlainović, Stojanović, et al., 2016). Da bi se ispitala primenljivost modifikovanih nanočestica  $TiO_2$  kao nosača za imobilizaciju dekstransaharaze i istovremeno uporedili sa nemodifikovanim  $TiO_2$  nanočesticama, eksperimentalno su određeni sledeći parametri: koncentracija imobilisane enzimske aktivnosti (IU/g nosača) (slika 4.19. (A)) i specifična aktivnost (IU/mg proteina) (slika 4.19. (B)) imobilisane dekstransaharaze u funkciji od vremena, dok su rezultati dobijeni za prinos imobilizacije aktivnosti (%) prikazani na slici 4.20.





**Slika. 4.19.** (A) Koncentracija imobilisane aktivnosti (IU/g nosača), (B) specifična aktivnost (IU/mg proteina)

Sa slike 4.19. (A) može da se vidi da koncentracija imobilisane aktivnosti dekstransaharaze raste obrnutim redosledom u odnosu na koncentraciju imobilisanih proteina na ova četiri različita nosača (nemodifikovane nanočestice TiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>/5-ASA, TiO<sub>2</sub>/5-ASA/GA i TiO<sub>2</sub>/GOPTMS). Na primer, iako nemodifikovane čestice TiO<sub>2</sub> imaju najveću koncentraciju imobilisanih proteina (12,4 mg/g) kao što je prikazano u Tabeli 4.6., imobilisana dekstransaharaza pokazuje najmanju koncentraciju imobilisane aktivnosti na ovom nosaču, od 142 IU/g. Sa druge strane, najmanja količina proteina vezana je za TiO<sub>2</sub>/GOPTMS (9,8 mg/g) (Tabela 4.6.) ali u odnosu na sve ostale nosače ovaj nosač pokazuje najveću koncentraciju imobilisane aktivnosti, 258 IU/g. Takođe, ovaj trend se vidi i na slici 4.19. (B) na kojoj su prikazani rezultati specifične aktivnosti dekstransaharaze tokom vremena. Oblik kinetičkih krivih za funkcionalizovane TiO<sub>2</sub> nosače (TiO<sub>2</sub>/5-ASA, TiO<sub>2</sub>/5-ASA/GA i TiO<sub>2</sub>/GOPTMS) je posledica znatno sporije imobilizacije dekstransaharaze na njima u odnosu na nemodifikovane čestice TiO<sub>2</sub>. Takođe, u ravnotežnom stanju, inverzni redosled između prinosa imobilizacije proteina (%) i prinosa imobilizacije aktivnosti (%) za nemodifikovane čestice TiO<sub>2</sub> i funkcionalizovane nosače može se videti poređenjem slika 4.18. (B) i 4.20. Najveća vrednost prinosa imobilizacije aktivnosti, 64 %, dobijena je za dekstransahrazu imobilisanu na TiO<sub>2</sub>/5-ASA/GA. Koliko je poznato, ova vrednost spada u najveće vrednosti dobijene za ovaj enzim, kad je u pitanju dekstransaharaza dobijena izolacijom iz BMK, u poređenju sa rezulatitima koje su objavljivali drugi autori (Alcalde et al., 1999; Gómez De Segura et al., 2004).



**Slika. 4.20.** Prinos imobilizacije aktivnosti dekstransaharaze imobilisane na TiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>/5-ASA, TiO<sub>2</sub>/5-ASA/GA i TiO<sub>2</sub>/GOPTMS nosače.

Postoji mali broj studija o imobilizaciji dekstransaharaze na nosače aktivirane glutaraldehydom (Alcalde et al., 1999; A. Hashem et al., 2012). Alcalde sa saradnicima (Alcalde et al., 1999) u svojim eksperimentima poredio je imobilizaciju nativne i potpuno prečišćene dekstransaharaze (kojoj je uklonjen dekstran) izolovane iz *L. mesenteroides* NRRL B-512F na GA aktivirane čestice amino silike. Rezultati (prinosa imobilizacije aktivnosti) koje je on dobio u ovoj studiji bili su značajno manji, 13 % za potpuno prečišćenu i samo 0,6 % za nativnu dekstransaharazu, nego za imobilizaciju enzima na GA aktivirane nanočestice TiO<sub>2</sub> (TiO<sub>2</sub>/5-ASA/GA), dobijene u ovoj tezi, koja je iznosila 64 %. Što se tiče rezultata prinosa imobilizacije aktivnosti dobijenih za imobilizaciju dekstransaharaze na nosač sa epoksi aktiviranim nanočesticama TiO<sub>2</sub> (TiO<sub>2</sub>/GOPTMS), treba naglasiti da je dobijena vrednost od (60 %) takođe visoka i slična onoj za TiO<sub>2</sub>/5-ASA/GA nosač (64 %). Kao što se vidi na slici 4.11. vrednosti za prinos imobilizacije aktivnosti za nemodifikovani TiO<sub>2</sub> i TiO<sub>2</sub>/5-ASA nosač znatno su niže (31 % za TiO<sub>2</sub> i 53 % za TiO<sub>2</sub>/5-ASA). Ovi rezultati se najbolje mogu objasniti orijentacijom molekula enzima nakon imobilizacije na površinu nosača (Hernandez & Fernandez-Lafuente, 2011), ukazujući na to da su aktivni centri dekstransaharaze verovatno potpuno izloženi medijumu (a ne zaklonjeni) u slučaju imobilizacije dekstransaharaze na oba nosača, TiO<sub>2</sub>/GOPTMS i TiO<sub>2</sub>/5-ASA/GA što znači da je pristup supstrata aktivnom centru olakšan. Takođe, visoki prinos imobilizacije aktivnosti za TiO<sub>2</sub>/GOPTMS i TiO<sub>2</sub>/5-ASA/GA nosače može se objasniti i kovalentnom imobilizacijom dekstransaharaze na ova dva nosača čime su molekuli enzima stabilisani i vezani u aktivnoj konformaciji.

#### **4.5.1.5. Desorpcija dekstransaharaza imobilisanih na TiO<sub>2</sub>/5-ASA/GA i TiO<sub>2</sub>/GOPTMS**

Kako bi se dokazalo da je došlo do kovalentnog vezivanja dekstransaharaze na TiO<sub>2</sub>/GOPTMS i TiO<sub>2</sub>/5-ASA/GA nosače (nanočestice), izvedena je desorpcija molekula enzima sa ovih nanočestica u različitim fazama imobilizacije. Desorpcija je izvršena u dvostepenom procesu, tako što su enzimski preparati dobijeni imobilizacijom dekstransaharaze na TiO<sub>2</sub>/GOPTMS i TiO<sub>2</sub>/5-ASA/GA tretirani 1 M NaCl i 1 % Tritonom X-100 kako bi se uklonili adsorbovani molekuli enzima i procenio udeo kovalentno vezanih molekula enzima. Prvi korak, tretman elektrolitom (1 M NaCl) korišćen je radi uklanjanja elektrostatičkih interakcija koje se uspostavljaju između enzima i nosača dok se u drugom koraku, tretman Tritonom X-100 koristi za raskidanje hidrofobnih interakcija između enzima i nosača. Na kraju, koncentracija imobilisane aktivnosti preparata nakon ova dva tretmana smatra se da potiče od molekula enzima koji su kovalentnim vezama vezani za nosač. Dobijeni rezultati pokazali su da je nakon tretmana 1 M NaCl i Tritonom X-100, imobilisani enzim zadržao oko 77 % od svoje inicijalne koncentracije imobilisane aktivnosti, na osnovu čega se može zaključiti da je oko 23 % enzima adsorbovano na površinu TiO<sub>2</sub>/5-ASA/GA nosača formiranjem elektrostatičkih interakcija, a da je onih 77 % formiralo kovalentne veze sa aldehidnim grupama na površini TiO<sub>2</sub>/5-ASA/GA nosača. Slični rezultati dobijeni su za imobilizaciju enzima na TiO<sub>2</sub>/GOPTMS nanočestice. Nakon tretmana 1 M NaCl i Tritonom X-100, enzim je zadržao 75 % od svoje inicijalne aktivnosti, što upućuje na zaključak da je enzim u ovom procentu formirao kovalentne veze sa epoksi grupama na površini TiO<sub>2</sub>/GOPTMS nosača. Ovakvi rezultati skoro sasvim potvrđuju pretpostavku da je dekstransaharaza za TiO<sub>2</sub>/5-ASA/GA i TiO<sub>2</sub>/GOPTMS nosače u najvećem procentu vezana jakim kovalentnim vezama. Takođe, može se izvesti i zaključak da kovalentna imobilizacija enzima preko različitih funkcionalnih grupa (aldehidne i epoksi) pokazuje dodatni pozitivan efekat na koncentraciju imobilisane aktivnosti, pošto kao što se može videti sa slike 4.19. (B) najveću specifičnu aktivnost imobilisana dekstransaharaza ima na ova dva nosača (za TiO<sub>2</sub>/5-ASA/GA i TiO<sub>2</sub>/GOPTMS).

Iako je kovalentna imobilizacija superiorniji metod imobilizacije u odnosu na druge metode, pre svega jer sprečava spiranje enzima sa površine nosača, nema mnogo radova u

kojima je opisana kovalentna imobilizacija dekstransaharaze (De Segura et al., 2004; A. M. Hashem et al., 2016; Parlak et al., 2013). Gomez de Segura sa saradnicima (De Segura et al., 2004) ispitivao je kovalentnu imobilizaciju dekstransaharaze na Eupergit nosačima. Autori su dobili nešto više vrednosti za koncentraciju imobilisane aktivnosti dekstransaharaze (710 IU/g nosača) u poređenju sa rezultatima dobijenim u ovoj tezi (258 IU/g nosača), ali je vreme imobilizacije bilo 72 h, što je neuporedivo duže u odnosu na 3 h koliko je trajala imobilizacija dekstransaharaze na  $\text{TiO}_2/5\text{-ASA/GA}$  i  $\text{TiO}_2/\text{GOPTMS}$  nosače. Takođe, pri prečišćavanju enzima primenili su veći broj metoda i koraka prečišćavanja što na kraju povećava ukupne troškove imobilizacije, pa se može izvesti zaključak da epoksi i GA modifikovane nanočestice  $\text{TiO}_2$  imaju potencijal za upotrebu kao nosači za imobilizaciju dekstransaharaze.

#### **4.5.1.6. Poređenje stabilnosti dekstransaharaza imobilisanih na funkcionalizovanim nanočesticama $\text{TiO}_2$ ( $\text{TiO}_2/5\text{-ASA/GA}$ i $\text{TiO}_2/\text{GOPTMS}$ )**

Na osnovu svih predhodno izloženih rezultata vidi se da su primenjene dve metode modifikacije nanočestica  $\text{TiO}_2$  kojima su na površini ovih nanočestica uvedene različite funkcionalne grupe. Kod prvog postupka uvedena je aldehidna grupa, dok je kod drugog postupka uvedena epoksi grupa (Šema 1). Obe grupe aldehidna i epoksi, promovisu formiranje kovalentnih interakcija između dekstransaharaze i modifikovanih nanočestica. Kako bi procenili uspešnost kovalentne imobilizacije dekstransaharaze na nanočestice  $\text{TiO}_2$  dobijene pomoću ova dva postupka neophodno je uporediti njihove katalitičke osobine (koncentraciju imobilisane aktivnosti, termičku stabilnost i operativnu stabilnost).

U cilju određivanja koji od ova dva nosača,  $\text{TiO}_2/5\text{-ASA/GA}$  ili  $\text{TiO}_2/\text{GOPTMS}$ , je pogodniji za imobilizaciju dekstransaharaze, njihova termička i operativna stabilnost su ispitane u dužem vremenskom periodu.

##### **4.5.1.6.1. Poređenje termičke stabilnosti kovalentno imobilisane dekstransaharaze na $\text{TiO}_2/5\text{-ASA/GA}$ i $\text{TiO}_2/\text{GOPTMS}$ nosače i slobodnog enzima**

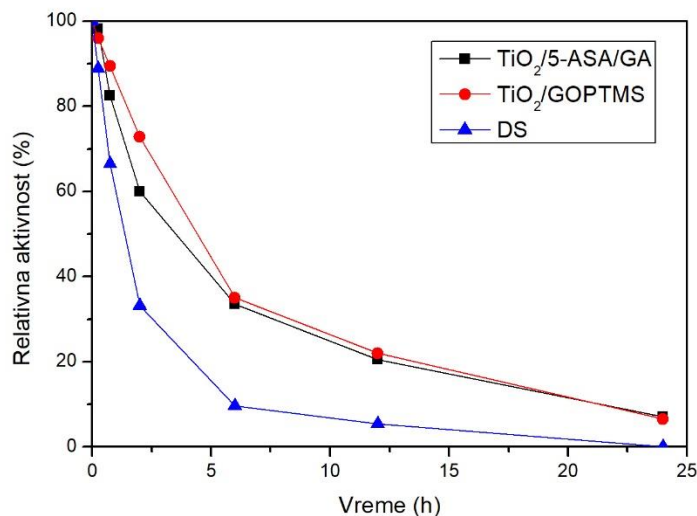
Kovalentna imobilizacija u najvećem broju slučajeva doprinosi stabilnosti imobilisanih enzima, a kako bi utvrdili da li je to i u slučajevima kovalentne imobilizacije dekstransaharaze na  $\text{TiO}_2/5\text{-ASA/GA}$  i  $\text{TiO}_2/\text{GOPTMS}$  izveden je niz eksperimenata gde je praćen uticaj temperature na stabilnost imobilisanih sistema (slika 4.21.). Dobijeni rezultati za termičku stabilnost kovalentno imobilisane dekstransaharaze na  $\text{TiO}_2/5\text{-ASA/GA}$  i  $\text{TiO}_2/\text{GOPTMS}$  nosače upoređeni su sa termičkom stabilnošću slobodnog enzima.

Termička stabilnost slobodne i kovalentno imobilisane dekstransaharaze na  $\text{TiO}_2/5\text{-ASA/GA}$  i  $\text{TiO}_2/\text{GOPTMS}$  nosače, ispitana je na 40 °C a dobijeni rezultati prikazani su na slici 4.21. Na osnovu rezultata može se videti da dekstransaharaza na oba ispitivana nosača ima gotovo identičnu stabilnost, koja je znatno bolja u poređenju sa slobodnim enzimom. Ovim eksperimentalnim rezultatima potvrđeno je da kovalentnom imobilizacijom dolazi do stabilizacije molekula imobilisanih enzima. Nakon inkubacije u trajanju od 6 h, slobodna dekstransaharaza zadržala je 8 % od početne koncentracije imobilisane aktivnosti, dok je dekstransaharaza kovalentno imobilisana na  $\text{TiO}_2/5\text{-ASA/GA}$  i  $\text{TiO}_2/\text{GOPTMS}$  nanočestice zadržala 33 % odnosno 35 % početne aktivnosti.

Takođe, jasno je i da je zahvaljujući formiranim kovalentnim vezama struktura enzima stabilisana, jer je povećana rigidnost trodimenzionalne strukture molekula enzima (Mateo, Palomo, Fernandez-Lorente, Guisan, & Fernandez-Lafuente, 2007). Na taj način imobilisani enzim je zaštićen od denaturacije koja se dešava kod slobodnog enzima sa porastom temperature (Klibanov, 1983).

