

Univerzitet u Beogradu
Tehnološko-metalurški fakultet

Milica B. Carević

**Proizvodnja i imobilizacija mikrobnih
 β -galaktozidaza za primenu u
transgalaktozilacionim reakcijama**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016

University of Belgrade
Faculty of Technology and Metallurgy

Milica B. Carević

**Production and immobilization of
microbial β -galactosidases for
implementation in transgalactosylation
reactions**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

Mentor:

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

Članovi komisije:

.....
Dr Zorica Knežević-Jugović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

.....
Dr Maja Vukašinović-Sekulić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

.....
Dr Mirjana Antov, redovni profesor
Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet

.....
Dr Dušan Veličković, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet

Datum odbrane:

Zahvalnica

Ova disertacija urađena je na Katedri za Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, kao i na Katedri za Biohemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Rad na ovoj doktorskoj disertaciji finansirala je Republička fondacija za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka.

Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru prof. dr Dejanu Bezbradici koji mi je pružio priliku da se bavim ovom izuzetno ineresantnom tematikom u okviru svog naučno-istraživačkog rada. Neizmerno sam mu zahvalna na prenetom znanju, ali i podršci, razumevanju, svesrdnoj pomoći i angažovanju u tokom izrade ove doktorske disertacije.

Naročito zahvaljujem prof. dr Zorici Knežević-Jugović zbog velikog angažovanja kojim je omogućila da za izradu ove teze bude dostupna savremena oprema na kojoj su izvedeni brojni eksperimenti. Takođe, želela bih da zahvalim prof. dr Maji Vukašević-Sekulić koja mi je svojim znanjem i iskustvom, kao i korisnim savetima značajno pomogla u eksperimentalnom radu sa mikroorganizmima.

Iskreno zahvaljujem prof. dr Mirjani Antov na ukazanom poverenju, kao i dr Dušanu Veličkoviću na svim dobronamernim sugestijama, aktivnom učestvovanju u eksperimentalnom radu, kao i omogućavanju analize uzoraka u institutu INRA (Nant, Farcuska). Takođe, zahvaljujem se H  l  ne Rogniaux i David Ropartz sa instituta INRA (Nant, Farcuska) na pomoći u analizi dobijenih rezultata.

Veliko hvala kolegama doktorandima, profesorima, kao i tehničkom osoblju Katedre za Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju na prijatnoj radnoj atmosferi. Posebno se zahvaljujem kolegama i prijateljima Sonji, Mariji i Mladenu na bezrezervnoj podršci i pomoći tokom svih ovih godina. Takođe, neizmerno hvala Katarini i Ani na nesebičnoj pomoći u toku eksperimentalnog rada.

Konačno, ogromnu zahvalnost dugujem svojoj porodici, Nemanji i prijateljima na pruženoj podršci, razumevanju i na svemu što su do sada činili za mene.

Proizvodnja i imobilizacija mikrobnih β -galaktozidaza za primenu u transgalaktozilacionim reakcijama

IZVOD

U okviru ove doktorske disertacije ispitan je veliki broj mikroorganizama iz kolekcije kultura Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu u cilju izbora najefikasnijeg producenta β -galaktozidaze. Kao najbolji producent sa aspekta aktivnosti, ali i karakteristika dobijenog enzima izdvojila se probiotska vrsta *Lactobacillus acidophilus*. Stoga, u cilju poboljšanja procesa produkcije β -galaktozidaze, u nastavku rada izvršena je detaljna optimizacija sastava hranljivih podloga, parametara procesa proizvodnje, kao i izolovanja enzima. Okarakterisana su najbitnija svojstva izolovane β -galaktozidaze iz *L. acidophilus* (temperaturna i pH aktivnost/stabilnost, kinetički parametri) na osnovu čega je potom upoređena sa komercijalnim preparatom β -galaktozidaze iz *A. oryzae*. Oba enzima primenjena su u reakciji transgalaktozilacije za sintezu galakto-oligosaharida. Imajući u vidu kompleksnost ove reakcije, identifikovani su i ispitanii uticaji ključnih reakcionih parametara: koncentracije enzima i laktoze, kao i vremena trajanja reakcije. Pored optimizacije prinosa, određena je i detaljna struktura dobijenih galakto-oligosaharida. U tu svrhu razvijena je brza i efikasna jednostepena metoda primenom spektrometrije jonske pokretljivosti spregnute sa masenom spektroskopijom (IMS/MS). Ustanovljeno je da galakto-oligosaharidi dobijeni u reakcijama katalizovanim pomoću β -galaktozidaze iz *A. oryzae* uglavnom sadrže $\beta(1\rightarrow6)$ i $\beta(1\rightarrow3)$ glikozidne veze, dok galakto-oligosaharidi dobijeni pomoću β -galaktozidaze iz *L. acidophilus* sadrže $\beta(1\rightarrow6)$ i $\beta(1\rightarrow4)$ veze. Takođe, utvrđeno je da su dobijeni proizvodi različitih stepena polimerizacije, ali i što je najbitnije da se udeo pojedinih veza menja sa vremenom reakcije. U cilju poboljšanja stabilnosti ispitivanih enzimskih preparata, i njihove implementacije u kontinualnim reaktorskim sistemima, izvršena je imobilizacija enzima na čvrste nosače. Ispitano je više modifikovanih i nemođifikovanih nosača za imobilizaciju različitih karakteristika posredstvom različitih mehanizama vezivanja, pri čemu je pokazano da su za imobilizaciju oba enzima najpogodniji nosači sa primarnim amino grupama, koje omogućavaju adsorbciju enzima elektrostatičkim interakcijama.

Najbolji rezultati u slučaju komercijalnog enzima iz *A. oryzae* postignuti su sa komercijalnim nosačem Purolite® A109, pri čemu je postignuto znatno unapređenje procesa hemijskom aktivacijom karboksilnih grupa na površini enzima, što je dovelo do formiranja kovalentnih veza između nosača i enzima. Ovom imobilizacijom postignuto je značajno povećanje termičke i operativne stabilnosti, ali i povećanje specifičnosti prema reakciji transgalaktozilacije. Sa druge strane, izolovani enzim iz *L. acidophilus* uspešno je imobilisan na komercijalni nosač Lifetech ECR8409. Imobilisani preparati β -galaktozidaza potom primenjeni su u šaržnom i bioreктору sa fluidizovanim slojem enzima i recirkulacijom supstrata. U oba reaktora izvršena je optimizacija relevantnih procesnih parametara, a rezultati su pokazali da se reakcije u oba enzima odvijaju približno jednakom brzinom, ali je stabilnost enzima i reaktoru sa fluidizovanim slojem povećana, pa se imobilisani enzim može koristiti u većem broju reakcionih ciklusa. U poslednjem delu ove doktorske disertacije, ispitana je mogućnost korišćenja alternativnih akceptora galaktozil ostataka, salicina i sorbitola, u reakciji transgalaktozilacije, pri čemu kao proizvod reakcije nastaju nova fiziološki aktivna jedinjenja. Oba enzima pokazala su visok afinitet prema sintezi novih proizvoda, a osnovni parametri reakcije optimizovani su primenom metode statističkog planiranja eksperimenata, pri čemu su ustanovljeni najznačajniji uticaji ključnih parametara, ali i njihove međusobne interakcije. U oba slučaja utvrđeno je da su najbolji prinosi postignuti pri visokim koncentracijama laktoze, kao i u prisustvu akceptora (salicina ili sorbitola) u višku.

Ključne reči: β -galaktozidaza, produkcija enzima, imobilizacija, reakcija transgalaktozilacije, galakto-oligosaharidi

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija

UDK broj: 577.15:664.165

Production and immobilization of microbial β -galactosidases for implementation in transgalactosylation reactions

ABSTRACT

In this thesis, a vast number of different microorganisms from culture collections of Faculty of Technology and Metallurgy was examined, with aim to choose the most efficient producer of β -galactosidase. The best producer, in terms of both activity and enzyme characteristics, proved to be a probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus*. Therefore, in order to improve the β -galactosidase production process, the detailed optimizations of the culture media composition and the fermentation parameters, as well as the methods and conditions for enzyme isolation, were carried out. Thereafter, obtained *L. acidophilus* enzyme preparation was thoroughly characterized, and compared to the commercially available preparation of β -galactosidase from *A. oryzae*. Later on, both enzymes were assessed for their transgalactosylation activity in galacto-oligosaccharide synthesis reaction. Given the complexity of these reactions, the key reaction parameters (enzyme and lactose concentration, and reaction time) have been identified and consequently optimized in order to achieve maximum product yields. Moreover, complete elucidation of galacto-oligosaccharides structure was accomplished using a novel one-step method, based on ion-mobility spectrometry-tandem mass spectrometry (IMS-MS/MS). Interestingly, it was observed that galacto-oligosaccharides synthesized by different enzymes comprised of different degrees of polymerization and types of linkages. It was shown that β -galactosidase from *A. oryzae* has the highest affinity towards formation of $\beta(1\rightarrow3)$ and $\beta(1\rightarrow6)$ linkages, while β -galactosidase isolated from *L. acidophilus* prefers $\beta(1\rightarrow6)$ and $\beta(1\rightarrow4)$ glycosidic linkages. Also, it was concluded that the occurrence of different linkages varies during the reaction course. In the next set of experiments, in order to improve the stability of the abovementioned enzyme preparations, and thus ensure their implementation in continuous reactor systems, immobilization of enzymes on solid supports was performed. Therefore, several modified and unmodified immobilization carriers and immobilization methods were assayed. Nevertheless, the commercial carriers