Dobra (bolja) termička stabilnost dekstransaharaze nakon kovalentne imobilizacije, u odnosu na slobodan enzim, primećena je i kod dekstransaharaze kovalentno imobilisane na GA-

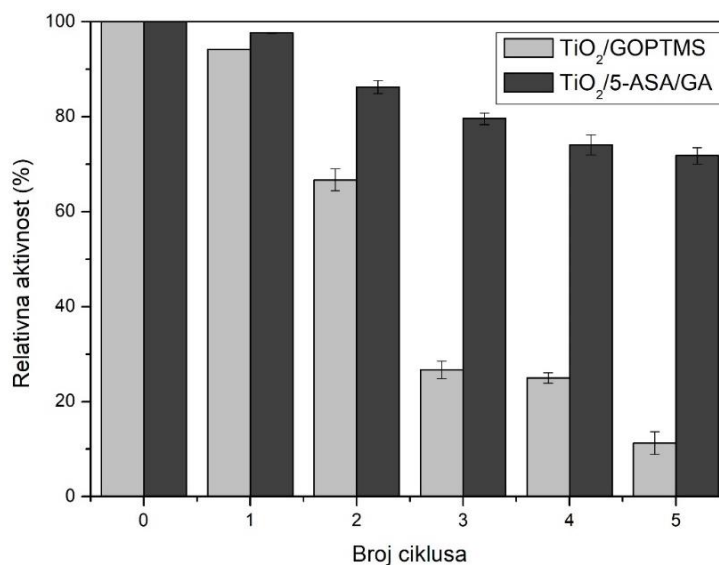
om aktivirane nanočestice hitozana (Graebin, de Andrades, Bonin, Rodrigues, & Ayub, 2016) kao i na Eupergit C i Eupergit C 250L nosače (De Segura et al., 2004).



Slika 4.21. Termička stabilnost slobodne i dekstransaharaze imobilisane na TiO<sub>2</sub>/5-ASA/GA i TiO<sub>2</sub>/GOPTMS nosače na 40 °C

#### 4.5.1.6.2. Poređenje operativne stabilnosti kovalentno imobilisane dekstransaharaze na TiO<sub>2</sub>/5-ASA/GA i TiO<sub>2</sub>/GOPTMS nosače

Operativna stabilnost predstavlja jednu od najznačajnijih karakteristika imobilisanih enzima koja određuje mogućnost njihove primene u industrijskim uslovima. Po završenom ispitivanju termičke stabilnosti ispitivana je i operativna stabilnost kovalentno imobilisanih preparata (slika 4.22.).



4.22. Operativna stabilnost imobilisane dekstransaharaze na TiO<sub>2</sub>/5-ASA/GA i TiO<sub>2</sub>/GOPTMS nosače, ispitana na 30 °C tokom pet uzastopnih ciklusa.

Dobijeni rezultati zadržane koncentracije enzimske aktivnosti dekstransaharaze imobilisane na  $\text{TiO}_2/5\text{-ASA/GA}$  i  $\text{TiO}_2/\text{GOPTMS}$  nosače u odnosu na početnu koncentraciju imobilisane aktivnosti u pet uzastopnih ciklusa prikazani su na slici 4.22. Nakon pet ciklusa, dekstransaharaza imobilisana na  $\text{TiO}_2/5\text{-ASA/GA}$  nosač zadržala je gotovo 70 % od početne koncentracije imobilisane aktivnosti, dok je sa druge strane dekstransaharaza imobilisana na  $\text{TiO}_2/\text{GOPTMS}$  nosač zadržala svega 15 % od početne koncentracije imobilisane aktivnosti.

Na osnovu svih dobijenih rezultata, može se zaključiti da su nosači  $\text{TiO}_2/5\text{-ASA/GA}$  i  $\text{TiO}_2/\text{GOPTMS}$ , pogodni za kovalentnu imobilizaciju dekstransaharaza, i tako pokazuju visoke koncentracije imobilisane aktivnosti i dobru termičku i operativnu stabilnost, posebno kada je u pitanju dekstransaharaza imobilisana na  $\text{TiO}_2/5\text{-ASA/GA}$  nosač, što ukazuje na dobar potencijal za njihovu primenu u industrijskim uslovima za sintezu dekstrana i/ili oligosaharida.

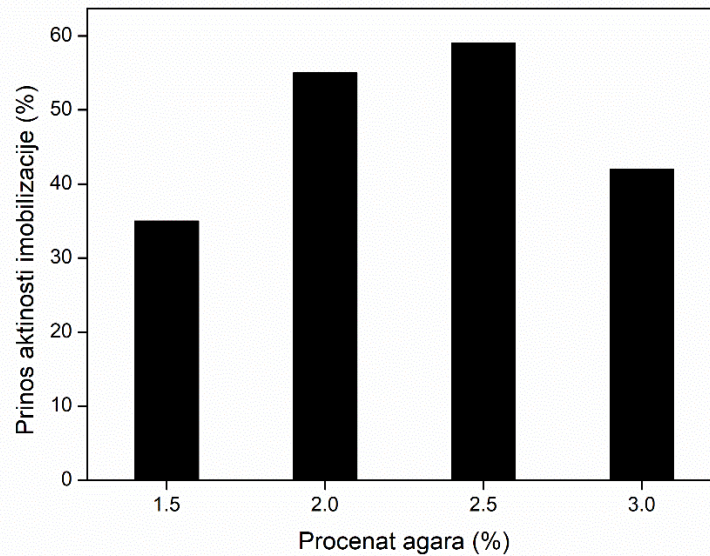
Naredni eksperimenti izvedeni u sklopu ove doktorske disertacije će se odnositi na drugu metodu imobilizacije enzima, a to je imobilizacija dekstransaharaze "zarobljavanjem" u agar-agar matrikse.

#### **4.5.2. Imobilizacija enzima zarobljavanjem unutar agar-agar matriksa u cilju sinteze oligosaharida**

Zbog lake pripreme, cene i kompatibilnosti sa mikroorganizmima, polimerni materijali kao što su agar-agar i agarozna privlače veliku pažnju za primenu kao matriksa za imobilizaciju. U ovom radu ispitana je mogućnost korišćenja, agar-agar kao nosača za imobilizaciju dekstransaharaze. Uticaj različitih parametara, konkretno koncentracija agara, odnos enzima i agar-agar matriksa i odnos supstrata i akceptora u reakcionoj smeši, ispitani su u cilju definisanja optimalnih uslova za sintezu GLOS-a.

##### **4.5.2.1. Koncentracija agar-agara**

Optimalna koncentracija agar-agara je veoma značajna za imobilizaciju enzima kao i za difuziju supstrata u matriks, pošto poroznost agar-agarnih filmova suštinski zavisi od koncentracije agar-agar matriksa. Sa povećanjem koncentracije, dolazi do smanjenja veličine pora, što će uticati sa jedne strane na bolju imobilizaciju enzima (manja je verovatnoća curenja enzima sa smanjenjem veličine pora) a sa druge strane imaće uticaj i na prolazak supstrata (Rehman, Aman, Zohra, & Qader, 2014). Prvi parameter koji je eksperimentalno ispitan vezan za imobilizaciju dekstransaharaze unutar agar-agar matriksa bilo je efikasnost imobilizacije u funkciji koncentracije agar-agar matriksa. Na slici 4.23. prikazan je uticaj različitih koncentracija agara na sposobnost zadržavanja dekstransaharaze unutar filma izražen kroz prinos imobilizacije aktivnosti.



Slika 4.23. Uticaj različitih koncentracija agara na imobilizaciju dekstransaharaze.

\*Odnos u kome su pomešani agar i enzim bio je 9:1

Rezultati na slici 4.23. pokazuju da je u eksperimentima kada je koncentracija agara bila najniža, 1,5 %, vrednost prinosa imobilizacije aktivnosti je bila najniža. Pri finalnoj koncentraciji agara od 2 % ovaj parametar je bio 55 % što je čak 20 % više nego pri koncentraciji od 1,5 %. Ovaj rezultat sličan je prinosu imobilizacije aktivnosti dobijenom za dekstransaharazu imobilisanu "zarobljavanjem" u čestice u obliku sočiva poznate pod nazivom LentiKats (De Segura et al., 2003). Sa daljim povećanjem koncentracije agara, procenat prinosa aktivnosti je rastao, ali ne tako značajno u poređenju sa porastom kada se koncentracija agar-agar povećala sa 1,5 % na 2 %. Pri najvećoj ispitanoj koncentraciji matriksa za imobilizaciju, dolazi do ponovnog pada prinosa aktivnosti imobilizacije.

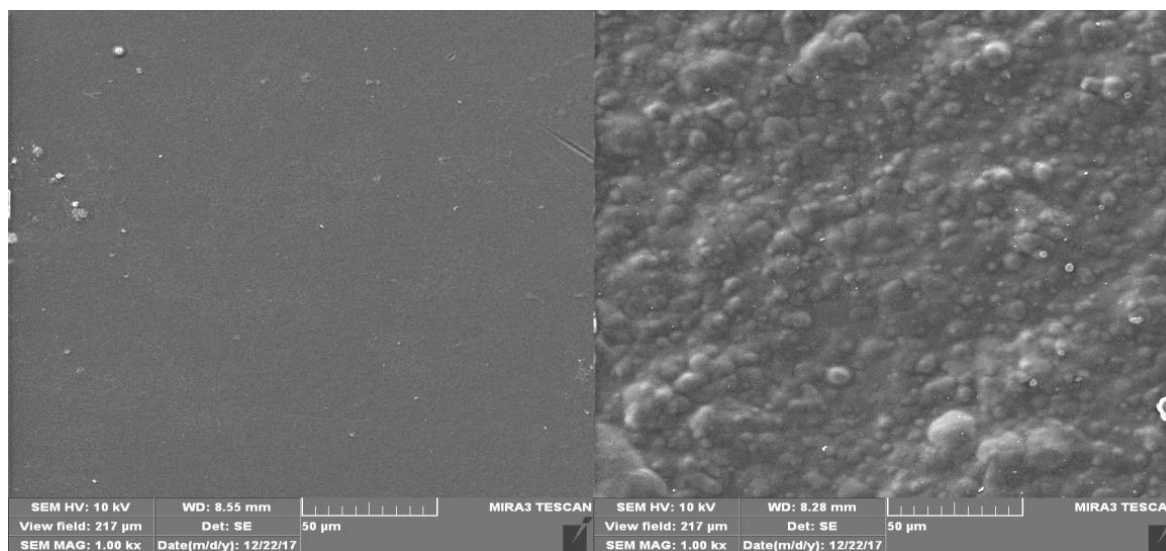
Sa nižim koncentracijama agar-agar matriksa, sintetisani filmovi su lošijih mehaničkih osobina, krutiji i mekši, što kao rezultat daje smanjeno "zarobljavanje" enzima unutar ovakve mikrookoline a usled veće veličine pora verovatnoća curenja enzima iz ovakvog matriksa je veća, kako odmah nakon sinteze, tako i nakon svakog ispiranja u puferu pre vraćanja u cikluse. Sa druge strane, u situaciji kada se koriste veće koncentracije agar-agar matriksa, mogu da se jave dve vrste problema koje mogu negativno uticati na imobilizaciju enzima. Kod visokih koncentracija matriksa veličina pora je manja, pa tako supstrati (i proizvodi enzimske reakcije, naročito ukoliko su u pitanju polisaharidni molekuli) teže difunduju u unutrašnjost matriksa da bi reagovali sa imobilisanim enzimom. Drugi problem je temperatura geliranja koja je veća za veći sadržaj agara. U slučaju ispitivane dekstransaharaze, koja već na 35 °C gubi veliki procenat svoje aktivnosti ova osobina je bila od velikog značaja. Naime, agar matriksi sa većim koncentracijama agara pri hlađenju do ove temperature već započinju geliranje čime njihovo mešanje sa enzimom i izlivanje u odgovarajuće kalupe predstavlja pravi izazov. Ovaj problem se donekle može prevazići dodatkom odgovarajućih soli metala u agar-agar matrikse. Dodatak neorganskih soli u agar-agar, tačnije  $Mg^{2+}$  jona, dovodi do poboljšanja termalne stabilnosti ovakvih matriksa i poboljšanja mehaničkih osobina što olakšava sintezu ovakvih matriksa na nešto višim temperaturama (Davidović et al. 2019).

Na osnovu svih rezultata a posebno kada se uzme u obzir da je sa koncentracijama agara koje su bile veće od 2 % manipulacija, dodavanje enzima i pravljenje filmova bilo značajno otežano, a da je razlika u prinosu imobilizacije u gelovima sa 2 i 2,5% agara nije bila izražena u daljim eksperimentima korišćena je finalna koncentracija agara od 2 %.

Molekulska struktura enzima takođe ima značajan uticaj na imobilizaciju enzima kao i na koncentraciju agar-agar matriksa potrebnog za imobilizaciju. Matriksi kao što su agar-agar, natrijum-alginat i poliakrilamid najčešće se koriste za imobilizaciju celih ćelija ili delova ćelija (globularni proteini su previše malih dimenzija u poređenju sa dimenzijama pora na ovim matriksima). Prednost dekstransaharaze u odnosu na druge enzime leži kako u njenoj velikoj molekulskoj masi tako i u činjenici da je za delimično prečišćen enzim vezan molekul dekstrana koji na ovaj način utiče na dodatno povećanje molekulske mase. U radovima drugih autora koncentracija agar-agar matiksa od 4 % pominje se kao optimalna koncentracija za maksimalni prinos imobilizacije za amilazu (Jaiswal & Prakash, 2011) i lipazu (Adham, Ahmed, & Naim, 2010). Sa druge strane, za imobilizaciju pektinaze (Rehman et al., 2014) i endo- $\beta$ -1,4-ksilanaze (Bibi, Shahid, Ali, Qader, & Aman, 2015) najveći prinos imobilizacije postignut je pri finalnoj koncentraciji agar-agara od 1,5 %.

#### 4.5.2.2. Morfologija agar-agar filmova

Morfologija polimernih agar-agar filmova sa i bez imobilisane dekstransaharaze ispitana je na SEM-u a mikrografije su posmatrane pri različitim uvećanjima. Na mikrografijama se jasno vidi razlika u morfologiji agar-agar filmova bez i sa enzimom. Prazne šupljine i relativno glatka površina mogu se zapaziti na mikrografijama na kojima su filmovi bez imobilisanog enzima (Slika 4.24.). Za razliku od njih, na mikrografijama agar-agar filmova sa imobilisanom dekstransaharazom vidljivo je nagomilavanje oligosaharida i polimera dekstrana koji nastaju kao rezultat enzimske reakcije imobilisanog enzima i supstrata (Slika 4.24.).