bearing primary amino groups, hence favoring enzyme adsorption through formation of electrostatic interactions, proved to be immobilization carriers of choice for both enzymes. The best results in the case of β -galactosidase from *A. oryzae* were achieved with the commercial carrier Purolite A109, whereby a substantial improvement of the immobilization process was achieved owing to chemical activation of the carboxyl groups on the surface of the enzyme, leading to the formation of covalent bonds between the carrier and the enzyme. This immobilized preparation showed a significant increase in both thermal and operational stability, and more importantly in specificity towards the transgalactosylation reaction. On the other hand, the enzyme isolated from *L. acidophilus* was successfully immobilized on a commercial carrier Lifetech ECR8409. Immobilized preparations of β -galactosidase were subsequently applied in a batch and fluidized bed bioreactors. After the optimization of relevant process parameters, galacto-oligosaccharide synthesis was carried out, and the results showed that reaction kinetics was similar in both bioreactor systems, although the stability of the immobilized preparation was better in fluidized bed reactor. has been increased, however, the immobilized enzyme can be used in a number of reaction cycles. In the final part of this thesis, the possibility of using alternative galactosyl acceptors, namely salicin and sorbitol was examined, with aim of producing two novel physiologically active compounds. Finally, both enzymes showed a high affinity towards the synthesis of new products. Therefore, the main reaction parameters were optimized using the response surface methodology, ensuring the insight in the most significant parameter influences, as well as their mutual interactions. In both cases it has been found out that the best yields were achieved at high concentrations of lactose, as well as in the presence of an excess of acceptors (salicin or sorbitol).

Keywords: β -galactosidase, enzyme production, immobilization, transgalactosylation, galacto-oligosaccharides

Academic Expertise: Engineering technology

Major in: Biochemical Engineering and Biotechnology

UDC number: 577.15:664.165

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DEO.....	4
2.1. β -Galaktozidaza.....	4
2.1.1. Svojstva mikrobnih β -galaktozidaza.....	5
2.1.2. Struktura i mehanizam dejstva β -galaktozidaza.....	10
2.1.3. Primena β -galaktozidaza	18
2.2. Proizvodnja mikrobnih β -galaktozidaza	26
2.2.1. Odabir proizvodnog mikroorganizma.....	26
2.2.2. Optimizacija sastava hranljive podloge	28
2.2.3. Izolovanje i prečišćavanje enzima	33
2.2.3.2 Prečišćavanje mikrobnih β -galaktozidaza	43
2.3. Galakto-oligosaharidi (GOS)	46
2.3.1. Proizvodnja galakto-oligosaharida.....	47
2.4. Imobilizacija β -galaktozidaze	56
2.4.1. Imobilizacija adsorpcijom.....	57
2.4.2. Obuhvatanje enzima nosačem.....	59
2.4.3. Kovalentna imobilizacija	60
2.4.4. Imobilizacija umrežavanjem enzima	62
2.5. Reaktori za sintezu galakto-oligosaharida	63
2.6. Primena galakto-oligosaharida.....	67
2.6.1. Fiziološka aktivnost galakto-oligosaharida	67
2.7. Transgalaktozilacija u prisustvu alternativnih akceptora	77
3. EKSPERIMENTALNI DEO	80
3.1. Materijali.....	80
3.2. Metode.....	82
3.2.1. Preliminarna selekcija mikrobnih producenata β -galaktozidaza.....	82
3.2.2. Određivanje aktivnosti β -galaktozidaze.....	83
3.2.3. Određivanje koncentracije proteina	84

3.2.4. Optimizacija uslova fermentacije.....	85
3.2.5. Određivanje broja ćelija.....	86
3.2.6. Centralni kompozitni rotabilni plan i metoda odzivnih površina.....	86
3.2.7. Optimizacija uslova fermentacije primenom centralnog kompozitnog rotabilnog eksperimentalnog plana i metode odzivnih površina.....	88
3.2.8. Metode za razaranje ćelija.....	88
3.2.9. Ispitivanje temperaturnog profila dobijenog enzima.....	90
3.2.10. Ispitivanje pH profila dobijenog enzima.....	90
3.2.11. Ispitivanje temperaturne stabilnosti enzima.....	90
3.2.12. Ispitivanje pH stabilnosti enzima.....	91
3.2.13. Ispitivanje aktivnosti enzima u prisustvu jona metala.....	91
3.2.14. Ispitivanje kinetičkih parametara enzima.....	91
3.2.15. Određivanje koncentracije glukoze GOD-PAP reagensom.....	92
3.2.16. Prečišćavanje enzima i određivanje molarne mase enzima.....	93
3.2.17. Enzimska sinteza galakto-oligosaharida.....	93
3.2.18. HPLC kvantitativna analiza proizvoda reakcije.....	93
3.2.19. Karakterizacija proizvoda spektrofotometrijom jonske pokretljivosti.....	93
3.2.20. Imobilizacija enzima.....	94
3.2.21. Sintaza galakto-oligosaharida sa imobilisanim enzimom.....	97
3.2.22. Određivanje operativne stabilnosti biokatalizatora.....	97
3.2.23. Sintaza galakto-oligosaharida u reaktoru sa fluidizovanim slojem.....	97
3.2.24. Sintaza galaktozida salicina.....	98
3.2.25. HPLC analiza uzoraka galaktozida salicina.....	98
3.2.26. Sintaza galaktozida sorbitola.....	99
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	100
4.1. Proizvodnja mikrobnih β -galaktozidaza.....	100
4.1.1. Preliminarna selekcija mikrobnih producenata β -galaktozidaza.....	100
4.1.2. Ispitivanje kinetike mikrobnog rasta i biosinteze β -galaktozidaza.....	102
4.1.3. Optimizacija uslova gajenja.....	104
4.1.4. Optimizacija sastava podloge.....	105
4.1.5. Optimizacija uslova fermentacije primenom centralnog kompozitnog rotabilnog eksperimentalnog plana i metode odzivnih površina.....	108

4.1.6. Ekstrakcija intracelularne aktivnosti	117
4.1.7. Karakterizacija β -galaktozidaze iz <i>L. acidophilus</i>	124
4.2. Karakterizacija β -galaktozidaze iz <i>A. oryzae</i>	135
4.2.2. Temperaturna i pH stabilnost	136
4.2.3. Stabilnost enzima u prisustvu različitih jona	139
4.2.4. Određivanje kinetičkih parametara	139
4.3. Enzimaska sinteza galakto-oligosaharida.....	142
4.3.1. Sinteza galaktooligosaharida pomoću β -galaktozidaze iz <i>A. oryzae</i>	143
4.3.2. Sinteza galakto-oligosaharida pomoću β -galaktozidaze iz <i>L. acidophilus</i>	155
4.4. Imobilizacija β -galaktozidaza	161
4.4.1. Imobilizacija β -galaktozidaze iz <i>A. oryzae</i>	161
4.4.2. Imobilizacija β -galaktozidaze iz <i>L. acidophilus</i>	187
4.5. Sinteza galakto-oligosaharida u različitim reaktorskim sistemima	194
4.5.1. Sinteza galakto-oligosaharida u šaržnom reaktoru	194
4.5.2. Sinteza galakto-oligosaharida u reaktoru sa fluidizovanim slojem.....	197
4.5.3. Hidrodinamika i prenos mase u reaktorima.....	199
4.6. Sinteza novih bioaktivnih galaktozida korišćenjem alternativnih galaktozil akceptora	209
4.6.1. Sinteza galaktozida salicina.....	209
4.6.2. Sinteza galaktozida sorbitola.....	220
5. ZAKLJUČAK.....	232
6. REFERENCE.....	235

1. UVOD

Enzim β -galaktozidaza (EC 3.2.1.23, β -D-galaktozid-galaktohidrolaza), poznatija pod trivijalnim nazivom laktaza, predstavlja enzim koji katalizuje hidrolizu terminalnih, neredukujućih β -D-galaktozidnih ostataka u različitim jedinjenjima. Iako nije strogo specifična, njena primarna biološka funkcija jeste hidroliza laktoze do monomernih jedinica (glukoze i galaktoze), što je čini izuzetno važnim enzimom u prehrambenoj industriji, pre svega u industriji mleka i mlečnih proizvoda. Hidrolizom laktoze, osnovnog konstitutivnog šećera mleka i surutke, omogućeni su značajni pozitivni efekti na zdravlje ljudi i životnu sredinu. Međutim, pod određenim reakcionim uslovima (visoka koncentracija šećera, niska aktivnost vode, visoka temperatura), ona može katalizovati i reakciju sinteze različitih galaktozida. Na ovaj način nastaje širok spektar funkcionalno aktivnih jedinjenja među kojima su najpoznatiji galakto-oligosaharidi (GOS). Galakto-oligosaharidi obuhvataju raznorodnu grupu nesvarljivih ugljenih hidrata najčešće izgrađenih od glukozne i nekoliko galaktoznih jedinica, koji su prepoznati kao prebiotici zahvaljujući tome što su nesvarljivi, i podstiču proliferaciju i aktivnost korisnih bakterija mikrobiote creva, dok sa druge strane vrše inhibiciju rasta loših bakterija onemogućavajući njihovu adheziju na zidove creva. U skladu sa tim, oni imaju ključnu ulogu u omogućavanju normalnog funkcionisanja ljudskog organizma, pre svega u olakšavanju varenja laktoze, poboljšanju resorpcije mineralnih materija, snižavanju nivoa holesterola, smanjenju rizika od raka debelog creva, kao i u unapređenju imunog sistema domaćina. Ova jedinjenja dobijena su u reakcijama konverzije laktoze kao jedinog supstrata, međutim ukoliko su u reakcionoj smeši prisutna i druga jedinjenja sa slobodnim hidroksilnim grupama (drugi šećeri, šećerni ili drugi alkoholi, aromatična jedinjenja i drugo) β -galaktozidaze će sintetisati i druge funkcionalno aktivne galaktozide poboljšanih karakteristika. Poslednjih godina sve više pažnje posvećuje se razvoju galaktozida kratkog lanca kod kojih su akceptor galaktoze alkoholi ili aromatična jedinjenja sa slobodnim hidroksilnim grupama, za koje se veruje da predstavljaju inhibitore galektina, čija je povećana sekrecija u korelaciji sa nastankom brojnih bolesti kao što su različiti

tumori, bolesti srca i hematološki problemi. Ipak, ova polja upotrebe su još uvek u početnoj fazi istraživanja.

Enzim β -galaktozidaza može biti različitog porekla - biljnog, životinjskog ili mikrobnog. Međutim, najznačajniji među njima su mikrobnii postupci proizvodnje, zbog lake fermentacije, velike brzine rasta i razmnožavanja ćelija, visokih prinosa, aktivnosti, kao i stabilnosti enzima. Kao posledica velikog komercijalnog interesa za ovaj enzim, opisane su različite metode dobijanja i prečišćavanja dobijenih enzima iz različitih mikroorganizama. Naročito važnim potencijalnim izvorima β -galaktozidaza smatraju se bakterije mlečne kiseline, koje privlače pažnju najviše zahvaljujući svom statusu bezbednih za upotrebu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, čime se omogućava neometano korišćenje enzima bez primene komplikovanih metoda prečišćavanja. Takođe, smatra se da su jedinjenja, a pre svega galakto-oligosaharidi, sintetisani pomoću ovako dobijenih enzima 'skrojeni' po meri korisnih bakterija mikrobiote creva i kao takvi poseduju veći prebiotski potencijal.

U okviru ove doktorske disertacije biće izvršeno ispitivanje mogućnosti proizvodnje β -galaktozidaze pomoću različitih komercijalnih mikrobnii sojeva iz kolekcije kultura katedre za Biohemijisko inženjerstvo i biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta. Po izvršenom odabiru odgovarajućii proizvodnih mikroorganizama, pristupiće se optimizaciji sastava hranljive podloge i uslova gajenja u cilju poboljšanja proizvodnje enzima. Statistička obrada dobijenii rezultata pružiće uvid u uticaj svakog od ispitivaniih parametara na biosintezu enzima, kao i u njihove međusobne interakcije. Imajući u vidu da su β -galaktozidaze intracelularni enzimi biće primenjene različite mehaničke i nemehaničke metode izolovanja, kao i metode prečišćavanja enzima. Dobijeni enzim će biti detaljno okarakterisan, i upoređen sa dostupnim komercijalnim preparatima, kako bi u narednim fazama ove disertacije bio primenjen za dobijanje funkcionalno aktivnih jedinjenja.

Iako je β -galaktozidaza na prvom mestu poznata kao izuzetno važan hidrolitički enzim, fokus ove disertacije biće na iskorišćenju njene transgalaktozilacione

sposobnosti, za razvoj procesa proizvodnje funkcionalno aktivnih galakto-oligosaharida. U cilju postizanja što boljih prinosa, biće izvršena detaljna optimizacija ključnih reakcionih parametara (koncentracija enzima i laktoze, pH, temperatura, trajanje reakcije). U ovom delu doktorske disertacije posebna pažnja biće obraćena na razvoj nove adekvatne metode za karakterizaciju strukture dobijene kompleksne smeše proizvoda i tumačenje dobijenih rezultata.

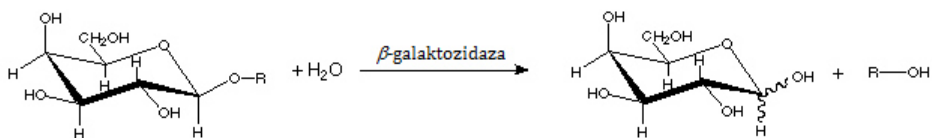
U narednoj fazi biće ispitana mogućnost imobilizacije β -galaktozidaza, na nekoliko komercijalnih i modifikovanih nosača, primenom različitih tehnika, a aktivnosti dobijenih imobilisanih enzima biće ispitane u reakciji sinteze galakto-oligosaharida. Najbolji enzimski preparati, sa aspekta postignutog prinosa biće upotrebljeni u dva reaktorska sistema (šaržni reaktor i reaktor sa fluidizovanim slojem). S obzirom na to da je u protočnim reaktorskim sistemima moguće postići veću produktivnost po masi upotrebljenog enzima, u ovom delu istraživanja biće optimizovan reaktorski sistem i operativni uslovi za izvođenje prethodno navedenih reakcija. Produktivnost imobilisanog sistema biće ispitana pri različitim režimima rada bioreaktora i upoređena sa performansama šaržnog postupka.

Imajući u vidu izuzetan prebiotski potencijal jedinjenja kao što su galakto-oligosaharidi, laktuloza i laktitol, kao i njihovih analoga, u poslednjoj fazi ovog rada je biće ispitana mogućnost korišćenja alternativnih akceptora galaktozil ostatka u cilju sintetisanja novih raznovrsnijih smeša potencijalnih prebiotika (galakto-oligosaharida i alkohol-galaktozida), koji će zahvaljujući različitoj prirodi akceptora imati i dodatna fiziološka dejstva.

2. TEORIJSKI DEO

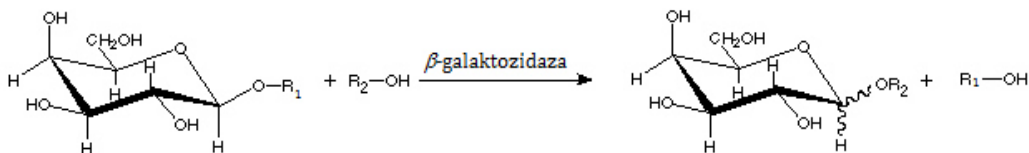
2.1. β -Galaktozidaza

Enzim β -galaktozidaza ili β -D-galaktozid-galaktohidrolaza (EC.3.2.1.23), predstavlja enzim koji katalizuje hidrolizu terminalnih, neredukujućih β -D-galaktozidnih ostataka u različitim β -D-galaktozidima (Slika 2.1). Osnovni prirodni supstrati ovog enzima jesu laktoza, disaharidi (alolaktoza i galaktobioza) i polimeri galaktoze (galaktani).¹⁻³ Međutim, β -galaktozidaze mogu katalizovati hidrolizu i drugih jedinjenja koja sadrže galaktozu, kao što su sintetički supstrati *o*-NPG i X-gal, ili pak sfingolipidi, glukoproteini, muko-polisaharidi, gangliozi. ⁴⁻⁶



Slika 2.1. Reakcija hidrolize katalizovana β -galaktozidazama

Interesantno je istaći da je u ovu grupu enzima svrstano i nekoliko β -galaktozidaza koje ne katalizuju reakciju hidrolize laktoze ili su pak inhibirani u njenom prisustvu. ⁷ Pored hidrolazne aktivnosti, pod specifičnim uslovima sredine (visoka koncentracija supstrata, povišena temperatura, smanjena aktivnost vode) β -galaktozidaze pokazuju sposobnost transgalaktozilacije, odnosno sinteze jedinjenja prenošenjem molekula galaktoze na slobodnu hidroksilnu grupu šećera, alkohola ili pak nekih aromatičnih jedinjenja umesto na molekul vode (Slika 2.2).



Slika 2.2. Reakcija transgalaktozilacije katalizovana β -galaktozidazama

Nastala jedinjenja uglavnom poseduju izražena funkcionalna svojstva, a među njima najznačajnija i najbolje ispitana grupa jedinjenja su galakto-oligosaharidi.

β -Galaktozidaze su veoma rasprostranjene u prirodi, i mogu biti biljnog, životinjskog i mikrobnog porekla, od čega u mnogome zavise i njihova svojstva. Pokazano je da u biljnim tkivima imaju funkciju regulisanja rasta i zrenja plodova, a dosada su izolovane iz badema, breskvi, kajsija, jabuka, jagoda, paradajza, soje i kafe. ^{2, 8-10} Kod životinja prisutne su prisutne u digestivnom traktu pasa, zečeva, ovaca, pacova, prisutne su i kod čoveka. ⁸ Ipak, sa aspekta komercijalne proizvodnje najznačajniji su mikrobni izvori β -galaktozidaza, zbog lake fermentacije, velike brzine rasta i razmnožavanja ćelija, visokih prinosa, aktivnosti, kao i stabilnosti enzima. Kao posledica velikog komercijalnog interesa za ovaj enzim, opisane su različite metode dobijanja i prečišćavanja dobijenih enzima iz različitih mikroorganizama.¹¹ Nekolicina ovih β -galaktozidaza su sekvencionirane i klonirane, a izvršena je i njihova ekspresija u drugim domaćinima. ^{12, 13} Zahvaljujući razvoju genetičkog inženjeringa, omogućena je manipulacija proizvodnog mikroorganizma u cilju lakšeg dobijanja enzima poboljšanih karakteristika adaptiranih za specifičnu primenu i određene reakcione uslove. ¹⁴ Poslednjih godina, sve veću pažnju naučne zajednice dobija eksploatacija termostabilnih i mikroorganizama aktivnih na niskim temperaturama, kao potencijalnih producenata β -galaktozidaza poboljšanih karakteristika. ^{14, 15} Iako je najduže i najpodrobnije izučavana β -galaktozidaza iz bakterije *Echerichia coli*, njena šira komercijalna upotreba ograničena je zbog toksičnosti samog mikroorganizma. Stoga, komercijalno prisutni preparati β -galaktozidaze dobijeni su iz sigurnih izvora, pre svega kvasaca *Kluyveromyces lactis* i *Kluyveromyces fragilis*, plesni *Aspergillus acidulans* i *Aspergillus oryzae* i *Bacillus* vrsta koje imaju GRAS status (Generally Recognized As Safe) što podrazumeva da su sigurne za korišćenje u industriji hrane i farmaceutika.