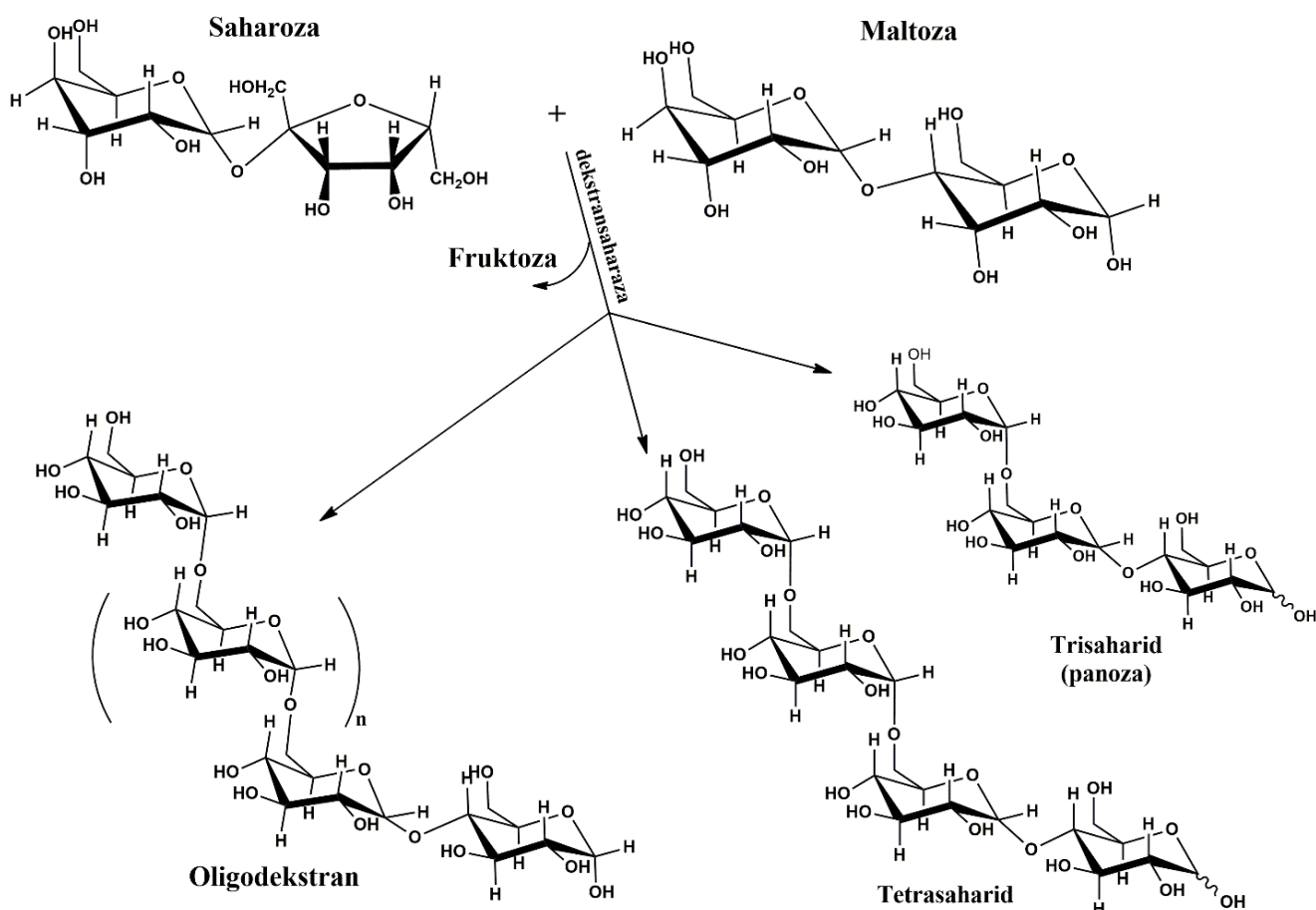
Slika 4.24. Skenirajuća elektronska mikrografija površine agar-agar filmova pre (a) i posle (b) imobilizacije dekstransaharaze pri koncentraciji agara od 2% i relativnom masenom odnosu agara i enzima od 9:1 na uvećanju (1000 $\times$ ).

#### 4.5.2.3. Enzimska sinteza gluko-oligosaharida

Kao što je već rečeno, od 50-ih godina prošlog veka, dekstransaharaza se koristila mahom za sintezu molekula dekstrana. Zbog novih regulativa kojima se delimično ograničava primena molekula dekstrana u granama industrije u kojima se do sada uspešno koristio, pre svega prehrambenoj industriji, sve više pažnje obraća se na primenu ovog enzima za sintezu oligosaharida, jedinjenja sa potencijalnom funkcionalnom aktivnošću (Dols-Lafargue et al., 2001). Reakcija sinteze oligosaharida odigrava se paralelno sa reakcijom sinteze molekula dekstrana u prisustvu odgovarajućeg akceptorskog molekula (maltoza, izomaltoza, fruktoza i tako dalje). Na slici 4.25. može se videti šematski prikaz pretpostavljenog mehanizma sinteze



različitih molekula oligosaharida pomoću dekstransaharaze poreklom iz *Lc. mesenteroides* T3 u prisustvu maltoze kao akceptora.



Slika 4.25. Hipotetički mehanizam sinteze oligosaharida, u prisustvu maltoze kao akceptora, sintetisanih pomoću dekstransaharaze izolovane iz *Lc. mesenteroides* T3

#### 4.5.2.4. Selekcija imobilisanog preparata za sintezu gluko-oligosaharida

Na osnovu rezultata iz poglavlja 4.5.2.1. koncentracija agara od 2% odabrana je kao optimalna za imobilizaciju delimično prečišćenog enzima dekstransaharaze. Sledeći korak pri selekciji imobilisanog preparata za sintezu GLOS-a bio je variranje odnosa agara i zapremine dodatog enzima. U svim ispitanim filmovima koncentracija agara je bila 2 % a relativni maseni odnosi u kome su mešani polimer i enzim bili su 9:1, 4:1 i 1:1. Svim filmovima isptivan je prinos imobilizacije aktivnosti i mehaničke osobine merenjem tri parametra: zatezne čvrstoće, Jangovog modula elastičnosti i procenta izduženja pri kidanju. Rezultati mehaničkih osobina su prikazani u Tabeli 4.8.



Tabela 4.8. Mehaničke osobine agar-agar filmova sa i bez imobilisane dekstransaharaze

	Debljina, nm	Zatezna čvrstoća, MPa	Jangov modul elastičnosti, MPa	Izduženje pri kidanju, %
<b>Kontrola</b>	0,050 ± 0,0012	23,74 ± 0,41	343,42 ± 1,47	15,33 ± 0,71
<b>9:1</b>	0,045 ± 0,0015	26,64 ± 0,52	553,94 ± 1,81	12,56 ± 0,41
<b>4:1</b>	0,045 ± 0,0020	20,00 ± 0,61	439,62 ± 2,19	10,35 ± 0,37
<b>1:1</b>	0,045 ± 0,0022	/*	/*	/*

\*Pri razlivanju i sušenju filmova sa odnosom polimera i matriksa 1:1 nije mogla da se postigne uniformnost uzorka tako da su dobijeni rezultati merenja bili previše različiti da bi moglo da se govori o nekoj srednjoj vrednosti

Najbolji prinos imobilizacije aktivnosti imao je film sa odnosom 4:1 (59 %), dok su filmovi sa odnosom 9:1 imali nižu vrednost ovog parametra (55 %). Treba napomenuti da iako je u slučaju filma u kome je odnos mase agara i enzima bio 4:1 prinos imobilizacije aktivnosti bio nešto veći, u apsolutnom iznosu potrošena je dvostruko veća zapremina enzima u odnosu na masu polimera jer je i zapremina korišćenog enzima tokom sinteze filma 4:1 bila dvostruko veća u odnosu na zapremina enzima korišćenu za sintezu filma sa odnosom 9:1.

Na osnovu dobijenih rezultata za mehaničke osobine (Tabela 4.8.) zaključeno je da su filmovi sa odnosom 9:1 bili najbolji. Filmovi kod kojih je najmanja zapremina enzima imobilisana u agar-agar matriks (9:1) imali su veću zateznu čvrstoću u odnosu na filmove sa odnosom 4:1 ali i u odnosu na kontrolu (Tabela 4.8.). I obrnuto, veća zapremina enzima vodila je smanjenju mehaničke otpornosti filmova to jest imobilizata. Takođe, pri manipulaciji i sintezi filmova, mnogo su zahvalniji za manipulaciju oni sa odnosom 9:1 tako da je dalji eksperimentalni rad nastavljen sa njima.

Zaključak koji se na osnovu ovih rezultata može izvesti je da su agar-agar filmovi sa imobilisanom dekstransaharazom mehanički stabilni. Pored toga oni se lako izdvajaju iz reakcionog medijuma, dekantovanjem. Sve to ih čini pogodnim za primenu kako u pakovanim tako i u reaktorima sa fluidizovanim slojem.

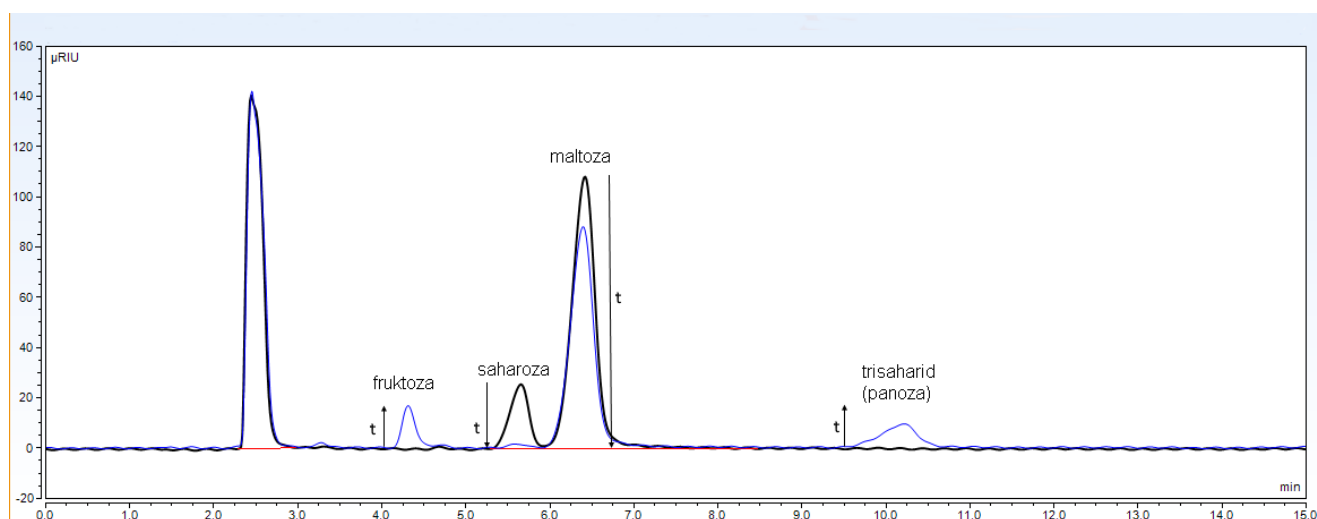
#### 4.5.2.5. Sinteza gluko-oligosaharida kada je odnos koncentracija saharoze i maltoze 1:6

Eksperimentalno je dokazano (videti poglavlje 4.1.) da je glukozid koji sintetiše bakterija *Lc. mesenteroides* T3 homopolisaharid dekstran sa najvećim udelom  $\alpha$  (1 → 6) glikozidnih veza. Prema literaturnim podacima, i proizvodi akceptorke reakcije koju katalizuje dekstransaharaza iz istog soja, biće GLOS sa onim tipom veze koji je detektovan u polisaharidu (Jeanes et al., 1954; Robyt & Eklund, 1983). Tako je za dekstransaharazu izolovanu iz soja *L. mesenteroides* NRRL B-512F dokazano da sintetiše  $\alpha$  (1 → 6) vezane GLOS (Robyt & Eklund, 1983), a kada je prisutna maltoza kao akceptorski molekul, glukoza se  $\alpha$  (1 → 6) vezom veže za neredukujući kraj maltoze i formira se panoza (Alcalde et al., 1999). Ovaj trisaharid dalje deluje i sam kao akceptor i dovodi do stvaranja serije oligosaharida (tetra-, penta- i tako dalje) koji su takođe povezani  $\alpha$  (1 → 6) glikozidnom vezom (Robyt 1996). Koji proizvodi će nastati i kakav će biti njihov odnos osim od bakterije iz koje je enzim izolovan zavisi i od molarnog odnosa maltoze i saharoze (Alcalde et al., 1999).

U velikom broju radova opisano je kako se mogu sintetisati maltooligosaharidi željene (kontrolisane) molekulske mase korišćenjem dekstransaharaze u reakciji u kojoj su prisutni akceptorski molekuli (De Segura, Alcalde, López-Cortés, Plou, & Ballesteros, 2004; Paul et al., 1986). Najviše pažnje posvećeno je ispitivanju uticaja odnosa saharoze i maltoze na sintezu GLOS-a, tačnije maltooligosaharida. Na osnovu svih istraživanja moguće je izvući nekoliko zaključka. Na osnovu literaturnih podataka jasno je da što je procenat maltoze manji to je veći udeo proizvoda sa većim stepenom polimerizacije (Demuth, Jördening, & Buchholz, 2002;

Iliev et al., 2008; Tanriseven & Doğan, 2002). I obrnuto, što je veći odnos maltoze naspram saharoze broj različitih akceptorskih proizvoda je smanjen. Tako se povećavanjem odnosa maltoze u odnosu na saharozu, mogu definisati eksperimentalni uslovi u kojima ne dolazi do sinteze dekstrana, to jest molekul dekstrana se ne detektuje kao proizvod. U istraživanjima Alkalda (Alcalde) i saradnika, kada su se maltoza i saharoza nalazila u reakcionoj smeši u odnosu 6:1 nastalo je 10 puta više panoze nego kada je taj odnos rastao u korist saharoze (1:5). Takođe, kada je odnos maltoze i saharoze bio 1:5 detektovani su GLOS u rasponu od tri do osam monosaharidnih jedinica (Alcalde et al., 1999).

U ovom doktoratu ispitan je odnos maltoze i saharoze u kome je maltoza bila u većoj koncentraciji u odnosu na saharozu. U svim eksperimentima koncentracija maltoze bila je šest puta veća od koncentracije saharoze. Cilj je bio dobijanje što manje različitih akceptorskih proizvoda u što većoj koncentraciji. Uz to cilj ovog istraživanja bio je da se ispita mogućnost sinteze GLOS-a sa  $\alpha$  (1 → 6) glikozidnom vezom pomoću dekstransaharaze izolovane iz *Lc. mesenteroides* T3 i da izmeri prinos nastalih proizvoda. Odnos u kome je maltoza u manjem procentu u odnosu na saharozu nije ispitan u ovom doktoratu jer prilikom vraćanja u cikluse, dolazi do naglog opadanja aktivnosti koji je posledica bubrenja filмова usled produkcije dekstrana, dok se pri odabranim eksperimentalnim uslovima izbegava sinteza dekstrana. Rezultati reakcije sinteze GLOS-a pomoću imobilisane dekstransaharaze prikazani su na slici 4.26.



Slika 4.26. Hromatogram\* sinteze GLOS-a u reakciji koju katalizuje dekstransaharaza imobilisana u agar-agar matriks.

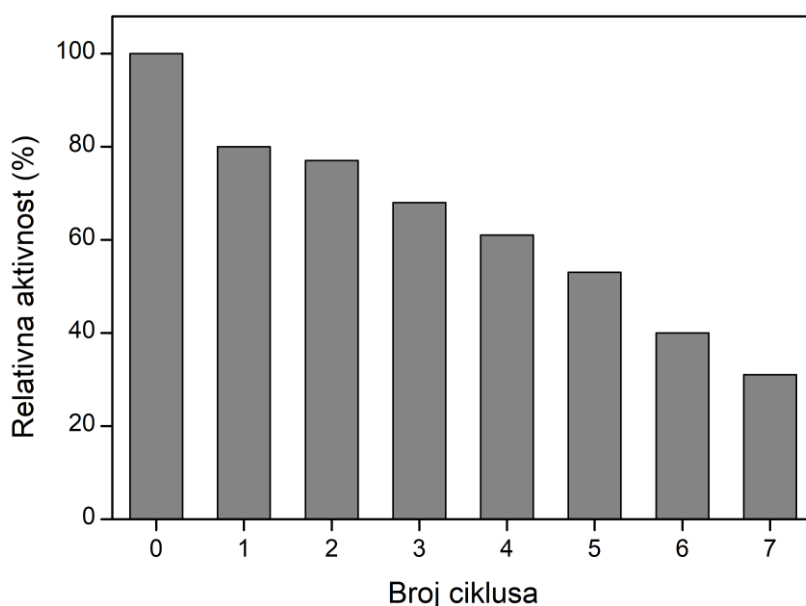
\*Za potrebe merenja uzorak je prethodno razblažen 10 puta

Analizom dobijenih rezultata reakcije katalizovane imobilisanom dekstransaharazom u agar-agar matriksu svi dobijeni pikovi su jasno razdvojeni na hromatogramu što znači da je primenjena odgovarajuća metoda i da je detektovan ključni proizvod, trisaharid. Pored njega na hromatogramu se vidi stvaranje monosaharida fruktoze kao sporednog proizvoda. Prinos trisaharida, za koji prema literaturnim podacima imamo pretpostavku da je panoza, kada je korišćen imobilisan enzim bio je 22,4 g/l dok je za slobodan enzim bio nešto malo viši 26,3 g/l.

#### 4.5.2.6. Karakterizacija dekstransaharaze imobilisane u agar-agar matriks

##### 4.5.2.6.1. Upotreba dekstransaharaze imobilisane u agar-agar matriks tokom više ponovljenih ciklusa

Višestruka upotreba imobilisanog enzima je jedan od najznačajnijih parametara za određivanje komercijalne isplativosti nekog bioprocesa, koji se zasniva na uzastopnim reakcionim ciklusima (Shah, Sridevi, Prabhune, & Ramaswamy, 2008). Mogućnost upotrebe u više uzastopnih ciklusa, dekstransaharaze imobilisane u agar-agar filmove ispitana je tokom sedam ciklusa na 30°C (Slika 4.27.).



Slika 4.27. Operativna stabilnost imobilisane dekstransaharaze unutar agar-agar matriksa, ispitana na 30 °C tokom sedam uzastopnih ciklusa.

Imobilisana dekstransaharaza pokazala je dobru operacionu stabilnost zadržavajući oko 50 % od početne koncentracije imobilisane aktivnosti nakon pet uzastopnih ciklusa. Ipak, nakon sedmog ciklusa taj broj je bio znatno niži i iznosio je 31 %. S obzirom da je zarobljavanje enzima unutar matriksa fizička metoda imobilizacije to jest ne dolazi do stvaranja jakih hemijskih veza između enzima i nosača, smanjenje katalitičke aktivnosti dekstransaharaze može se objasniti curenjem enzima iz matriksa tokom nekoliko uzastopnih procesa ispiranja pre ponovnog vraćanja u cikluse. Tokom preliminarnih eksperimenata imobilizacije dekstransaharaze u agar-agar matrikse, rađenih u okviru ove doktorske disertacije, ispitivano je curenje dekstransaharaze nakon imobilizacije u 2 % agar-agar matriks i utvrđeno je da je gubitak enzima nakon jedne serije ispiranja bio oko 2,5 %. Akumulacija proizvoda akceptorske reakcije i smanjena dostupnost dekstransaharaze supstratu takođe mogu predstavljati razlog pada katalitičke aktivnosti.

Rezultat dobijen za stabilnost dekstransaharaze tokom upotrebe u više uzastopnih ciklusa sličan je rezultatu dobijenom za endo- $\beta$ -1,4-ksilanazu (Bibi et al., 2015) a bolji od rezultata za  $\alpha$ -amilazu (Jaiswal & Prakash, 2011) kada je korišćen isti matriks za imobilizaciju.

Na osnovu operativne stabilnosti imobilizata može se zaključiti da dekstransaharaza imobilisana u agar-agar matriks ima dobre performanse za potencijalnu industrijsku primenu u proizvodnji oligosaharida. Iako je u ovoj disertaciji prikazana sinteza GLOS-a, na primeru dekstransaharaze iz *Lc. mesenteroides* T3, koji ne spadaju u funkcionalne oligosaharide, ovaj način imobilizacije mogao bi da se koristi i za druge glukansaharaze, čiji su proizvodi u široj industrijskoj primeni.

## 5. ZAKLJUČAK

- Novi soj *Lc. mesenteroides* T3 izolovan iz zrna vodenog kefir na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, sintetiše enzim dekstransaharazu.
- Soj *Lc. mesenteroides* T3 produkuje enzim aktivnosti  $3,10 \pm 0,09$  IU/ml u standardnoj mikrobiološkoj podlozi za produkciju dekstransaharaze pri statičnim uslovima gajenja i temperaturi inkubacije od  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$  kao optimalnoj za proizvodnju ovog enzima.
- Variranjem koncentracije saharoze pri proizvodnji dekstransaharaze pomoću *Lc. mesenteroides* T3 soja, maksimalna enzimaska aktivnost od  $4,71 \pm 0,13$  IU/ml dobijena je pri koncentraciji saharoze od 7 %. Kombinacija dva izvora azota, 2 % mesnog i 1 % kvašćevog ekstrakta, pokazala se kao optimalna za proizvodnju dekstransaharaze iz T3 soja.
- Nakon dva koraka taloženja 25 % PEG 400, specifična aktivnost delimično prečišćene dekstransaharaze iznosila je 16,7 IU/mg a prinos prečišćavanja bio je 53 %.
- Molarna masa prečišćene dekstransaharaze (25 % PEG 400), pokazuje postojanje jedne izoforme veličine oko 180 kDa.
- Karakterizacijom delimično prečišćene dekstransaharaze utvrđeno je da je optimalna temperatura  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  a optimalna pH vrednost 5,4 dok rezultati termalne stabilnosti pokazuju da je enzim stabilan na temperaturama nižim od  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  dok se na temperaturama višim od  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  aktivnost enzima naglo gubi.
- Dodatak jona  $\text{Mn}^{2+}$  ima najveći pozitivan uticaj na povećanje aktivnosti enzima od čak 73 %.
- Dekstransaharaza koju sintetiše bakterija *Lc. mesenteroides* T3 proizvodi polisaharid  $\alpha$ -glukoze u kome su monomerne jedinice povezane  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) glikozidnom vezom, to jest dekstran.
- Nus proizvodi agro-industrije, izluženi repin rezanac i melasa, uz dodatak komercijalnog supstrata (saharaze) mogu se koristiti za proizvodnju dekstransaharaze.
- Korišćenjem alkalnog pre tretmana za obradu izluženog repinog rezanca povećava se imobilizacija ćelija *Lc. mesenteroides* T3 soja na izluženom repinom rezancu, i povećava se proizvodnja enzima dekstransaharaze za 30% u odnosu na podlogu u kojoj se nalazi samo melasa tj. 38% u odnosu na netretiran rezanac.
- Imobilizacija ćelija *Lc. mesenteroides* T3 na alkalno tretiranom izluženom repinom rezancu omogućava upotrebu ćelija za proizvodnju enzima tokom četiri uzastopna ciklusa sa gubitkom aktivnosti od 60% (zadržana aktivnost je  $0,59 \pm 0,03$  IU/ml) nakon četiri uzastopna ciklusa sa imobilisanim ćelijama ukazujući time na potencijal i osnovu za razvoj procesa proizvodnje dekstransaharaze na otpadnom supstratu.
- Funkcionalizacijom komercijalnih nanočestica  $\text{TiO}_2$  (Degussa P25) dobijeni su nosači sa velikim kapacitetom za imobilizaciju dekstransaharaze. Za uvođenje različitih funkcionalnih grupa na nanočestice  $\text{TiO}_2$  korišćena su dva sintetska puta. Novi sintetski put za modifikaciju površine  $\text{TiO}_2$  sa amino i aldehidnim grupama, razvijen je korišćenjem prednosti stvaranja kompleksa prenosa naelektrisanja između površine atoma Ti i liganda tipa salicilata (5-aminosalicilna kiselina (5-ASA)).
- Funkcionalizacija nanočestica  $\text{TiO}_2$  amino grupom ( $\text{TiO}_2/5\text{-ASA}$ ) dovela je do porasta koncentracije imobilisane aktivnosti (230 IU/g) u odnosu na vrednost za nemodifikovane čestice (142 IU/g) ali je između enzima i nosača došlo samo do uspostavljanja elektrostatičkih interakcija, to jest do imobilizacije adsorpcijom.
- Visoke vrednosti za koncentraciju imobilisane aktivnosti (235 IU/g za nosač  $\text{TiO}_2$  sa uvedenim aldehidnim grupama ( $\text{TiO}_2/5\text{-ASA/GA}$ ) i 258 IU/g za nosač  $\text{TiO}_2$  sa uvedenim epoksi grupama ( $\text{TiO}_2/\text{GOPTMS}$ )) i prinosa imobilizacije aktivnosti (64 % za  $\text{TiO}_2/5\text{-ASA/GA}$  i 60 % za  $\text{TiO}_2/\text{GOPTMS}$ ) postignute su u slučaju kada je došlo do kovalentnog vezivanja dekstransaharaze za nosač  $\text{TiO}_2$  koji je bio funkcionalizovan ili glutaraldehidnim ili epoksi grupama.

- Takođe, kod nosača za koje se dekstransaharaza kovalentno vezala, TiO<sub>2</sub>/5-ASA/GA ili TiO<sub>2</sub>/GOPTMS, postignuto je povećanje termičke stabilnosti u odnosu na slobodan enzim. Preliminarni eksperimenti, u kojima je ispitana upotreba imobilisanih enzimskih preparata u više uzastopnih ciklusa, pokazuju potencijal za primenu dekstransaharaze imobilisane na nosač TiO<sub>2</sub> aktiviran glutaraldehydom, za sintezu dekstrana, pošto i nakon pet ciklusa, enzim zadržava 70 % od početne aktivnosti.
- Dekstransaharaza je enzim velike molekulske mase, pri čemu je za delimično prečišćen enzim vezan molekul dekstrana (koji na ovaj način utiče na dodatno povećanje molekulske mase), koji se može imobilisati u agar-agar matriks tehnikom "zarobljavanja" enzima unutar polimernog matriksa.
- Prilikom primene dekstransaharaze imobilisane u agar-agar matriksu (finalne koncentracije agara 2 %) pri odnosu polimera i enzima 9:1 u reakciji sinteze glukooligosaharida kada se maltoza i saharoza u reakcionoj smeši nalaze u odnosu 6:1, detektuje se samo jedan proizvod, trisaharid. Ovako imobilisana dekstransaharaza pokazala je dobru stabilnost sa oko 50 % zadržane imobilisane aktivnosti nakon pet uzastopnih ciklusa. Na osnovu operative stabilnosti i dobre mehaničke stabilnosti imobilizata može se zaključiti da dekstransaharaza imobilisana u agar-agar matriks ima dobre performanse za potencijalnu industrijsku primenu u proizvodnji oligosaharida.

## 6. REFERENCE

- Abdel-Ghani, N. T., Rawash, E. S. A., & El-Chaghaby, G. A. (2016). Equilibrium and kinetic study for the adsorption of p-nitrophenol from wastewater using olive cake based activated carbon. *Global Journal of Environmental Science and Management*, 2(1), 11–18. <https://doi.org/10.7508/gjesm.2016.01.002>
- Abedin, R., El-Borai, A., Abo Shall, M., & El-Assar, S. (2013). Optimization and Statistical Evaluation of Medium Components Affecting Dextran and Dextranase Production by *Lactobacillus acidophilus* ST76480.01. *Life Science Journal*, 10(1), 1746–1753.
- Adham, N. Z., Ahmed, H. M., & Naim, N. (2010). Immobilization and stability of lipase from *Mucor racemosus* NRRL 3631. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(2), 332–339. <https://doi.org/10.4014/jmb.0906.06059>
- Ahmed, R. Z., Siddiqui, K., Arman, M., & Ahmed, N. (2012). Characterization of high molecular weight dextran produced by *Weissella cibaria* CMGD3. *Carbohydrate Polymers*, 90, 441–446. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.063>
- Ahsan, N. (1998). Intravenous infusion of total dose iron is superior to oral iron in treatment of anemia in peritoneal dialysis patients: A single center comparative study. *Journal of the American Society of Nephrology*, 9(4), 664–668.
- Al-Sheraji, S. H., Ismail, A., Manap, M. Y., Mustafa, S., Yusof, R. M., & Hassan, F. A. (2013). Prebiotics as functional foods: A review. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1542–1553. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.08.009>
- Alcalde, M., Plou, F. J., De Gómez Segura, A., Remaud-Simeon, M., Willemot, R. M., Monsan, P., & Ballesteros, A. (1999). Immobilization of native and dextran-free dextranases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F for the synthesis of glucooligosaccharides. *Biotechnology Techniques*, 13(11), 749–755. <https://doi.org/10.1023/A:1008966213425>
- Almqvist, C. B., & Biswas, P. (2002). Role of synthesis method and particle size of nanostructured TiO<sub>2</sub> on its photoactivity. *Journal of Catalysis*, 212, 145–156. <https://doi.org/10.1006/jcat.2002.3783>
- Argüello-Morales, M. A., Remaud-Simeon, M., Pizzut, S., Sarçal, P., Willemot, R. M., & Monsan, P. (2000). Sequence analysis of the gene encoding alternansucrase, a sucrose glucosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355. *FEMS Microbiology Letters*, 182(1), 81–85. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(99\)00572-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(99)00572-8)
- Axén, R., Porath, J., & Ernback, S. (1967). Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. *Nature*, 214(5095), 1302–1304. <https://doi.org/10.1038/2141302a0>
- Azmeera, V., Adhikary, P., & Krishnamoorthi, S. (2012). Synthesis and Characterization of Graft Copolymer of Dextran and 2-Acrylamido-2-methylpropane Sulphonic Acid. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2012, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2012/209085>
- Bang, S. H., Jang, A., Yoon, J., Kim, P., Kim, J. S., Kim, Y. H., & Min, J. (2011). Evaluation of whole lysosomal enzymes directly immobilized on titanium (IV) oxide used in the development of antimicrobial agents. *Enzyme and Microbial Technology*, 49(3), 260–265. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.06.004>
- Banjanac, K., Mihailović, M., Prlainović, N., Čorović, M., Carević, M., Marinković, A., & Bezbradica, D. (2016). Epoxy-silanization – tool for improvement of silica nanoparticles as support for lipase immobilization with respect to esterification activity. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91(10), 2654–2663. <https://doi.org/10.1002/jctb.4870>
- Banjanac, K., Mihailović, M., Prlainović, N., Stojanović, M., Carević, M., Marinković, A., & Bezbradica, D. (2016). Cyanuric chloride functionalized silica nanoparticles for covalent immobilization of lipase. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91(2), 439–448. <https://doi.org/10.1002/jctb.4595>
- Barbosa, O., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., Rodrigues, R. C., & Fernandez-Lafuente,