2.1.1. Svojstva mikrobnih β -galaktozidaza

β -Galaktozidaze imaju širok spektar producenata među mikroorganizmima, što za sobom povlači veliku raznovrsnost po pitanju njihovih svojstava (Tabela 2.1). Većina mikrobnih β -galaktozidaza (bakterije, kvasci) su intracelularni enzimi, međutim nekolicina β -galaktozidaza, uglavnom poreklom iz plesni, mogu biti

ekstracelularni enzimi. Karakteristike enzima, poput temperaturnog i pH optimuma, kao i njihova stabilnost, diktiraju polja primene ovih enzima. Tako su, na primer, fungalne β -galaktozidaze pogodnije za hidrolizu kisele surutke, čiji je pH manji od 5, imajući u vidu da im je optimum ovih enzima u kiselom opsegu (pH 2,5-5). Ponašaju se kao termostabilni enzimi, sa relativno širokim temperaturnim optimumom, ali se na temperaturama višim od 60 °C inaktiviraju i denaturišu. Zato se industrijski procesi koji koriste ovaj enzim projektuju za temperature do 50 °C. Fungalne β -galaktozidaze su sklone inhibiciji proizvodima reakcije. U većoj meri zastupljena je kompetitivna inhibicija galaktozom, ali se ovaj nedostatak može prevazići kontinualnim uklanjanjem proizvoda iz reakcione smeše ili povišenom koncentracijom enzima. Za njihovo delovanje nije neophodno prisustvo jona kao kofaktora, dok sa druge strane u prisustvu jona Ca^{2+} i jona teških metala, kao i kod svih ostalih β -galaktozidaza, uostalom, dolazi do njihove inhibicije. Najznačajniji producenti fungalnih β -galaktozidaza su *A. oryzae*, *A. niger* i *A. aculeatus*, čiji su preparati danas komercijalno dostupni (npr. Tolerase, Lactase F, Biolactase F, Rapidase, Pectinex Ultra i drugi).

β -Galaktozidaze izolovane iz kvasaca i bakterija imaju pH optimum u neutralnim sredinama (pH 6-7), što ih čini pogodnim za hidrolizu laktoze iz mleka i slatke surutke (pH oko 7). β -Galaktozidaze iz kvasaca imaju niži temperaturni optimum između 30-35 °C, a na temperaturama višim od 55 °C se brzo inaktiviraju. Za njihovu aktivnost, neophodno je prisustvo kofaktora, najčešće dvovalentnih katjona. Naime, β -galaktozidaza iz *Kluyveromyces lactis* pokazuje povećanu aktivnost u prisustvu Mn^{2+} i Na^+ , dok su za aktivaciju β -galaktozidaza *K. marxianus* neophodni Mg^{2+} , Mn^{2+} i K^+ . Kao i kod fungalnih β -galaktozidaza zastupljena je inhibicija glukozom i galaktozom, ali je inhibicija galaktozom više izražena. Najznačajniji producenti β -galaktozidaza kvasaca potiču iz roda *Kluyveromyces* (Maxilact, Lactozym, Lactase NL i drugi). Bakterijske β -galaktozidaze, međutim, pokazuju visoku aktivnost i dobru stabilnost enzima. Mnoge bakterije proizvode ovaj enzim, ali se tek mali broj smatra bezbednim za humanu upotrebu. Najbolje izučena bakterijska β -galaktozidaza je poreklom iz *E. coli*, koja je poslužila kao model za razumevanje dejstva ovih enzima, ali nema naročiti industrijski značaj.

Tabela 2.1 Karakteristike mikrobnih β -galaktozidaza

Mikroorganizmi	T (°C)	t _{1/2} (min)	pH	Km (mM)	M (kDa)	Aktivatori	Inhibitori	Sp. akt (IU/mg)	Ref.
Bakterije									
<i>Arthrobacter psychrolactophilus</i>	10	60(30 °C)	8	4,21	130	-	-	20,4	16
<i>Bacillus circulans</i>	50	-	5-6	-	67	-	-	5,1	17
<i>Bacillus licheniformis</i>	50	-	6,5	-	-	-	-	-	18
<i>Bacillus megaterium</i>	40	-	6-9	12,6	120	-	-	59,9	19
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	70	540(70 °C)	7	2,96	70	-	Fe ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Pb ²⁺ , Sn ²⁺	125	20
<i>Bacillus subtilis</i>	35	120(35 °C)	8	-	120	Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Ca ²⁺ , Fe ²⁺ , acetilcistein	EDTA, Hg ²⁺ , Cu ²⁺ , Ag ⁺ , I ⁻	5,79	21
<i>Lactobacillus sakei</i>	55	60(42 °C)	6,5-7,5	20	110	Mg ²⁺	-	83	22
<i>Lactobacillus plantarum</i>	55-60	-	7	29	107	Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , 10 mM urea, DTT, merkaptioetanol	EDTA, 100mM urea, DTT, merkaptioetanol	-	23
<i>Lactobacillus pentosus</i>	60-65	-	7	38	105	Mg ²⁺	-	97	24
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	45-55	45 (50 °C)	7-8	19,1	230	Na ⁺ , K ⁺	Ca ²⁺ , Zn ²⁺	193	25
<i>Lactobacillus fermentum</i>	45-50	-	~7	27	105	Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , etanol	-	-	26
<i>Lactobacillus reuteri</i>	50	-	6-8	31	105	Na ⁺ , K ⁺ , Mn ²⁺	-	180	27
<i>Lactobacillus acidophilus (LacZ)</i>	37	40(45 °C)	6	88,9	76,5	-	-	43,2	28
<i>Lactobacillus acidophilus (LacLM)</i>	55	2880(30 °C)	6,5-8	4,04	105	Mg ²⁺	-	230	29
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	50	-	6,5	1,27	107	̂-merkaptioetanol cistein	Hg ²⁺ , Fe ²⁺ , Ag ⁺	-	30
<i>Lactobacillus crispatus</i>	45	-	6,5	14,3	-	Fe ²⁺ , Mn ²⁺	Zn ²⁺	-	31
<i>Lactobacillus helveticus</i>	42	-	6,5	-	250	-	-	-	32
<i>Lactobacillus salivarius</i>	50	10(65 °C)	5	-	30	Ca ²⁺ , Zn ²⁺	Cu ²⁺ , Mn ²⁺ , Fe ²⁺	5,312	33

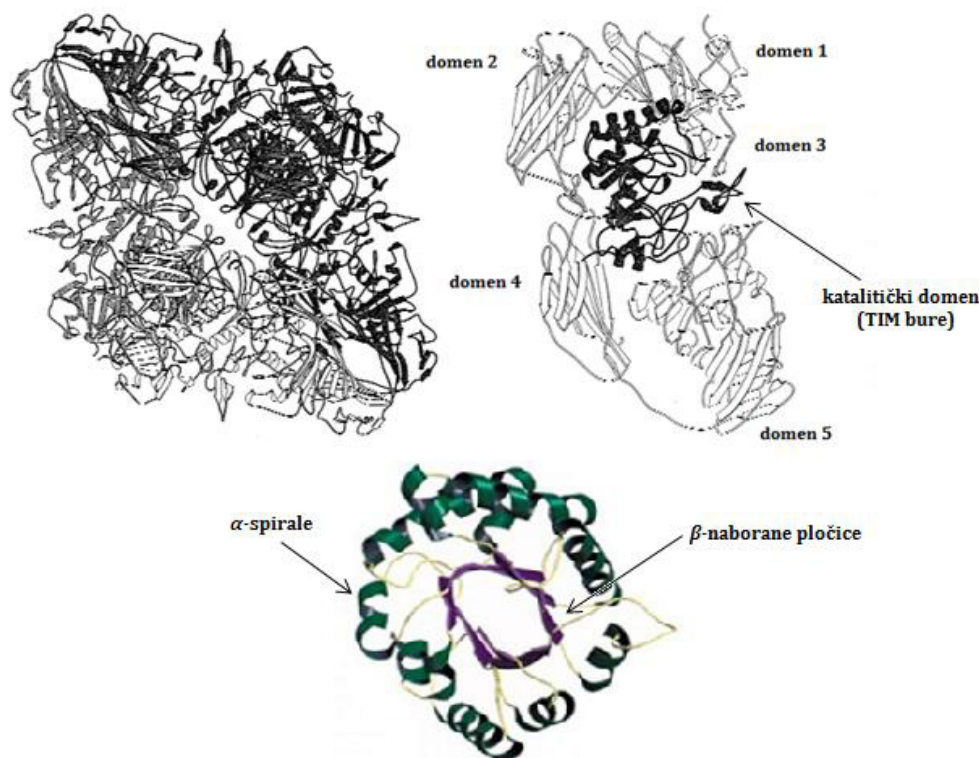
<i>Bifidobacterium infantis</i>	50	120(60 °C)	7,5	73,8	470	Na ⁺ , K ⁺	divalentni joni, Cr ³⁺ , EDTA, urea	569	34
<i>Bifidobacterium adultus</i>	50	10(50 °C)	6,0	60	235	-	-	-	35
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	45	40(45 °C)	6,5					-	36
<i>Enterobacter cloacae</i>	50	-	9	2,805*	442 ³⁷	Mg ²⁺ , CTAB	EDTA	14,35	38
<i>Echerichia coli</i>	40	-	7,2	-	540	-	-	-	39
Kvasci									
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	75	180(85 °C)	6,5	-	-	-	-	116	40
<i>Kluyveromyces lactis</i>	40	-	7	20	236/472	Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺ , Fe ²⁺	-	-	41
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	37	-	6,8	4,0	251	-	-	790,6	42
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	50	180(55 °C)	6,5	1,70	-	-	-	102,8	43
<i>Cryptococcus laurentii</i>	60	10 (58 °C)	4,3	11,4	200	-	Hg ²⁺ , Ag ⁺ , 2-merkaptetanol	12	44
<i>Bullera singularis</i>	50	120(45 °C)	5	0,58	53	-	Ag ⁺ , SDS	56	45
Plesni									
<i>Aspergillus aculeatus</i>	55-60	-	5,4	-	-	-	-	24	46
<i>Aspergillus fonsecaeus</i>	-	-	2,6-4,5	61	126	-	-	-	47
<i>Aspergillus oryzae</i>	50	-	4,5	-	-	-	-	40,02	48
<i>Aspergillus niger</i>	70	-	3,5	85-125	124/150 /173	-	-	-	49
<i>Penicillium chrysogenum</i>	30	-	4	1,81	270	-	-	5,84	50
<i>Penicillium canescens</i>	-	-	4,2-4,5	1,0	110	-	-	-	51
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	47-50	-	6,7-7,2	18,2	220	-	-	-	52
<i>Teratosphaeria acidotherma</i>	70/80	-	1,0/4,5	-	180	-	-	-	53

Komercijalno su dostupne β -galaktozidaze iz *B. circulans* (Biocon NTL 3000), ali β -galaktozidaze bakterije mlečne kiseline, sve više dobijaju na značaju poslednjih godina. Zahvaljujući činjenici da poseduju GRAS status, one se mogu koristiti bez potrebe za dodatnim metodama prečišćavanja. Takođe, imajući u vidu da su dobijene iz probiotskih izvora, mogu poslužiti za dobijanje fiziološki aktivnih jedinjenja specifične strukture, koje poseduju povećan prebiotski potencijal. Garman i saradnici su izučavali β -galaktozidaze iz različitih vrsta bakterija mlečne kiseline i tom prilikom su zaključili da dvovalentni katjoni (Mg^{2+} i Mn^{2+}) imaju pozitivan uticaj na aktivnost β -galaktozidaze, dok uticaj jednovalentnih katjona (K^+ i Na^+) može biti pozitivan ili negativan, što zavisi od soja bakterije. Još jedna od važnih karakteristika bakterijskih β -galaktozidaza jeste postojanje više tipova enzima, koji poseduju različita svojstva, a samim tim imaju i različita polja primene. Tako, na primer, postoje 4 tipa β -galaktozidaza iz *B. circulans*, a bakterije mlečne kiseline *L. acidophilus* i *Bif. bifidum* produkuju dva, odnosno tri tipa β -galaktozidaza, redom. Poslednjih godina, sve više pažnje se posvećuje izolovanju i prečišćavanju termostabilnih β -galaktozidaza i β -galaktozidaza aktivnih na niskim temperaturama. Prednost primene termostabilnih β -galaktozidaza (*Aspergillus niger*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pyrococcus woesei*, *Thermus* sp.) jesu visoke operativne temperature (i do 80 °C), pri čemu dolazi do smanjenja viskoznosti reakcionog medijuma, kao i smanjenja potencijalne mikrobne kontaminacije u toku procesa. Zbog ispoljavanja visokog stepena transgalaktozilacione aktivnosti, našle su primenu i u proizvodnji galakto-oligosaharida.⁵⁴ Sa druge strane, β -galaktozidaze aktivne na niskim temperaturama ili pak, adaptirane na niske temperature (0-25 °C), koje vode poreklo iz psihrofilnih mikroorganizama (*Arthrobacter psychrolactophilus*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*) omogućavaju efikasnu obradu mleka i mlečnih proizvoda u blagim reakcionim uslovima, čime ne dolazi do promene ukusa i nutritivnih vrednosti.⁵⁴ Takođe, imaju ulogu i u bioremedijaciji surutke i proizvodnji bioetanola. Razvojem genetičkog inženjeringa omogućena je ekspresija i optimizacija proizvodnje β -galaktozidaze željenih osobina iz najrazličitijih izvora u domaćinima koji su poznati po svojoj efikasnoj produkciji heterologih proteina (*E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia*

pastoris, *Lactococcus lactis*). Ovim se postiže značajna tehnička i ekonomska isplativost procesa sinteze enzima, a pored toga mogu se dobiti enzimi poboljšanih osobina: ekstracelularne prirode, pogodnijih za prečišćavanje, smanjene podložnosti inhibiciji i povećane aktivnosti.

2.1.2. Struktura i mehanizam dejstva β -galaktozidaza

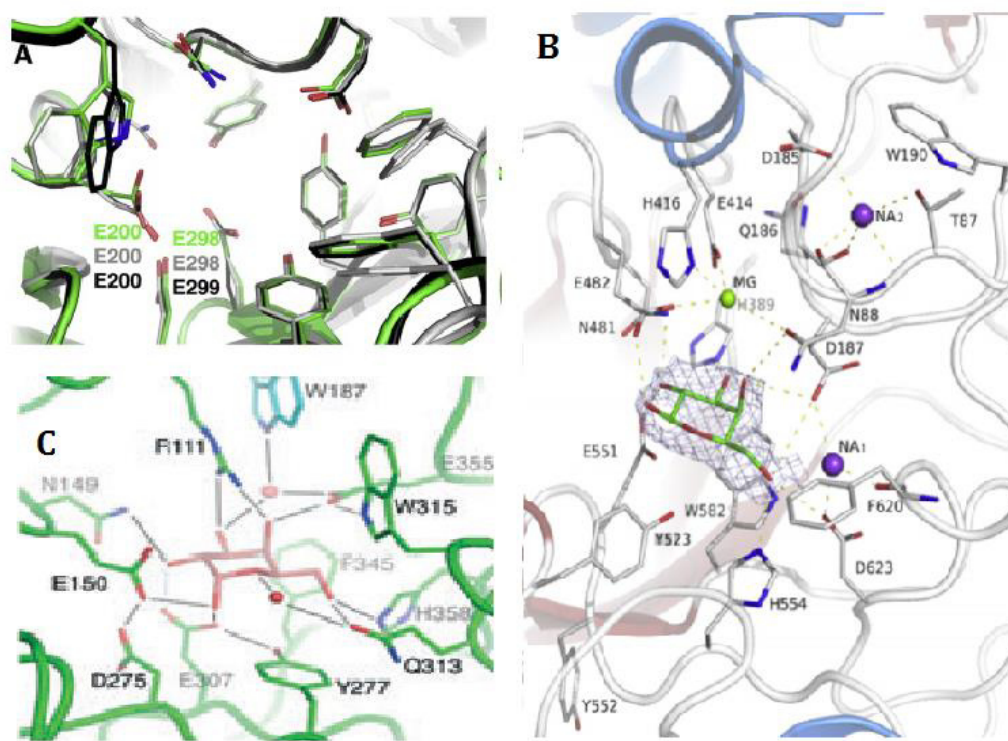
Uprkos činjenici da su poznate još od sredine prošlog veka, tačan mehanizam dejstva β -galaktozidaza, kao i njihova struktura, dugo su bile nepoznanica za naučnike.¹⁴



Slika 2.3 Struktura β -galaktozidaze iz *E. Coli*³⁹: (a) tetramer β -galaktozidaze, (b) monomerna subjedinica sa istaknutim domenima, (c) karakterističan katalitički domen β -galaktozidaza – $(\alpha/\beta)_8$ bure (TIM bure)

Razvojem bioinformatičkih i savremenih kristalografskih tehnika, međutim, određene su strukture i sekvence ovih molekula, čime je omogućen jasniji uvid u svojstva i mehanizme delovanja β -galaktozidaza. Prvi podaci o sekvenci enzima β -galaktozidaze datiraju iz 1970. godine, kada je sekvencionirana iz β -galaktozidaza

E. coli, ali je za isti enzim struktura utvrđena tek 1994. godine.³⁹ Tada je utvrđeno da je β -galaktozidaza tetramer (464 kDa) sa 222 tačke simetrije, koji se sastoji iz četiri polipeptidna lanca sa po 1023 amino kiselina (Slika 2.3a). Svaki od monomera sastoji se iz pet domena, od kojih treći predstavlja katalitički domen (Slika 2.3b). Utvrđeno je da katalitički domen poseduje karakterističnu strukturu – $(\alpha/\beta)_8$ bure, takozvanu TIM bure strukturu, što predstavlja supersekundarnu strukturu izgrađenu od osam centralno postavljenih paralelnih β -naboranih pločica okruženih sa osam α -spirala (Slika 2.3c).⁵⁵ Interesantno je da su β -galaktozidaze nekoliko drugih vrsta mikroorganizama, koje su do sada ispitane, pokazale postojanje visokog stepena homologije i očuvanosti ovog regiona, pa se može reći da je TIM bure struktura katalitičkog domena opšta karakteristika svih β -galaktozidaza.