- R. (2014). Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *RSC Advances*. <https://doi.org/10.1039/c3ra45991h>
- Barker, P. E., & Ajongwen, N. J. (1991). The production of the enzyme dextranucrase using non-aerated fermentation techniques. *Biotechnology and Bioengineering*, *37*(8), 703–707. <https://doi.org/10.1002/bit.260370803>
- Barreteau, H., Delattre, C., & Michaud, P. (2006). Production of oligosaccharides as promising new food additive generation. *Food Technology and Biotechnology*, *44*(3), 323–333.
- Behravan, J., Fazly Bazzaz, B. S., & Salimi, Z. (2003). Optimization of dextran production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 using cheap and local sources of carbohydrate and nitrogen. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. <https://doi.org/10.1042/ba20030084>
- Berensmeier, S., Ergezinger, M., Bohnet, M., & Buchholz, K. (2004). Design of immobilised dextranucrase for fluidised bed application. *Journal of Biotechnology*, *114*(3), 255–267. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.04.009>
- Berensmeier, S., Jördening, H. J., & Buchholz, K. (2006). Isomaltose formation by free and immobilized dextranucrase. *Biocatalysis and Biotransformation*, *24*(4), 280–290. <https://doi.org/10.1080/10242420500491854>
- Betancor, L., López-Gallego, F., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Dellamora-Ortiz, G., Mateo, C., ... Guisán, J. M. (2006). Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, *39*(4), 877–882. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.01.014>
- Betancor, L., López-Gallego, F., Hidalgo, A., Fuentes, M., Podrasky, O., Kuncova, G., ... Fernández-Lafuente, R. (2005). Advantages of the pre-immobilization of enzymes on porous supports for their entrapment in sol-gels. *Biomacromolecules*, *6*(2), 1027–1030. <https://doi.org/10.1021/bm0493077>
- Bezbradica, D. I., Mateo, C., & Guisan, J. M. (2014). Novel support for enzyme immobilization prepared by chemical activation with cysteine and glutaraldehyde. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.02.021>
- Bhavani, A. L., & Nisha, J. (2010). Dextran - The polysaccharide with versatile uses. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, *1*(4), 569–573.
- Bibi, Z., Shahid, F., Ali, S., Qader, U., & Aman, A. (2015). Agar-agar entrapment increases the stability of endo- $\beta$ -1,4-xylanase for repeated biodegradation of xylan. *International Journal of Biological Macromolecules*, *75*, 121–127. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.12.051>
- Böker, M., Jördening, H. -J., & Buchholz, K. (1994). Kinetics of leucrose formation from sucrose by dextranucrase. *Biotechnology and Bioengineering*, *43*(9), 856–864. <https://doi.org/10.1002/bit.260430904>
- Bounaix, M. S., Robert, H., Gabriel, V., Morel, S., Remaud-Siméon, M., Gabriel, B., & Fontagné-Faucher, C. (2010). Characterization of dextran-producing *Weissella* strains isolated from sourdoughs and evidence of constitutive dextranucrase expression. *FEMS Microbiology Letters*, *311*(1), 18–26. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02067.x>
- Bremer, P. J., & Geesey, G. G. (1991). An evaluation of biofilm development utilizing non-destructive attenuated total reflectance fourier transform infrared spectroscopy. *Biofouling*, *3*, 89–100. <https://doi.org/10.1080/08927019109378165>
- Brison, Y., Pijning, T., Malbert, Y., Fabre, É., Mourey, L., Morel, S., ... Dijkstra, B. W. (2012). Functional and structural characterization of  $\alpha$ -(1→2) branching sucrose derived from DSR-E glucanase. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(11), 7915–7924. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.305078>
- Buchholz, K., & Monsan, P. F. (2003). Dextranucrase. In *Food Enzymology* (pp. 580–594). New



York.

- Cassano, R., Trombino, S., Muzzalupo, R., Tavano, L., & Picci, N. (2009). A novel dextran hydrogel linking trans-ferulic acid for the stabilization and transdermal delivery of vitamin E. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72(1), 232–238. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2008.10.003>
- Castillo, E., Iturbe, F., Lopez-Munguia, A., Pelenc, V., Paul, F., & Monsan, P. (1992). Dextran and Oligosaccharide Production with Glucosyltransferases from Different Strains of *Leuconostoc mesenteroides*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 672(1), 425–430. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb35652.x>
- Chagas, C. M. A., Honorato, T. L., Pinto, G. A. S., Maia, G. A., & Rodrigues, S. (2007). Dextranase production using cashew apple juice as substrate: Effect of phosphate and yeast extract addition. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 30(3), 207–215. <https://doi.org/10.1007/s00449-007-0117-0>
- Chang, H. N., Ghim, Y. S., Cho, Y. R., Landis, D. A., & Reilly, P. J. (1981). Immobilization of *Leuconostoc mesenteroides* Dextranase to Porous Phenoxyacetyl Cellulose Beads. *Biotechnology and Bioengineering*, 23(11), 2647–2653.
- Chludzinski, A. M., Germaine, G. R., & Schachtele, C. F. (1974). Purification and properties of dextranase from *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology*, 118(1), 1–7.
- Cipolatti, E. P., Silva, M. J. A., Klein, M., Feddern, V., Feltes, M. M. C., Oliveira, J. V., ... De Oliveira, D. (2014). Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol. 99, pp. 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.10.019>
- Cortezi, M., Monti, R., & Contiero, J. (2005). Temperature effect on dextranase production by *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B isolated from Alcohol and Sugar Mill Plant. *African Journal of Biotechnology*. <https://doi.org/10.5897/AJB2005.000-3055>
- Côté, G. L., & Leathers, T. D. (2005). A method for surveying and classifying *Leuconostoc* spp. glucanases according to strain-dependent acceptor product patterns. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32(2), 53–60. <https://doi.org/10.1007/s10295-004-0194-x>
- Côté, G. L., & Skory, C. D. (2012). Cloning, expression, and characterization of an insoluble glucan-producing glucanase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1118. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(6), 2387–2394. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3562-2>
- Darzi, H. H., Gilani, S., Farrokhi, M., Nouri, S. M. M., & Karimi, G. (2019). Textural and structural characterizations of mesoporous chitosan beads for immobilization of alpha-amylase: Diffusivity and sustainability of biocatalyst. *International Journal of Engineering, Transactions B: Applications*, 32(2), 207–216. <https://doi.org/10.5829/ije.2019.32.02b.04>
- Das, D., & Goyal, A. (2014). Isolation, purification and functional characterization of glucanase from probiotic *Lactobacillus plantarum* DM5. *Annals of Microbiology*, 64, 1715–1724. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6305>
- Davidović, S., Miljković, M., Antonović, D., Rajilic-Stojanović, M., & Dimitrijević-Branković, S. (2015). Water Kefir grain as a source of potent dextran producing lactic acid bacteria. *Hemijaska Industrija*. <https://doi.org/10.2298/HEMIND140925083D>
- Davidović, S., Miljković, M. G., Antonović, D. G., Rajilić-Stojanović, M. D., & Dimitrijević-Branković, S. I. (2015). Water kefir grain as a source of potent dextran producing lactic acid bacteria. *Hemijaska Industrija*, 69(6). <https://doi.org/10.2298/HEMIND140925083D>
- Davidović, S., Miljković, M., Lazić, V., Jović, D., Jokić, B., Dimitrijević, S., & Radetić, M. (2015). Impregnation of cotton fabric with silver nanoparticles synthesized by dextran isolated from bacterial species *Leuconostoc mesenteroides* T3. *Carbohydrate Polymers*, 131. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.024>
- Davidović, S., Miljković, M., Tomić, M., Gordić, M., Nešić, A., & Dimitrijević, S. (2018). Response

- surface methodology for optimisation of edible coatings based on dextran from *Leuconostoc mesenteroides* T3. *Carbohydrate Polymers*, 184. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.061>
- Davidović, S., Lazić, V., Miljković, M., Gordić, M., Sekulić, M., Marinović-Cincović, M., ... Nedeljković, J. M. (2019). Antibacterial ability of immobilized silver nanoparticles in agar-agar films co-doped with magnesium ions. *Carbohydrate Polymers*, 224(June). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115187>
- Davidović, S., Lazić, V., Vukoje, I., Papan, J., Anhrenkiel, S. P., Dimitrijević, S., & Nedeljković, J. M. (2017). Dextran coated silver nanoparticles — Chemical sensor for selective cysteine detection. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 160, 184–191. <https://doi.org/10.1016/j.COLSURFB.2017.09.031>
- De Segura, A. G., Alcalde, M., López-Cortés, N., Plou, F. J., & Ballesteros, A. (2004). Modulating the synthesis of dextran with the acceptor reaction using native and encapsulated dextransucrases. *Food Technology and Biotechnology*, 42(4), 337–342.
- Demuth, K., Jördening, H.-J., & Buchholz, K. (2002). Oligosaccharide synthesis by dextransucrase: new unconventional acceptors. *Carbohydrate Research*, 337(20), 1811–1820. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(02\)00272-0](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00272-0)
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Limitone, A., Minervini, F., Carnevali, P., Corsetti, A., ... Gobbetti, M. (2006). Glucan and Fructan Production by Sourdough *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 9873–9881. <https://doi.org/10.1021/jf061393+>
- Djukić-Vuković, A. P., Mojović, L. V., Jokić, B. M., Nikolić, S. B., & Pejin, J. D. (2012). Lactic acid production on liquid distillery stillage by *Lactobacillus rhamnosus* immobilized onto zeolite. *Bioresource Technology*, 135, 454–458. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.066>
- Dols-Lafargue, M., Willemot, R. M., Monsan, P. F., & Remaud-Simeon, M. (2001). Reactor optimization for  $\alpha$ -1,2 glucooligosaccharide synthesis by immobilized dextransucrase. *Biotechnology and Bioengineering*, 75(3), 276–284. <https://doi.org/10.1002/bit.1183>
- Dols, M., Remaud-Simeon, M., & Monsan, P. F. (1997). Dextransucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. Comparison with *L. mesenteroides* NRRL B-512F. *Enzyme and Microbial Technology*, 20(7), 523–530. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(96\)00189-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(96)00189-5)
- Dols, M., Remaud Simeon, M., Willemot, R.-M., Vignon, M. R., & Monsan, P. F. (1997). Structural characterization of the maltose acceptor-products synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 dextransucrase. *Carbohydrate Research*, 305(3–4), 549–559. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(97\)10063-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(97)10063-5)
- Ebert, V. K. H., & Schenk, G. (1968). Kinetik und Mechanismus der enzymatischen Dextransynthese und Wirkung der Akzeptoren auf diese Reaktion. *Zeitschrift Für Naturforschung B*, 23(6), 788–797. <https://doi.org/10.1515/znb-1968-0606>
- El-Sayed, A. M., Abdul-Wahid, K. and Coughlin, R. W. (1992). Investigation of production of dextran and dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides* immobilized within porous stainless steel. *Biotechnology and Bioengineering*, 40(5), 617–624. <https://doi.org/10.1002/bit.260400509>
- El-Sayed, A. M. M., Mahmoud, W. M., & Coughlin, R. W. (1990). Comparative study of production of dextransucrase and dextran by cells of *Leuconostoc mesenteroides* immobilized on Celite and in calcium alginate beads. *Biotechnology and Bioengineering*, 36(1), 83–91. <https://doi.org/10.1002/bit.260360111>
- Ergun, M., & Ferda Mutlu, S. (2000). Application of a statistical technique to the production of ethanol from sugar beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 73(3), 251–255. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00140-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00140-6)
- Erhardt, F. A., Kügler, J., Chakravarthula, R. R., & Jördening, H. J. (2008). Co-immobilization of

- dextranase and dextransucrase for the facilitated synthesis of isomalto-oligosaccharides: Preparation, characterization and modeling. *Biotechnology and Bioengineering*, 100(4), 673–683. <https://doi.org/10.1002/bit.21810>
- Fabre, E., Bozonnet, S., Arcache, A., Willemot, R. M., Vignon, M., Monsan, P., & Remaud-Simeon, M. (2005). Role of the two catalytic domains of dsr-E dextransucrase and their involvement in the formation of highly  $\alpha$ -1,2 branched dextran. *Journal of Bacteriology*, 187(1), 296–303. <https://doi.org/10.1128/JB.187.1.296-303.2005>
- Fraga Vidal, R., Martínez, A., Moulis, C., Escalier, P., Morel, S., Remaud-Simeon, M., & Monsan, P. (2011). A novel dextransucrase is produced by *Leuconostoc citreum* strain B/110-1-2: An isolate used for the industrial production of dextran and dextran derivatives. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(9), 1499–1506. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0936-x>
- Frisch, M. J. (2009). *Gaussian 09, Revision B.01*. Wallingford CT: Gaussian, Inc.
- Funane, K., Ishii, T., Ono, H., & Kobayashi, M. (2005). Changes in linkage pattern of glucan products induced by substitution of Lys residues in the dextransucrase. *FEBS Letters*, 579(21), 4739–4745. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.07.050>
- Funane, K., Yamada, M., Shiraiwa, M., Takahara, H., Yamamoto, N., Ichishima, E., & Kobayashi, M. (1995). Aggregated Form of Dextransucrases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F and Its Constitutive Mutant. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59(5), 776–780. <https://doi.org/10.1271/bbb.59.776>
- Garcia-Galan, C., Berenguer-Murcia, Á., Fernandez-Lafuente, R., & Rodrigues, R. C. (2011). Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Advanced Synthesis and Catalysis*, Vol. 353, pp. 2885–2904. <https://doi.org/10.1002/adsc.201100534>
- Germaine, G. R., & Schachtele, C. F. (1976). *Streptococcus mutans* dextransucrase: mode of interaction with high molecular weight dextran and role in cellular aggregation. *Infection and Immunity*, 13(2), 365–372. <https://doi.org/10.1128/iai.13.2.365-372.1976>
- Germaine, G. R., Chludzinski, A. M., & Schachtele, C. F. (1974). *Streptococcus mutans* Dextransucrase: Purification, Properties, and Requirement for Primer Dextran. *Journal of Bacteriology*, 120(1), 287–294. <https://doi.org/10.1177/002203457605500329011>
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., ... Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 14(8), 491–502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- Goffin, D., Delzenne, N., Blecker, C., Hanon, E., Deroanne, C., & Paquot, M. (2011). Will isomalto-oligosaccharides, a well-established functional food in Asia, break through the European and American market? The status of knowledge on these prebiotics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(5), 394–409. <https://doi.org/10.1080/10408391003628955>
- Gokhale, A. A., Lu, J., & Lee, I. (2013). Immobilization of cellulase on magneto-responsive graphene nano-supports. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 76–86. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.01.025>
- Gómez De Segura, A., Alcalde, M., Bernabé, M., Ballesteros, A., & Plou, F. J. (2006). Synthesis of methyl  $\alpha$ -D-glucooligosaccharides by entrapped dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-1299. *Journal of Biotechnology*, 124(2), 439–445. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.12.031>
- Gómez De Segura, A., Alcalde, M., Plou, F. J., Remaud-Simeon, M., Monsan, P., & Ballesteros, A. (2003). Encapsulation in LentiKats of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299, and its effect on product selectivity. *Biocatalysis and Biotransformation*, 21(6), 325–331. <https://doi.org/10.1080/10242420310001630191>

- Gómez De Segura, A., Alcalde, M., Yates, M., Rojas-Cervantes, M. L., López-Cortés, N., Ballesteros, A., & Plou, F. J. (2004). Immobilization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F on eupergit C supports. *Biotechnology Progress*, 20(5), 1414–1420. <https://doi.org/10.1021/bp0400083>
- Goyal, A., & Katiyar, S. (1997). Effect of certain nutrients on the production of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Journal of Basic Microbiology*, 37(3), 197–204. <https://doi.org/10.1002/jobm.3620370308>
- Goyal, A., & Katiyar, S. S. (1994). Fractionation of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextran sucrose by polyethylene glycol: a simple and effective method purification. *Journal of Microbiological Methods*, 20(3), 225–231. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(94\)90007-8](https://doi.org/10.1016/0167-7012(94)90007-8)
- Goyal, A., & Katiyar, S. S. (1998a). CHEMICAL MODIFICATION OF DEXTRANSUCRASE FROM *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F BY PYRIDOXAL 5'-PHOSPHATE: EVIDENCE FOR THE PRESENCE OF AN ESSENTIAL LYSINE RESIDUE AT THE ACTIVE SITE. *BIOCHEMISTRY and MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL*, 44(6), 1167–1174.
- Goyal, A., & Katiyar, S. S. (1998b). Studies on the inactivation of *leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512f dextransucrase by o-phthalaldehyde: Evidence for the presence of an essential lysine residue at the active site. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 13(2), 147–160. <https://doi.org/10.3109/14756369809035833>
- Goyal, A., Nigam, M., & Katiyar, S. S. (1995). Optimal conditions for production of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRLL B-512F and its properties. *Journal of Basic Microbiology*, 35, 375–384. <https://doi.org/10.1002/jobm.3620350604>
- Goyal, A., & Purama, R. K. (2009). Purified Dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640 Exists as Single Homogeneous Protein: Analysis by Non-denaturing Native-PAGE. *The Internet Journal of Microbiology*, 6(1). <https://doi.org/10.5580/1b1d>
- Graebn, N. G., de Andrades, D., Bonin, M. C., Rodrigues, R. C., & Ayub, M. A. Z. (2016). Dextransucrase immobilized on activated-chitosan particles as a novel biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 133, S143–S149. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.12.007>
- Graebn, N. G., Schöffner, J. D. N., De Andrades, D., Hertz, P. F., Ayub, M. A. Z., & Rodrigues, R. C. (2016). Immobilization of glycoside hydrolase families GH1, GH13, and GH70: State of the art and perspectives. *Molecules*, Vol. 21, pp. 1–38. <https://doi.org/10.3390/molecules21081074>
- Grazu, V., López-Gallego, F., & Guisán, J. M. (2012). Tailor-made design of penicillin G acylase surface enables its site-directed immobilization and stabilization onto commercial mono-functional epoxy supports. *Process Biochemistry*, 47(12), 2538–2541. <https://doi.org/10.1016/j.PROCBIO.2012.07.010>
- Guisan, J. M. (2006). Immobilization of Enzymes and Cells. In *Human Press, Totowa, New Jersey* (Second Edi). Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.
- Gupta, A., & Prabhu, K. A. (2008). Immobilization and properties of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* culture, LM1. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 41(5), 399–407. <https://doi.org/10.2323/jgam.41.399>
- Han, J., Hang, F., Guo, B., Liu, Z., You, C., & Wu, Z. (2014). Dextran synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* BD1710 in tomato juice supplemented with sucrose. *Carbohydrate Polymers*, 112, 556–562. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.06.035>
- Harland, J. I., Jones, C. K., & Hufford, C. (2006). Co-products, In: Sugar Beet. In *Sugar Beet* (pp. 443–465).
- Hashem, A., El-Refaei, M., Gebril, H., & Abdel-Fattah, A. (2012). Immobilization of *Leuconostoc-paraesenteroides* Dextransucrase Enzyme and Characterization of its Enzyme Properties. *Journal of Basic and Applied Sciences*, 8, 344–352. <https://doi.org/10.6000/1927-5129.2012.08.02.16>

- Hashem, A. M., Gamal, A. A., Hassan, M. E., Hassanein, N. M., & Esawy, M. A. (2016). Covalent immobilization of *Enterococcus faecalis* Esawy dextransucrase and dextran synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 905–912. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.09.076>
- Hehre, E. J. (1941). Production from succrose of a seologically reactive polysaccharide by a sterile bacterial extract. *Science*, 93(2410), 237–238. <https://doi.org/10.1126/science.93.2410.237>
- Hehre, E. J. (1955). Polysaccharide synthesis from disaccharides. *Methods in Enzymology*, 1, 178–192. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(55\)01025-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(55)01025-2)
- Hehre, W. J., Ditchfield, K., & Pople, J. A. (1972). Self-consistent molecular orbital methods. XII. Further extensions of gaussian-type basis sets for use in molecular orbital studies of organic molecules. *The Journal of Chemical Physics*, 56(5), 2257–2261. <https://doi.org/10.1063/1.1677527>
- Hernandez, K., & Fernandez-Lafuente, R. (2011). Control of protein immobilization: coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. *Enzyme and Microbial Technology*, 48(2), 107–122. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.10.003>
- Hestrin, S., Avineri-Shapiro, S., & Aschner, M. (1943). The enzymic production of levan. *Biochemical Journal*, 37(4), 450–456. <https://doi.org/10.1042/bj0370450>
- Heyd, J., Scuseria, G. E., & Ernzerhof, M. (2003). Hybrid functionals based on a screened Coulomb potential. *Journal of Chemical Physics*, 118(18), 8207–8215. <https://doi.org/10.1063/1.1564060>
- Holt, S. M., Al-Sheikh, H., & Shin, K. J. (2001). Characterization of dextran-producing *Leuconostoc* strains. *Letters in Applied Microbiology*, 32(3), 185–189. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00891.x>
- Hu, Y., Ketabi, A., Buchko, A., & Gänzle, M. G. (2013). Metabolism of isomalto-oligosaccharides by *Lactobacillus reuteri* and bifidobacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 57(2), 108–114. <https://doi.org/10.1111/lam.12076>
- Hu, Y., Ketabi, A., Dieleman, L. A., & Gänzle, M. G. (2011). Influence of isomalto-oligosaccharides on intestinal microbiota in rats. *Journal of Applied Microbiology*, 110(5), 1297–1306. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04984.x>
- Iliev, I., Vassileva, T., Ignatova, C., Ivanova, I., Haertlé, T., Monsan, P., & Chobert, J. M. (2008). Gluco-oligosaccharides synthesized by glucosyltransferases from constitutive mutants of *Leuconostoc mesenteroides* strain Lm 28. *Journal of Applied Microbiology*, 104(1), 243–250. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03555.x>
- Itaya, K., & Faculty, T. (1975). Dextransucrase as an Enzyme Earth Metal Associating Ions with Alkaline filtrate by precipitation with solid ammonium sulfate in the presence of egg white albumin followed by successively treating with columns of DEAE-cellulose and Bio Gel P-150 . alkaline. *Agricultural and Biological Chemistry*, 39(6), 1187–1192.
- Jaiswal, N., & Prakash, O. (2011). Immobilization of a Thermostable -Amylase on Agarose and Agar Matrices and its Application in Starch Stain Removal. *World Applied Sciences Journal*, 13(3), 572–577.
- Janković, I. A., Šaponjić, Z. V., Čomor, M. I., & Nedeljkovic, J. M. (2009). Surface modification of colloidal tiO<sub>2</sub> nanoparticles with bidentate benzene derivatives. *Journal of Physical Chemistry C*. <https://doi.org/10.1021/jp9013338>
- Jeanes, A., Haynes, W. C., Wilham, C. A., Rankin, J. C., Melvin, E. H., Austin, M. J., ... Rist, C. E. (1954). Characterization and Classification of Dextrans from Ninety-six Strains of Bacteria. *Journal of the American Chemical Society*, 76(20), 5041–5052. <https://doi.org/10.1021/ja01649a011>
- Ji, C., Nguyen, L. N., Hou, J., Hai, F. I., & Chen, V. (2017). Direct immobilization of laccase on titania nanoparticles from crude enzyme extracts of *P. ostreatus* culture for micro-pollutant

- degradation. *Separation and Purification Technology*, 178. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.01.043>
- Johnson, M. K., & McCleskey, C. S. (1957). STUDIES ON THE AEROBIC CARBOHYDRATE METABOLISM OF LEUCONOSTOC MIESENTEROIDES. *Journal of Bacteriology*, 74(1), 22–25.
- Kaboli, H., & Reilly, P. J. (1980). Immobilization and properties of Leuconostoc mesenteroids dextranase. *Biotechnology and Bioengineering*, 22(5), 1055–1069. <https://doi.org/10.1002/bit.260220513>
- Katchalski-Katzir, E., & Kraemer, D. M. (2000). Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, Vol. 10, pp. 157–176. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00124-7)
- Katina, K., Maina, N. H., Juvonen, R., Flander, L., Johansson, L., Virkki, L., ... Laitila, A. (2009). In situ production and analysis of Weissella confusa dextran in wheat sourdough. *Food Microbiology*, 26, 734–743. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.07.008>
- Kim, D., & Robyt, J. F. (1994). Properties of Leuconostoc mesenteroides B-512FMC constitutive dextranase. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(12), 1010–1015. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90134-1](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90134-1)
- Kim, M. Il, Ham, H. O., Oh, S.-D., Park, H. G., Chang, H. N., & Choi, S.-H. (2006). Immobilization of Mucor javanicus lipase on effectively functionalized silica nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 39(1–4), 62–68. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCATB.2006.01.028>
- Kim, J., Grate, J. W., & Wang, P. (2006). Nanostructures for enzyme stabilization. *Chemical Engineering Science*, 61(3), 1017–1026. <https://doi.org/10.1016/J.CES.2005.05.067>
- Klibanov, A. M. (1983). Stabilization of Enzymes against Thermal Inactivation. *Advances in Applied Microbiology*, 29(C), 1–28. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70352-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70352-6)
- Knežević-Jugović, Z. (2008). *Enzimsko inženjerstvo*. Beograd, Srbija: Tehnološko-metalurški fakulte, Beograd, Srbija.
- Kobayashi, M., & Matsuda, K. (1976). Purification and properties of the extracellular dextranase from Leuconostoc mesenteroides NRRL B-1299. *Journal of Biochemistry*, 79(6), 1301–1308. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a131184>
- Kobayashi, M., & Matsuda, K. (1978). Inhibition of dextran synthesis by glucoamylase and endodextranase. *Carbohydrate Research*, 66(1), 277–288. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)83258-9](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)83258-9)
- Kobayashi, M., & Matsuda, K. (1975). Purification and characterization of two activities of the intracellular dextranase from Leuconostoc mesenteroides NRRL B-1299. *BBA - Enzymology*, 397(1), 69–79. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(75\)90180-1](https://doi.org/10.1016/0005-2744(75)90180-1)
- Kobs, S. F. (1991). Acceptor activity of affinity-immobilized dextranase from Streptococcus sanguis ATCC 10558. *Carbohydrate Research*, 211(2), 337–342. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(91\)80104-U](https://doi.org/10.1016/0008-6215(91)80104-U)
- Kobs, S. F., Husman, D. W., Cawthorn, K. M., & Mayer, R. M. (1990). Affinity purification of dextranase from Streptococcus sanguis ATCC 10558. *Carbohydrate Research*, 203(1), 156–161. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(90\)80055-8](https://doi.org/10.1016/0008-6215(90)80055-8)
- Kobs, S. F., & Mayer, R. M. (1991). Photolabeling of dextranase from. *Carbohydrate Research*, 211, 317–326.
- Koepsell, H. J., & Tsuchiya, H. M. (1952). ENZYMATIC SYNTHESIS OF DEXTRAN. *Journal of Bacteriology*, 63(2), 293–295. Retrieved from <http://ezproxy.spu.edu/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=ip&db=jlh&AN=105076611&site=ehost-live>
- Koepsell, H. J., Tsuchiya, H. M., Hellman, N. N., Kazenko, A., Hoffman, C. A., Sharpe, E. S., & Jackson, R. W. (1953). Enzymatic synthesis of dextran; acceptor specificity and chain initiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 200(2), 793–801.

- Korakli, M., & Vogel, R. F. (2006). Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glucansucrases and therapeutic potential of their synthesised glycans. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(6), 790–803. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0469-4>
- Kosmulski, M. (2002). The significance of the difference in the point of zero charge between rutile and anatase. *Advances in Colloid and Interface Science*, pp. 255–264. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(02\)00080-5](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(02)00080-5)
- Kothari, D., Baruah, R., & Goyal, A. (2012). Immobilization of glucansucrase for the production of gluco-oligosaccharides from *Leuconostoc mesenteroides*. *Biotechnology Letters*, 34(11), 2101–2106. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-1014-4>
- Lee, C. Y., Yun, C. Y., Yun, J. W., Oh, T. K., & Kim, C. J. (1997). Production of glucooligosaccharides by an acceptor reaction using two types of glucansucrase from *Streptococcus sobrinus*. *Biotechnology Letters*, 19(12), 1227–1230. <https://doi.org/10.1023/A:1018446122823>
- Lee, K. W., Park, J. Y., Jeong, H. R., Heo, H. J., Han, N. S., & Kim, J. H. (2012). Probiotic properties of *Weissella* strains isolated from human faeces. *Anaerobe*, 18(1), 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.12.015>
- Leemhuis, H., Pijning, T., Dobruchowska, J. M., van Leeuwen, S. S., Kralj, S., Dijkstra, B. W., & Dijkhuizen, L. (2013). Glucansucrases: Three-dimensional structures, reactions, mechanism,  $\alpha$ -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. *Journal of Biotechnology*, 163(2), 250–272. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.06.037>
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), D490–D495. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>
- Lopretti, M., & Martinez, L. (2002). Influence of nitrogen/carbon ratio and complementary sugars on dextranase production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f). *Process Biochemistry*, 34(9), 879–884. [https://doi.org/10.1016/s0032-9592\(99\)00020-5](https://doi.org/10.1016/s0032-9592(99)00020-5)
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.
- Lucey, C. A., & Condon, S. (1986). Active Role of Oxygen and NADH Oxidase in Growth and Energy Metabolism of *Leuconostoc*. *Journal of General Microbiology*, 132, 1789–1796. <https://doi.org/10.1099/00221287-132-7-1789>
- Majumder, A., & Goyal, A. (2008). Optimization of culture conditions of a novel glucan producing glucansucrase from *Leuconostoc dextranicum* NRRL B-1146. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 2(2), 260–268.
- Majumder, A., Mangtani, A., & Goyal, A. (2008). Purification, identification and functional characterization of glucansucrase from *Leuconostoc dextranicum* NRRL B-1146. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 2, 493–505.
- Majumder, A., Purama, R. K., & Goyal, A. (2007). An overview of purification methods of glycoside hydrolase family 70 dextranase. *Indian Journal of Microbiology*, 47(3), 197–206. <https://doi.org/10.1007/s12088-007-0040-8>
- Mateo, C., Grazú, V., Pessela, B. C. C., Montes, T., Palomo, J. M., Torres, R., ... Guisán, J. M. (2008). Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization–stabilization. *Biochemical Society Transactions*, 35(6), 1593–1601. <https://doi.org/10.1042/bst0351593>
- Mateo, C., Abian, O., Fernández-Lorente, G., Pedroche, J., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J. M., ... Daminati, M. (2002). Epoxy Sepabeads: A novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. *Biotechnology Progress*, 18(3), 629–634. <https://doi.org/10.1021/bp010171n>
- Mateo, C., Abian, O., Fernández-Lafuente, R., & Guisán, J. M. (2000). Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional