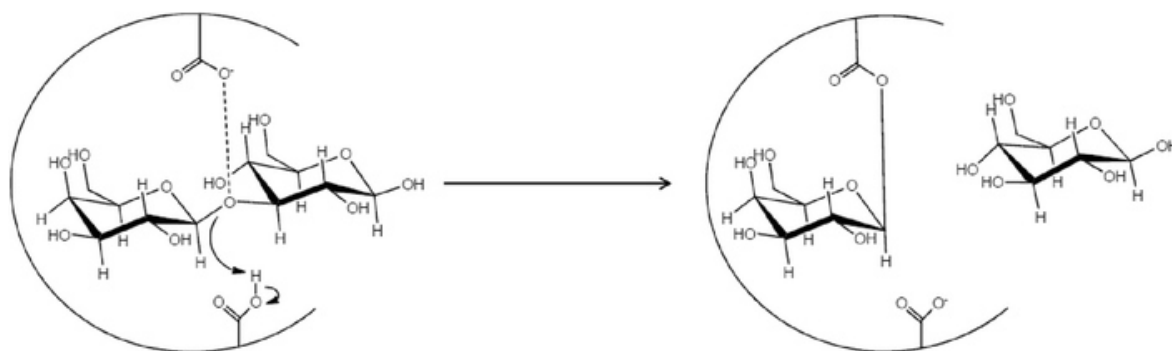


Slika 2.4. Prikaz aktivnog centra komercijalnih β -galaktozidaza: (a) *Aspergillus oryzae*⁵⁶, (b) *Kluyveromyces lactis*⁵⁷ i (c) *Bacillus circulans*⁵⁸

U okviru TIM bure domena nalazi se aktivno mesto enzima, u okviru koga je identifikovana većina aktivnih ostataka aminokiselina koje direktno ili indirektno učestvuju u vezivanju i konverziji supstrata. U starijoj literaturi kao aktivni ostaci

aminokiselina najčešće se spominju cistein i histidin, ^{59,60} dok je novim saznanjima o strukturi enzima potvrđeno da sve poznate β -galaktozidaze sadrže dva ostatka glutaminske kiseline koje imaju ulogu proton donora i nukleofila/baze u enzimskoj reakciji i međusobno su udaljeni do 0,55 nm. ^{57-59,61,62} Pored ostataka glutaminske kiseline, kao što se sa slike 2.4 može videti, ulogu u vezivanju supstrata imaju i grupe koje učestvuju u stvaranju vodoničnih veza, elektrostatički vezan Na^+ jon, kao i bočni ostaci aromatičnih aminokiselina. ^{14,63}

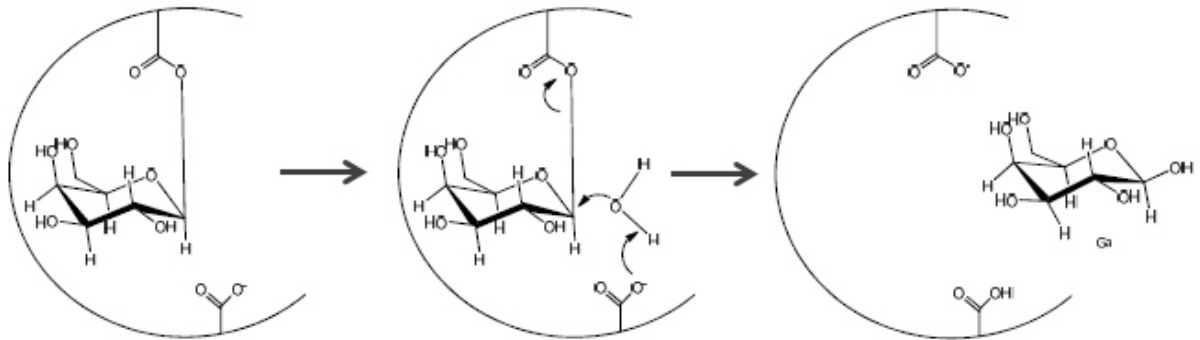
Ova saznanja vezana za funkcionalnost i strukturu aktivnog centra omogućila su rasvetljavanje mehanizma reakcija katalizovanih β -galaktozidazama. Veruje se, naime, da se reakcije hidrolize i transgalaktozilacije odigravaju prema sličnom višestepenom mehanizmu. ^{64,65} Mehanizmu hidrolize laktoze, kao važnoj biološkoj reakciji, bilo je posvećeno dosta pažnje, dok su sa druge strane sva saznanja o mehanizmu reakcije transgalaktozilacije izvedena posredno, oslanjajući se na već postojeća saznanja o mehanizmu hidrolize.¹⁴



Slika 2.5 Mehanizam stvaranja enzim-galaktozil kompleksa⁶⁶

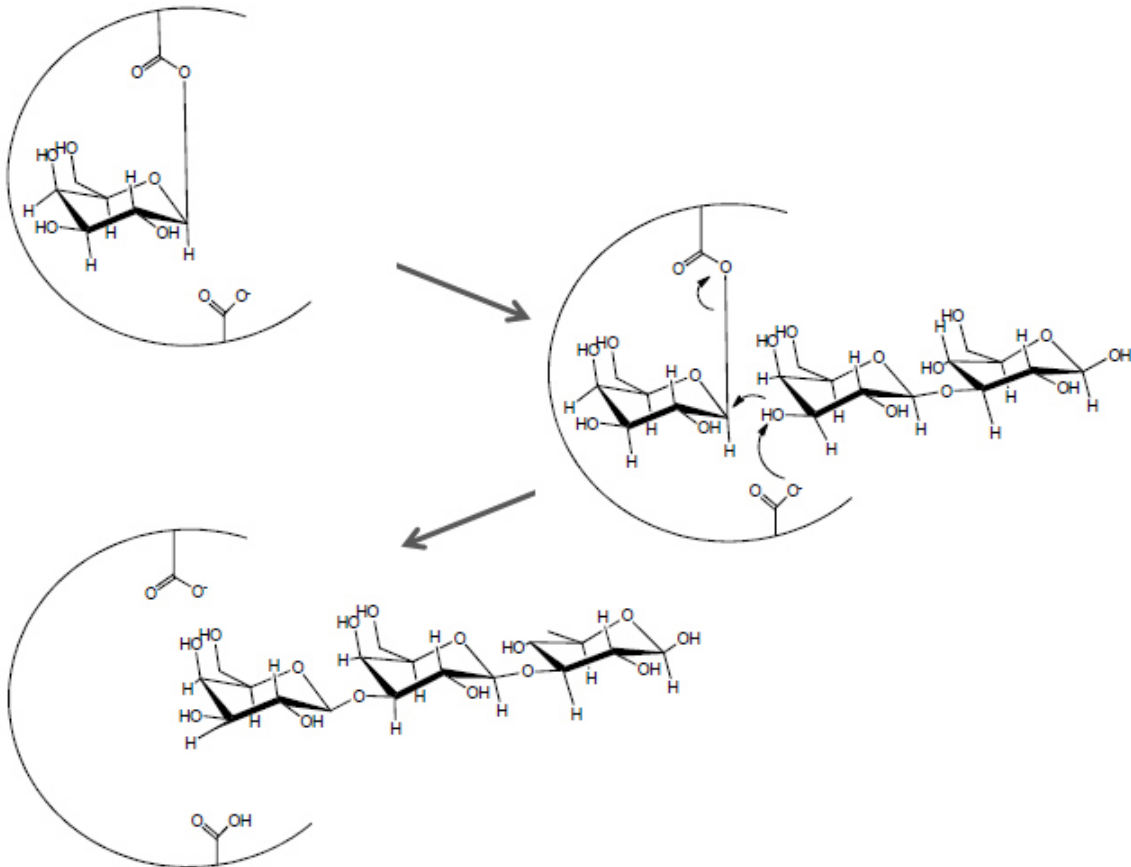
Naime, ukoliko se pogledaju ove reakcije može se primetiti da je prvi korak reakcija zajednički. U prvom koraku reakcije dolazi do ulaska molekula laktoze u aktivni centar enzima. Tom prilikom dolazi do formiranja kovalentne veze između glukozil ostatka i nukleofila (bočnog ostatka glutaminske kiseline) enzima i stvaranja enzim-galaktozil kompleksa. Istovremeno, drugi bočni ostatak glutaminske kiseline predaje proton molekulu glukoze, pri čemu dolazi do njenog oslobađanja (Slika 2.5). U drugom koraku dolazi do nukleofinog napada molekula akceptora na enzim-galaktozil kompleks, pri čemu u zavisnosti od prisutnih akceptora molekula galaktoze zavisi u kom će se smeru reakcija dalje odigravati.

Naime, ukoliko je akceptor galaktoze molekul vode, odigraće se reakcija hidrolize i osloboditi molekul galaktoze (Slika 2.6).



Slika 2.6. Mehanizam nukleofinog napada molekula vode u reakciji hidrolize ⁶⁶

U drugom slučaju, ukoliko je akceptor galaktoze neko drugo jedinjenje sa slobodnom hidroksilnom grupom (u ovom slučaju laktoza) nastupiće reakcija transgalaktozilacije (Slika 2.7).