- multipoint covalent attachment☆. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(7), 509–515. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00188-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00188-X)
- Mateo, C., Fernández-Lorente, G., Abian, O., Fernández-Lafuente, R., & Guisán, J. M. (2000). Multifunctional epoxy supports: A new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. *Biomacromolecules*, 1(4), 739–745. <https://doi.org/10.1021/bm000071q>
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6), 1451–1463. <https://doi.org/10.1016/j.enzmtec.2007.01.018>
- Mayer, R. M., Matthews, M. M., Futerman, C. L., Parnaik, V. K., & Jung, S. M. (1981). Dextranucrase: Acceptor substrate reactions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 208(1), 278–287. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(81\)90150-8](https://doi.org/10.1016/0003-9861(81)90150-8)
- Mihailović, D., Šaponjić, Z., Molina, R., Puač, N., Jovančić, P., Nedeljković, J., & Radetić, M. (2010). Improved properties of oxygen and argon RF plasma-activated polyester fabrics loaded with TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2(6), 1700–1706. <https://doi.org/10.1021/am100209n>
- Mihajlovski, K. R., Radovanović, N. R., Veljović, Đ. N., Šiler-Marinković, S. S., & Dimitrijević-Branković, S. I. (2016). Improved β-amylase production on molasses and sugar beet pulp by a novel strain *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1. *Industrial Crops and Products*, 80, 115–122. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2015.11.025>
- Milićević, B., Đorđević, V., Lončarević, D., Ahrenkiel, S. P., Dramićanin, M. D., & Nedeljković, J. M. (2015). Visible light absorption of surface modified TiO<sub>2</sub> powders with bidentate benzene derivatives. *Microporous and Mesoporous Materials*, 217, 184–189. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2015.06.028>
- Miljković, M. G., Davidović, S. Z., Carević, M. B., Veljović, Đ. N., Mladenović, D. D., Rajilić-Stojanović, M. D., & Dimitrijević-Branković, S. I. (2016). Sugar Beet Pulp as *Leuconostoc mesenteroides* T3 Support for Enhanced Dextranucrase Production on Molasses. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180(5), 1016–1027. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2149-x>
- Miller, A. W., Eklund, S. H., & Robyt, J. F. (1986). Milligram to gram scale purification and characterization of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Carbohydrate Research*, 147(1), 119–133. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(86\)85011-X](https://doi.org/10.1016/0008-6215(86)85011-X)
- Miller, A. W., & Robyt, J. F. (1984). Stabilization of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F by nonionic detergents, poly(ethylene glycol) and high-molecular-weight dextran. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular*. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(84\)90131-6](https://doi.org/10.1016/0167-4838(84)90131-6)
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mojović, L., Nikolić, S., Pejin, D., Pejin, J., Djukić-Vuković, A., Kocić-Tanackov, S., & Semenčenko, V. (2013). The potential for sustainable bioethanol production in Serbia: available biomass and new production approaches. In *Materials and processes for energy: communicating current research and technological developments* (pp. 380–392).
- Monchois, V., Remaud-Simeon, M., Russell, R. R. B., Monsan, P., & Willemot, R. M. (1997). Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextranucrase (DSRS) and identification of amino-acid residues playing a key role in enzyme activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48(4), 465–472. <https://doi.org/10.1007/s002530051081>
- Monsan, P., & Lopez, A. (1981). On the production of dextran by free and immobilized



- dextranucrase. *Biotechnology and Bioengineering*, 23(9), 2027–2037. <https://doi.org/10.1002/bit.260230908>
- Monsan, P., Paul, F., Auriol, D., & Lopez, A. (1987). Dextran Synthesis Using Immobilized *Leuconostoc mesenteroides* Dextranucrase. *Methods in Enzymology*, 136(C), 239–254. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(87\)36025-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(87)36025-2)
- Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R. M., & Remaud-Siméon, M. (2001). Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11(9), 675–685. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00113-3)
- Monsan, P., Remaud-Siméon, M., & André, I. (2010). Transglucosidases as efficient tools for oligosaccharide and glucoconjugate synthesis. *Current Opinion in Microbiology*, 13(3), 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.03.002>
- Mooser, G., & Iwaoka, K. R. (1989). Sucrose 6- $\alpha$ -D-Glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus*: Characterization of a Glucosyl-Enzyme Complex. *Biochemistry*, 28(2), 443–449. <https://doi.org/10.1021/bi00428a006>
- Moulis, C., Joucla, G., Harrison, D., Fabre, E., Potocki-Veronese, G., Monsan, P., & Remaud-Simeon, M. (2006). Understanding the polymerization mechanism of glycoside-hydrolase family 70 glucansucrases. *Journal of Biological Chemistry*, 281(42), 31254–31267. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604850200>
- Mourdikoudis, S., & Liz-Marzán, L. M. (2013). Oleylamine in nanoparticle synthesis. *Chemistry of Materials*, pp. 1465–1476. <https://doi.org/10.1021/cm4000476>
- Mussatto, S. I., Ballesteros, L. F., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2012). Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes. In K.-Y. Show & X. Guo (Eds.), *Industrial Waste* (pp. 121–140). <https://doi.org/10.5772/36310>
- Mussatto, S. I., & Mancilha, I. M. (2007). Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*, 68(3), 587–597. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.12.011>
- Naessens, M., Cerdobbel, A., Soetaert, W., & Vandamme, E. J. (2005). *Leuconostoc dextranucrase* and dextran: Production, properties and applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80(8), 845–860. <https://doi.org/10.1002/jctb.1322>
- Neely, W. B. (1961). Dextran: Structure and Synthesis. *Advances in Carbohydrate Chemistry*, 15(C), 341–369. [https://doi.org/10.1016/S0096-5332\(08\)60191-5](https://doi.org/10.1016/S0096-5332(08)60191-5)
- Neely, W. B., & Nott, J. (1962). Dextranucrase, an Induced Enzyme from *Leuconostoc mesenteroides*. *Biochemistry*, 1(6), 1136–1140. <https://doi.org/10.1021/bi00912a027>
- Nelson, J. M., & Griffin, E. G. (1916). Adsorption of invertase. *Journal of the American Chemical Society*, 38(5), 1109–1115. <https://doi.org/10.1021/ja02262a018>
- Nigam, P. (1994). Process selection for protein-enrichment: fermentation of the sugar industry by-products molasses and sugar beet pulp. *Process Biochemistry*, 29(5), 337–342. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(94\)87002-0](https://doi.org/10.1016/0032-9592(94)87002-0)
- Nigam, P., & Vogel, M. (1991). Bioconversion of sugar industry by-products-molasses and sugar beet pulp for single cell protein production by yeasts. *Biomass and Bioenergy*, 1(6), 339–345. [https://doi.org/10.1016/0961-9534\(91\)90014-4](https://doi.org/10.1016/0961-9534(91)90014-4)
- Ölçer, Z., & Tanriseven, A. (2010). Co-immobilization of dextranucrase and dextranase in alginate. *Process Biochemistry*, 45(10), 1645–1651. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.06.011>
- Öztop, H. N., Öztop, A. Y., Karadağ, E., İşikver, Y., & Saraydin, D. (2003). Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* on to acrylamide-sodium acrylate hydrogels for production of ethyl alcohol. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(1), 114–119. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00244-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00244-2)
- Padmanabhan, P. A., & Kim, D. S. (2002). Production of insoluble dextran using cell-bound dextranucrase of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-523. *Carbohydrate Research*, 337(17), 1529–1533. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(02\)00214-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00214-8)
- Parlak, M., Ustek, D., & Tanriseven, A. (2013). A novel method for covalent immobilization of

- dextranucrase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 89, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.12.013>
- Pashangeh, K., Akhond, M., Karbalaee-Heidari, H. R., & Absalan, G. (2017). Biochemical characterization and stability assessment of *Rhizopus oryzae* lipase covalently immobilized on amino-functionalized magnetic nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 300–307. <https://doi.org/10.1016/j.IJBIOMAC.2017.07.035>
- Patel, S., & Goyal, A. (2011). Functional oligosaccharides: Production, properties and applications. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 27). <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0558-5>
- Paul, F., Oriol, E., Auriol, D., & Monsan, P. (1986). Acceptor reaction of a highly purified dextranucrase with maltose and oligosaccharides. Application to the synthesis of controlled-molecular-weight dextrans. *Carbohydrate Research*, 149(2), 433–441. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)90063-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)90063-6)
- Plihon, F., Taillandier, P., & Strehaiano, P. (1995). Oxygen effect on batch cultures of *Leuconostoc mesenteroides*: relationship between oxygen uptake, growth and end-products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(1), 117–122. <https://doi.org/10.1007/BF00170632>
- Plou, F. J., de Segura, A. G., & Ballesteros, A. (2007). Industrial Enzymes. In *Application of Glycosidases and Transglycosidases in the Synthesis of Oligosaccharides* (pp. 141–161). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Plou, F. J., Martín, M. T., de Segura, A. G., Alcalde, M., & Ballesteros, A. (2002). Glucosyltransferases acting on starch or sucrose for the synthesis of oligosaccharides. *Canadian Journal of Chemistry*, 80(6), 743–752. <https://doi.org/10.1139/v02-104>
- Porath, J., & Axén, R. (1976). [3] Immobilization of Enzymes to Agar, Agarose, and Sephadex Support. *Methods in Enzymology*, 44(C), 19–45. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(76\)44005-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(76)44005-3)
- Purama, R. K., Agrawal, M., & Goyal, A. (2010). Stabilization of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640. *Indian Journal of Microbiology*, 50(S1), 57–61. <https://doi.org/10.1007/s12088-010-0057-2>
- Purama, R. K., & Goyal, A. (2008a). Application of response surface methodology for maximizing dextranucrase production from *leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640 in a bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8165-8>
- Purama, R. K., & Goyal, A. (2008b). Identification, effective purification and functional characterization of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640. *Bioresource Technology*, 99(9), 3635–3642. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.07.044>
- Purama, R. K., & Goyal, A. (2008c). Identification, effective purification and functional characterization of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640. *Bioresource Technology*, 99(9), 3635–3642. <https://doi.org/10.1016/j.BIORTECH.2007.07.044>
- Purama, R. K., & Goyal, A. (2008d). Screening and optimization of nutritional factors for higher dextranucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640 using statistical approach. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.032>
- Purama, R. K., & Goyal, A. (2012). Effect of Nutrients by One Variable At A Time (OVAT) Approach on the Dextranucrase Production from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640. *The Internet Journal of Microbiology*, 5(1). <https://doi.org/10.5580/1bc>
- Qader, S. A. U., Aman, A., & Azhar, A. (2011). Continuous Production of Dextran from Immobilized Cells of *Leuconostoc mesenteroides* KIBGE HA1 Using Acrylamide as a Support. *Indian Journal of Microbiology*, 51(3), 279–282.

<https://doi.org/10.1007/s12088-011-0130-5>

- Queiroz, J. H. D., & Maugerio Filho, F. (1989). Optimization of the production of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* using molasses as carbon source. *Revista De Microbiologia*, 20(2), 150–156.
- Quirasco, M., López-Munguía, A., Remaud-Simeon, M., Monsan, P., & Farrés, A. (1999). Induction and transcription studies of the dextransucrase gene in *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12), 5504–5509.
- Quirasco, M., Remaud-Simeon, M., Monsan, P., & López-Munguía, A. (1999). Experimental behavior of a whole cell immobilized dextransucrase biocatalyst in batch and packed bed reactors. *Bioprocess Engineering*, 20(4), 289–295. <https://doi.org/10.1007/s004490050593>
- Razmovski, R., & Vučurović, V. (2012). Bioethanol production from sugar beet molasses and thick juice using *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on maize stem ground tissue. *Fuel*. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.07.046>
- Reh, K. D., Noll-Borchers, M., & Buchholz, K. (1996). Productivity of immobilized dextransucrase for leucrose formation. *Enzyme and Microbial Technology*, 19(7), 518–524. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(96\)80003-E](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(96)80003-E)
- Rehman, H. U., Aman, A., Zohra, R. R., & Qader, S. A. U. (2014). Immobilization of pectin degrading enzyme from *Bacillus licheniformis* KIBGE IB-21 using agar-agar as a support. *Carbohydrate Polymers*. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.073>
- Reis, C., Sousa, E., Serpa, J., Oliveira, R., Oliveira, R., Santos, J., ... Santos, J. C. S. dos. (2019). DESIGN OF IMMOBILIZED ENZYME BIOCATALYSTS: DRAWBACKS AND OPPORTUNITIES. *Química Nova*, 42(7), 768–783. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170381>
- Reischwitz, A., Reh, K. D., & Buchholz, K. (1995). Unconventional immobilization of dextransucrase with alginate. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(5), 457–461. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00091-5](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00091-5)
- Roberfroid, M., Gibson, G., Hoyles, L., McCartney, A., Rastall, R., Rowland, I., ... Léotoing, L. (2010). British Journal of Nutrition. *Nature*, 159(4052), 869–869. <https://doi.org/10.1038/159869b0>
- Roby, J. F., & Corrigan, A. J. (1977). The mechanism of dextransucrase action. Activation of dextransucrase from *Streptococcus mutans* OMZ 176 by dextran and modified dextran and the nonexistence of the primer requirement for the synthesis of dextran. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 183(2), 726–731. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(77\)90406-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(77)90406-4)
- Roby, J. F., & Eklund, S. H. (1983). Relative, quantitative effects of acceptors in the reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextransucrase. *Carbohydrate Research*, 121, 279–286. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(83\)84024-5](https://doi.org/10.1016/0008-6215(83)84024-5)
- Roby, J. F., Kimble, B. K., & Walseth, T. F. (1974). The mechanism of dextransucrase action. Direction of dextran biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 165(2), 634–640. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(74\)90291-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(74)90291-4)
- Roby, J. F., & Taniguchi, H. (1976). The mechanism of dextransucrase action. Biosynthesis of branch linkages by acceptor reactions with dextran. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 174(1), 129–135. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(76\)90331-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(76)90331-3)
- Roby, J. F., & Walseth, T. F. (1978). The mechanism of acceptor reactions of *leuconostoc mesenteroides* B-512F dextransucrase. *Carbohydrate Research*, 61(1), 433–445. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)84503-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)84503-6)
- Roby, J. F., Yoon, S. H., & Mukerjea, R. (2008). Dextransucrase and the mechanism for dextran biosynthesis. *Carbohydrate Research*, 343(18), 3039–3048. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.09.012>
- Rodrigues, L. R., Teixeira, J. A., & Oliveira, R. (2006). Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. *Biochemical Engineering Journal*, 32(3),