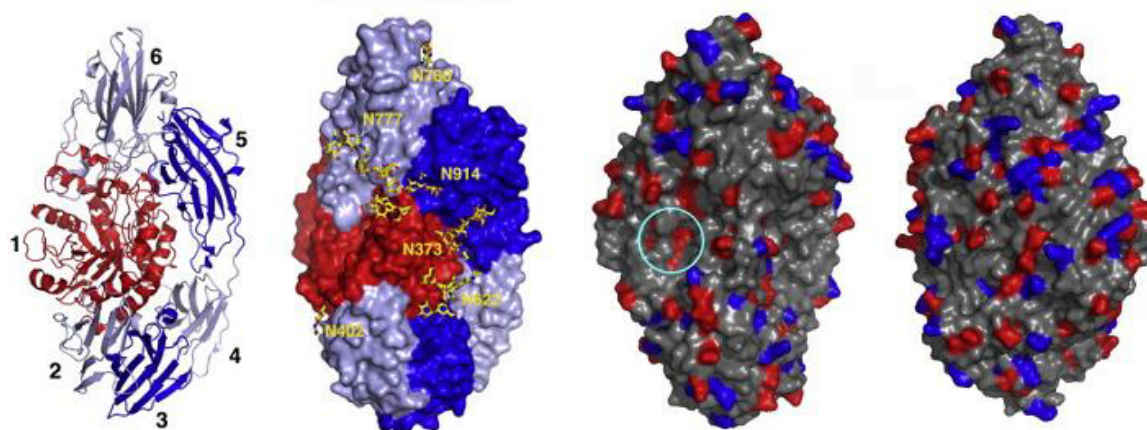
Slika 2.7. Mehanizam transgalaktozilacije⁶⁶

Iako ovaj mehanizam delovanja β -galaktozidaza dobro objašnjava nastajanje galakto-oligosaharida, još uvek nije u potpunosti razjašnjena pojava nastajanja strukturno različitih proizvoda i razlike u afinitetu enzima prema određenim vezama. Pojedini naučnici su pokušali da ustanove vezu između strukture enzima i njegovog afiniteta prema akceptoru primenom genetičkih manipulacija.⁶⁷⁻⁶⁹ Tako su Jorgensen (Jørgensen) i saradnici delecijom sekvence gena koja kodira C-terminalni kraj β -galaktozidaze iz *Bif. bifidum*, homologan poznatim galaktozavezujućim domenima, dobili enzim sa neznatnom hidrolitičkom, ali zato izraženom transgalaktozilacionom aktivnošću. Ovakav razvoj situacije bi se mogao objasniti činjenicom da je delecijom ovog domena omogućen lakši pristup molekulima šećera aktivnom centru enzima, a samim tim i povećan potencijal transgalaktozilacije.^{68, 69} Međutim, pod identičnim uslovima, različite β -galaktozidaze daju različite prinose proizvoda, kao i različite smeše galakto-oligosaharida, koji se međusobno razlikuju po sastavu, stepenu polimerizacije i vrstama veza unutar molekula. Ovakvo ponašanje može se objasniti razlikama u selektivnosti β -galaktozidaza različitog porekla, a koje se mogu javiti kao posledica strukturnih razlika među njima. Na osnovu sličnosti u sekvencama kojima su kodirane, utvrđeno je da sve β -galaktozidaze spadaju u superfamiliju GH-A glikozidaza, odnosno glikozid-hidrolaza, dok se dalje mogu podeliti u subfamilije: GH-1, GH-2, GH-35 i GH-42.⁷⁰ U prve tri subfamilije svrstani su i pojedini enzimi koji nemaju aktivnost β -galaktozidaze, dok se u subfamiliji GH-42 nalaze isključivo β -galaktozidaze. Subfamiliju GH-1 čine fosfo- β -galaktozidaze i β -glukozidaze koje katalizuju hidrolizu laktoze.⁷¹ Većina bakterijskih β -galaktozidaza svrstava se u subfamiliju GH-2. Pored njih u ovu grupu svrstane su još i β -galaktozidaze iz *K. lactis*, *K. fragilis* i *A. nidulans*. Ovi enzimi prevažno koriste laktozu kao supstrat, ali mogu hidrolizovati i β -(1→3) i β -(1→6) galaktozide. U prisustvu visokih koncentracija laktoze β -galaktozidaze GH-2 subfamilije imaju izraženu sposobnost sinteze galakto-oligosaharida,^{72,73} a u pogledu akceptora galaktozil-ostataka nisu strogo specifične.⁷⁴ U subfamilije GH-35 i GH-42 ubrajaju β -galaktozidaze eukariota, kao i nekih bakterija čija staništa nisu vezana za prisustvo laktoze. Tako β -galaktozidaze ovih subfamilija imaju veći afinitet prema supstratima različitim

od laktoze. Recimo, *Xanthomonas campestris* preferira β -(1 \rightarrow 3) glikozidne veze u odnosu na β -(1 \rightarrow 4) glikozidnu vezu prisutnu u molekulu laktoze, dok β -galaktozidaze iz *B. subtilis* svrstana u subfamiliju GH-42 učestvuje u hidrolizi atabinogalaktana. Nekoliko β -galaktozidaza iz subfamilije GH-42 čak ne hidrolizuje laktozu.³⁵

2.1.2.1. β -Galaktozidaza iz *A. oryzae*

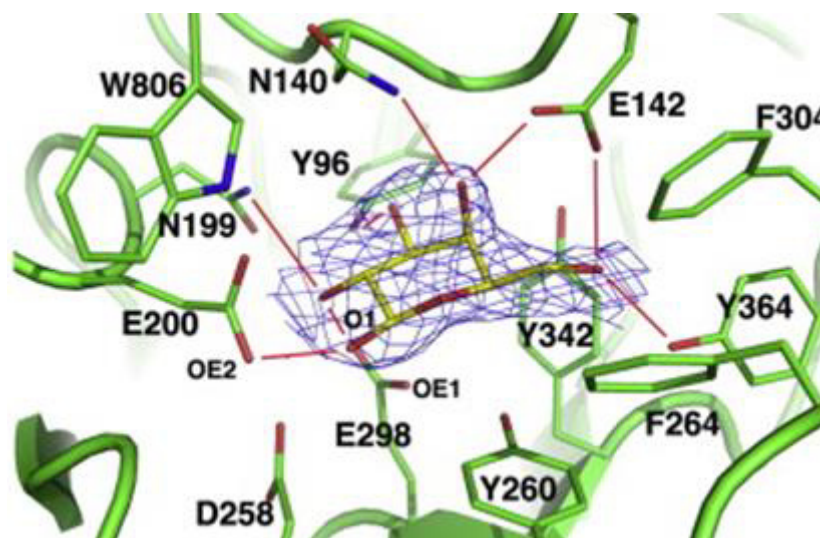
β -Galaktozidaza iz *A. oryzae* predstavlja komercijalno dostupnu i jednu od industrijski najčešće korišćenih β -galaktozidaza za hidrolizu laktoze iz mleka i surutke. Otkako je u studiji Prenosila i saradnika⁶⁰ pokazano da poseduje najbolji transgalaktozilacioni potencijal među komercijalnim preparatima kvasaca i plesni, sve češće se koristi i u reakcijama transgalaktozilacije, pogotovo za sintezu galakto-oligosaharida.^{75,76}



Slika 2.8. Struktura β -galaktozidaze iz *A. oryzae*.⁵⁶ (a) raspored domena u molekulu β -galaktozidaze (b) raspored ugljenohidratnih ostataka na površini molekula, raspored kiselih (Glu i Asp) i baznih (Arg i Lys) bočnih ostataka aminokiselina: (c) frontalna projekcija, (d) projekcija dobijena rotacijom za 180°

Struktura β -galaktozidaze iz *A. oryzae* određena je tek 2013. godine u kristalografskoj studiji Maksimainena i saradnika. Molekul β -galaktozidaze predstavlja veliki monomerni molekul (14,6x14,6x13,6 nm) sa 1005 ostataka aminokiselina i molarnom masom 110 kDa. Sastoji se iz 6 domena, od kojih je prvi katalitički domen sa karakterističnom strukturom- TIM bure, na slici 2.8a označen

crvenom bojom. Ostali domeni (2-6) formiraju strukturu potkovice sa pet antiparalelnih β -sendvič struktura oko katalitičkog domena. Ključni aminokiselinski ostaci u aktivnom centru su ostaci glutaminske kiseline na pozicijama 200 i 298 (Slika 2.9). Prva ima ulogu kiselu/baznog katalizatora, a druga nukleofila. U formiranju enzim-supstrat kompleksa važnu ulogu imaju vodonične veze u čijem formiranju učestvuju ostaci tirozina (96 i 364), asparagina (140), glutaminske kiseline (142). Ove vodonične veze su prikazane crvenim linijama na slici 2.9. Pored ovih ostataka određenu ulogu ima i tirozin 342 koje se orijentiše paralelno piranoznom prstenu galaktoze u acil-enzim kompleksu. Poznato je i da triptofan u položaju 806, iako ne stvara interakcije sa β -galaktozom u kompleksu, ima određenu ulogu u sintezi oligosaharida pa se smatra da je deo dodatnog aktivnog centra.