135–142. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.09.012>

- Rodrigues, S., Lona, L. M. F., & Franco, T. T. (2003). Effect of phosphate concentration on the production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 26(1), 57–62. <https://doi.org/10.1007/s00449-003-0330-4>
- Ryan, P. M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Caplice, N. M., & Stanton, C. (2015). Sugar-coated: Exopolysaccharide producing lactic acid bacteria for food and human health applications. *Food and Function*, 6(3), 679–693. <https://doi.org/10.1039/c4fo00529e>
- Santos, D. T., Sarrouh, B. F., Rivaldi, J. D., Converti, A., & Silva, S. S. (2008). Use of sugarcane bagasse as biomaterial for cell immobilization for xylitol production. *Journal of Food Engineering*, 86(4), 542–548. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.11.004>
- Santos, M., Rodrigues, A., & Teixeira, J. A. (2005). Production of dextran and fructose from carob pod extract and cheese whey by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f). *Biochemical Engineering Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.01.022>
- Santos, M., Teixeira, J., & Rodrigues, A. (2000). Production of dextransucrase, dextran and fructose from sucrose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f). *Biochemical Engineering Journal*, 4(3), 177–188. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(99\)00047-9](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(99)00047-9)
- Savić, T. D., Čomor, M. I., Abazović, N. D., Šaponjić, Z. V., Marinović-Cincović, M. T., Veljković, D., ... Janković, I. A. (2015). Anatase nanoparticles surface modified with fused ring salicylate-type ligands (1-hydroxy-2-naphthoic acids): A combined DFT and experimental study. *Journal of Alloys and Compounds*, 630, 226–235. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2015.01.041>
- Savić, T. D., Šaponjić, Z. V., Čomor, M. I., Nedeljković, J. M., Dramićanin, M. D., Nikolić, M. G., ... Janković, I. A. (2013). Surface modification of anatase nanoparticles with fused ring salicylate-type ligands (3-hydroxy-2-naphthoic acids): A combined DFT and experimental study of optical properties. *Nanoscale*, 5(16), 7601–7612. <https://doi.org/10.1039/c3nr01277h>
- Scheibler, C. (1874). *Zeitschrift des Vereins der deutschen Zucker-Industrie*.
- Schwab, C., Mastrangelo, M., Corsetti, A., & Gänzle, M. (2008). Formation of oligosaccharides and polysaccharides by *Lactobacillus reuteri* LTH5448 and *Weissella cibaria* 10M in sorghum sourdoughs. *Cereal Chemistry*, 85(5), 679–684. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-85-5-0679>
- Seibel, J., Jördening, H. J., & Buchholz, K. (2010). Extending synthetic routes for oligosaccharides by enzyme, substrate and reaction engineering. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 120, 163–193. [https://doi.org/10.1007/10\\_2009\\_54](https://doi.org/10.1007/10_2009_54)
- Shah, P., Sridevi, N., Prabhune, A., & Ramaswamy, V. (2008). Structural features of Penicillin acylase adsorption on APTES functionalized SBA-15. *Microporous and Mesoporous Materials*, 116(1–3), 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2008.03.030>
- Shanmugam, S. (2009). Enzyme Immobilization. In *Enzyme Technology* (pp. 109–131). New Delhi: I K International Publishing House, New Delhi, India.
- Sharma, N., Mahajan, S., & Sharma, N. (2013). Evaluation of different pretreatments versus forest wood waste and its selection as a solid substrate for enhanced cellulase production by *Paenibacillus mucilaginosus* B5. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*, 4(2), 226–236.
- Sheldon, R. A. (2007). Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 349(8–9), 1289–1307. <https://doi.org/10.1002/adsc.200700082>
- Sheldon, R. A., & van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6223–6235. <https://doi.org/10.1039/c3cs60075k>
- Shi, Q. (2016). *Synthesis and Structural Characterization of Glucooligosaccharides and Dextran from Weissella confusa Dextransucrases Synthesis and structural characterization of glucooligosaccharides and dextran from.*
- Shingel, K. I. (2002). Determination of structural peculiarities of dextran, pullulan and  $\gamma$ -

- irradiated pullulan by Fourier-transform IR spectroscopy. *Carbohydrate Research*. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(02\)00209-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00209-4)
- Shukla, R., Shukla, S., Bivolarski, V., Iliev, I., Ivanova, I., & Goyal, A. (2011). Structural characterization of insoluble dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149 in the presence of maltose. *Food Technology and Biotechnology*, *49*(3), 291–296.
- Shukla, S., & Goyal, A. (2011). Optimization of Fermentation Medium for Enhanced Glucanase and Glucan Production from *Weissella confusa*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *54*(6), 1117–1124. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132011000600006>
- Sidebotham, R. L. (1974). Dextran. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, *30*(C), 371–444. [https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(08\)60268-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(08)60268-1)
- Su, D., & Robyt, J. F. (1994). Determination of the Number of Sucrose and Acceptor Binding Sites for *Leuconostoc mesenteroides* B-512FM Dextranase, and the Confirmation of the Two-Site Mechanism for Dextran Synthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *308*(2), 471–476. <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1067>
- Suttiponpanit, K., Jiang, J., Sahu, M., Suvachittanont, S., Charinpanitkul, T., & Biswas, P. (2011). Role of Surface Area, Primary Particle Size, and Crystal Phase on Titanium Dioxide Nanoparticle Dispersion Properties. *Nanoscale Research Letters*, *6*, 27–34. <https://doi.org/10.1007/s11671-010-9772-1>
- Tanriseven, A., & Doğan, Ş. (2002). Production of isomalto-oligosaccharides using dextranase immobilized in alginate fibres. *Process Biochemistry*, *37*(10), 1111–1115. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00319-3](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00319-3)
- Thu, B., Smidsrød, O., & Skjak-Brk, G. (1996). Alginate gels - Some structure-function correlations relevant to their use as immobilization matrix for cells. In *Progress in Biotechnology* (Vol. 11, pp. 19–30). [https://doi.org/10.1016/S0921-0423\(96\)80004-9](https://doi.org/10.1016/S0921-0423(96)80004-9)
- Tischer, W., & Wedekind, F. (1999). Immobilized Enzymes: Methods and Applications BT - Biocatalysis - From Discovery to Application. In *Biocatalysis - From Discovery to Application* (Vol. 200, pp. 95–126). [https://doi.org/10.1007/3-540-68116-7\\_4](https://doi.org/10.1007/3-540-68116-7_4)
- Tong, G. E. (1973). *A METHODOLOGY FOR FERMENTATION KINETIC STUDIES-APPLIED TO DEXTRANSUCRASE FERMENTATION*. Columbia University.
- Tseng, R. L., Wu, F. C., & Juang, R. S. (2010). Characteristics and applications of the Lagergren's first-order equation for adsorption kinetics. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, *41*(6), 661–669. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2010.01.014>
- Tsuchiya, H. M., Koepsell, H. J., Corman, J., Bryant, G., Bogard, M. O., Feger, V. H., & Jackson, R. W. (1952). The effect of certain cultural factors on production of dextranase by *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of Bacteriology*, *64*(4), 521–526.
- Ul-Qader, S. A., Iqbal, L., Rizvi, H. A., & Zuberi, R. (2003). Production of dextran from sucrose by a newly isolated strain of *Leuconostoc mesenteroides* (PCSIR-3) with reference to *L. mesenteroides* NRRL B-512F. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *34*, 93–97. <https://doi.org/10.1042/ba20010020>
- Vazquez-Ortega, P. G., Alcaraz-Fructuoso, M. T., Rojas-Contreras, J. A., López-Miranda, J., & Fernandez-Lafuente, R. (2018). Stabilization of dimeric  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger* via glutaraldehyde immobilization under different conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, *110*, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.12.007>
- Vedyashkina, T. A., Revin, V. V., & Gogotov, I. N. (2005). Optimizing the conditions of dextran synthesis by the bacterium *Leuconostoc mesenteroides* grown in a molasses-containing medium. *Applied Biochemistry and Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s10438-005-0061-1>
- Veljković, V. B., Lazić, M. L., Rutić, D. J., Jovanović, S. M., & Skala, D. U. (1992). Effects of aeration on extracellular dextranase production by *Leuconostoc mesenteroides*. *Enzyme and Microbial Technology*, *14*(8), 665–668. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(92\)90044-0](https://doi.org/10.1016/0141-0229(92)90044-0)

- Vettori, M.H.P.B., Mukerjea, R., & Robyt, J. F. (2011). Comparative study of the efficacies of nine assay methods for the dextransucrase synthesis of dextran. *Carbohydrate Research*, 346(9), 1077–1082. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.02.015>
- Vettori, M.H.P.B., de Lima, C., Blanco, K. C., Cortezi, M., & Contiero, J. (2012). Performance of response surface model for increase of dextransucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* FT 045B under different experimental conditions. *Asian Journal of Biological and Life Sciences*, 1(1), 29–35.
- Vettori, M. H. P. B., Blanco, K. C., Cortezi, M., Lima, C. J. B., & Contiero, J. (2012). Dextran: effect of process parameters on production, purification and molecular weight and recent applications. *Diálogos & Ciência*, 2012(31), 171–186. <https://doi.org/10.7447/dc.2012.018>
- Vincent, M., Willemot, R. M., & Monsan, P. F. (1999). Glucansucrases : mechanism of action and structure - function relationships. *FEMS Microbiology Letters*, 23, 131–151.
- Vučurović, D. (2015). *Model Bioprocesa Proizvodnje Etanola Iz Među-I Nusproizvoda Prerade Šećerne Repe*. UNIVERZITET U NOVOM SADU, TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD.
- Vučurović, V. M., & Razmovski, R. N. (2012a). Ethanol fermentation of molasses by *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized onto sugar beet pulp. *Acta Periodica Technologica*, 43, 325–333. <https://doi.org/10.2298/APT1243325V>
- Vučurović, V. M., & Razmovski, R. N. (2012b). Sugar beet pulp as support for *Saccharomyces cerevisiae* immobilization in bioethanol production. *Industrial Crops and Products*, 39(1), 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.02.002>
- Vuillemin, M., Claverie, M., Brison, Y., Séverac, E., Bondy, P., Morel, S., ... Remaud-Siméon, M. (2016). Characterization of the first  $\alpha$ -(1→3) branching sucrases of the GH70 family. *Journal of Biological Chemistry*, 291(14), 7687–7702. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.688044>
- Waldherr, F., & Vogel, R. F. (2009). Commercial Exploitation of Homo-exopolysaccharides in Non-dairy Food Systems. In M. Ullrich (Ed.), *Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends* (pp. 313–330). Bremen, Germany: Caister Academic Press.
- Yang, C., Wu, H., Shi, J., Wang, X., Xie, J., & Jiang, Z. (2014). Preparation of dopamine/titania hybrid nanoparticles through biomimetic mineralization and titanium(IV)-catecholate coordination for enzyme immobilization. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 53(32), 12665–12672. <https://doi.org/10.1021/ie501734g>
- Yen, C. H., Tseng, Y. H., Kuo, Y. W., Lee, M. C., & Chen, H. L. (2011). Long-term supplementation of isomalto-oligosaccharides improved colonic microflora profile, bowel function, and blood cholesterol levels in constipated elderly people-A placebo-controlled, diet-controlled trial. *Nutrition*, 27(4), 445–450. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2010.05.012>
- Zannini, E., Waters, D. M., Coffey, A., & Arendt, E. K. (2016). Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(3), 1121–1135. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7172-2>
- Zhang, D. H., Peng, L. J., Wang, Y., & Li, Y. Q. (2015). Lipase immobilization on epoxy-activated poly(vinyl acetate-acrylamide) microspheres. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.03.056>
- Zhuang, W., Zhang, Y., He, L., An, R., Li, B., Ying, H., ... Lu, X. (2017). Facile synthesis of amino-functionalized mesoporous TiO<sub>2</sub> microparticles for adenosine deaminase immobilization. *Microporous and Mesoporous Materials*, 239, 158–166. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2016.09.006>



## Biografija

Miona Miljković je rođena 21. juna 1983. godine u Kruševcu, Republika Srbija, gde ja završila osnovnu školu "Vuk Karadžić" i gimnaziju "Bosa Cvetić". Školske 2002/2003. godine upisala je Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, studijski program Biohemija. Diplomirala je 2009. godine na Katedri za biohemiju, čime je stekla zvanje Diplomirani biohemičar. Doktorske akademske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju pod mentorstvom dr Suzane Dimitrijević-Branković upisala je školske 2011/2012. godine. Položila je sve ispite predviđene planom i programom doktorskih studija sa prosečnom ocenom 9,33. Završni ispit na doktorskim studijama pod nazivom: „Imobilizacija dekstran i levansaharaze poreklom iz bakterija mlečne kiseline izolovanih iz kefirnih zrna“ odbranila je 10. oktobra 2013. godine.

Od 4. januara 2012. godine je zaposlena kao istraživač na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju, u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Primena biotehnoloških metoda u održivom iskorišćenju nus-proizvoda agroindustrije“ (evidencioni broj projekta TR 31035) kojim rukovodi prof. dr Suzana Dimitrijević-Branković. U zvanje istraživač saradnik reizabrana je 31. maja 2018. godine.

Autor ili koautor je dvanaest radova u časopisima međunarodnog značaja (tri rada u M21a, četiri u M21, tri rada u M22 i dva u M23), jedanog rada u časopisu nacionalnog značaja (M51) i petnaest saopštenja na domaćim i međunarodnim skupovima (M33, M34 i M63).



## Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora Miona Miljković

Broj indeksa 4065/2011

### Izjavljujem

daje doktorska disertacija pod naslovom

**Primena agro-industrijskog otpada za dobijanje enzima dekstransaharaze i proizvodnja dekstrana i oligosaharida pomoću imobilisanih sistema**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis autora**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Miona Miljković

Broj indeksa 4065/2011

Studijski program Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

Naslov rada **Primena agro-industrijskog otpada za dobijanje enzima dekstransaharaze i proizvodnju dekstrana i oligosaharida pomoću imobilisanih sistema**

Mentor Dr Suzana Dimitrijević-Branković, redovni profesor Tehnološko-metalurškog fakulteta

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjena u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis autora**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

### **Primena agro-industrijskog otpada za dobijanje enzima dekstransaharaze i proizvodnja dekstrana i oligosaharida pomoću imobilisanih sistema**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
- ③ Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.

Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

**Potpis autora**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način odeređen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. **Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način odeređen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način odeređen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.

## 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 „Примена агро-индустријског отпада за добијање ензима декстрансахаразе и производња декстрана и олигосахарида помоћу имобилисаних система”, аутора Мионе Г. Миљковић, констатујем да утврђено подударање текста износи 14%. Овај степен подударности последица је навођења цитата, личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из његове 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, изјављујем да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

23.05.2020. године

Ментор

Проф. Др Сузана Димитријевић-Бранковић