Slika 2.9. Aktivni centar β -galaktozidaze iz *A. oryzae* ⁵⁶

Na slici 2.8b se takođe može primetiti da se na površini enzima nalazi i značajna količina ugljenohidratnih ostataka. Pošto se ovi ostaci nalaze uglavnom iznad aromatičnih i hidrofobnih aminokiselinskih ostataka, smatra se da je njihova funkcija da štite enzim od dejstva proteolitičkih enzima koji katalizuju hidrolizu peptidnih veza upravo između ovakvih aminokiselina. ⁵⁶ Ovaj enzim, kao i većina β -galaktoza poreklom iz plesni, pripada kiselim β -galaktozama, sa pH optimumom 3,6-4,8. Kada je reč o temperaturnom optimumu, podaci značajno variraju u zavisnosti od korišćene literature, i kreću se u opsegu 37-55 °C. ^{56,77}

2.1.2.2. β -Galaktozidaza iz *Lactobacillus acidophilus*

L. acidophilus predstavlja jednu od najpoznatijih i komercijalno najeksploatisanijih probiotskih vrsta.⁷⁸ Izolovana je 1900. godine i okarakterisana kao homofermentativna, štapićasta Gram pozitivna bakterija (2-10 μ m) koja raste optimalno na umerenim temperaturama 37-42 °C. Prisutna je u gastrointestinalnom traktu čoveka, gde ispoljava probiotsku aktivnost i ublažava simptome netolerancije na laktozu. Sa druge strane, u prehrambenoj industriji koristi se za dobijanje fermentisanih proizvoda od mleka ili se pak koristi kao jedan od probiotskih dodataka funkcionalnoj hrani.²⁸ Iako predstavljaju vrlo potentne producente β -galaktozidaze, tek od skoro, vlada interesovanje za njihovu eksploataciju u tom smislu. Kompletno sekvencioniranje genoma *L. acidophilus* izvršeno je 2005. godine od strane Altermana i saradika.⁷⁸ Ovi podaci, pružili su uvid u postojanje dva različita gena (LacZ i LacLM) zadužena za sintezu β -galaktozidaze kod *L. acidophilus*. Pokazano je da se u prisustvu laktoze vrši pojačana ekspresija oba gena, što je ukazalo na činjenicu da su oba aktivna kao β -galaktozidaze. Enzimi kodirani ovim genima, međutim, pokazuju brojne razlike u strukturi, kao i u aktivnosti. Naime, β -galaktozidaze LacLM tipa iz *L. acidophilus* predstavljaju heterodimere sa molekulskom masom 105 kDa, sastavljene iz dve subjedinice LacL (72 kDa) i LacM (35 kDa).⁷⁹ Ovi enzimi pokazuju izuzetnu sličnost sa već ranije izolovanim LacLM β -galaktozidazama iz *L. reuteri*²⁷ i *L. helveticus*⁸⁰ i zajedno sa njima mogu se klasifikovati u subfamiliju GH-2 galaktozidaza. Poređenjem sekvenci različitih sojeva *L. acidophilus* (NCFM, JCM1229 i R22) pokazalo je da je velika subjedinica (LacL) 100% identična i sastoji se od 628 ostataka. Takođe, utvrđeno je da ona sama pokazuje aktivnost β -galaktozidaze. Sa druge strane, mala subjedinica (LacM) je pokazala sličnost od 99% (što je posledica varijabilnosti aminokiselinskog ostatka u položaju 302), a sastoji se od 316 ostataka i samostalno ne ispoljava aktivnost β -galaktozidaze. Optimalna pH vrednost LacLM β -galaktozidaze *L. acidophilus* kreće se u opsegu 6,5-8 za oba supstrata (*o*-NPG, laktoza), dok je najveća stabilnost zabeležena pri pH 6,5, gde je enzim zadržao čak 80% aktivnosti tokom inkubacije od 48 sati na temperaturi od 37 °C. Optimalna temperatura za oba supstrata iznosi 55 °C.

Najveća stabilnost enzima zabeležena je na temperaturi od 4 °C. LacLM enzim je u potpunosti zadržao aktivnost nakon skladištenja od 30 dana i više od 90% aktivnosti nakon skladištenja od 45 dana na 4 °C.⁷⁹

Sa druge strane, LacZ β -galaktozidaza *L. acidophilus* pripada subfamiliji GH-42. Izgrađena je od 667 amino kiselina koje grade monomer sa molekulskom masom od 76,5 kDa. Optimalna temperatura ovog enzima iznosi 37 °C. Ispitivanja stabilnosti enzima pokazala su da enzim na optimalnoj temperaturi gubi 50% aktivnosti nakon jednog sata, dok je na temperaturama 10-25 °C enzim pokazao veliku stabilnost (zadržano 95-98% aktivnosti). Ovo nije neočekivano imajući u vidu sličnost sa GH-42 enzimima vrsta prilagođenih niskim temperaturama kao što su *Carnobacterium piscicola* BA (BgaB) i *Planococcus sp.* L4 (BgaP). Naime, da li će neki enzim biti termolabilan i aktivan na niskim temperaturama zavisi od fleksibilnosti samog proteina, odnosno aminokiselina koje ulaze u njegov sastav, a poredeći ove enzime može se primetiti da im je ovo zajednička osobina.²⁸ Pored različitih optimalnih uslova za ispoljavanje maksimalne aktivnosti, ukoliko uporedimo njihove kinetičke parametre, može se uočiti da LacLM β -galaktozidaza ($K_m=4$ mM) ima znatno viši afinitet prema laktozi od LacZ β -galaktozidaze ($K_m=88,9$ mM). Pored ovoga važno je istaći i da LacLM β -galaktozidaze pod određenim reakcionim uslovima poseduju i znatno izraženiji potencijal katalizovanja reakcije transgalaktozilacije.

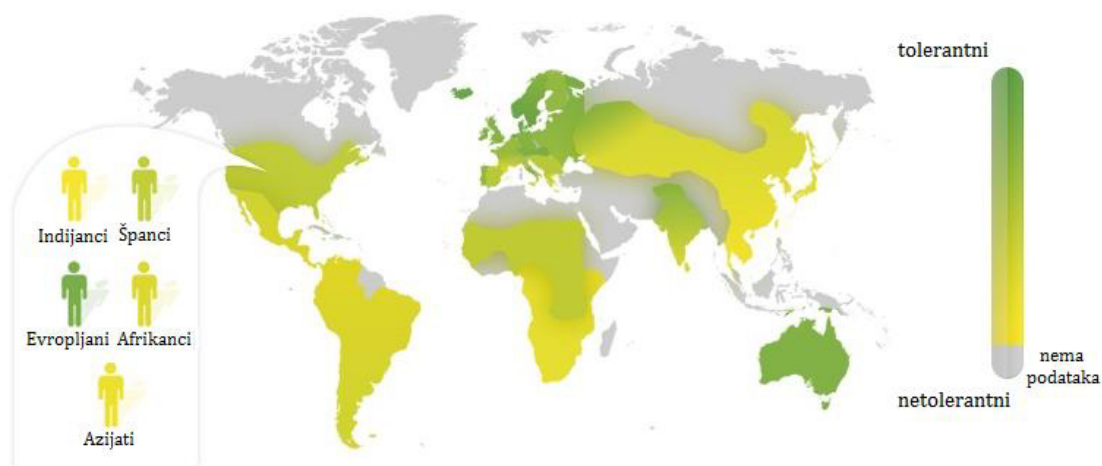
2.1.3. Primena β -galaktozidaza

2.1.3.1. Hidroliza laktoze mleka

Laktoza (β -D-galaktopiranozil-(1 \rightarrow 4)- α -D-glukopiranoza) predstavlja disaharid koji je prisutan kao osnovna ugljenohidratna komponenta mleka većine sisara (2-10%). Prosečan sadržaj laktoze u kravljem mleku, na primer, kreće se između 4,4 i 5,2%.⁸¹ Shodno tome, hidroliza laktoze mleka predstavlja jedan od najznačajnijih biotehnoških procesa u prehrambenoj industriji. Sa jedne strane hidrolizom laktoze nastaju proizvodi koje može konzumirati i deo populacije netolerantne na laktozu, a sa druge strane značajno se popravljaju biotehnoške i senzorne

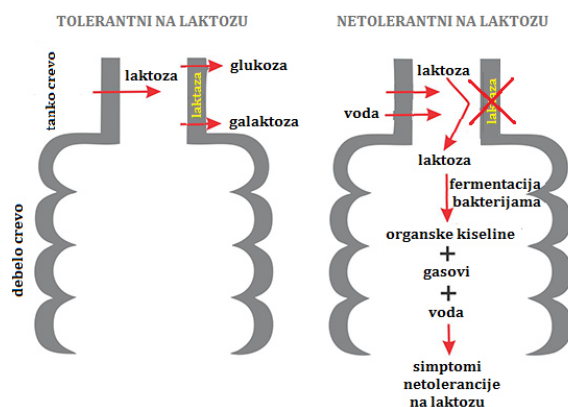
karakteristike proizvoda mlečne i prehrambene industrije. Naime, laktoza je šećer male rastvorljivosti (oko 180 g/l na sobnoj temperaturi),⁸² čiju upotrebu u zaleđenim i kondezovanim mlečnim proizvodima značajno ograničava njena brza kristalizacija. Pored toga, laktoza je šećer niskog stepena slatkoće (16% u odnosu na saharozu), a kada je prisutna u prekomernoj količini dovodi do kvarenja ukusa i teksture proizvoda. Sa druge strane produkti njene razgradnje: glukoza i galaktoza znatno su slađi, što za posledicu ima bolji ukus hidrolizovanih proizvoda. Tako se, na primer, kvalitet sladoleda se značajno poboljšava dodavanjem enzima β -galaktozidaze, čime se sprečava pojava peskaste strukture. Dodavanje β -galaktozidaze omogućava zamenu 75% suve materije mleka demineralizovanom surutkom u prahu što proizvodu daje poboljšanu kremastost, a takođe ga čini prihvatljivim za konzumiranje od strane osoba netolerantnih na laktozu.⁸³ Pored toga, korišćenje hidrolizovanog mleka u proizvodnji sireva i jogurta dovodi do ubrzavanja procesa acidifikacije, jer hidroliza laktoze obično predstavlja limitirajući korak tom u procesu. Time se skraćuje vreme proizvodnje i ubrzava razvoj strukture i ukusa u jogurtu i sirevima. Naročito je značajna upotreba β -galaktozidaza za poboljšanje produkcije i starenja čedar sira. Hidrolizom laktoze proizvodnja sira postaje brža, jeftinija i, što je još bitnije, sir poseduje poboljšana organoleptička svojstva.

2.1.3.2. Netolerancija na laktozu



Slika 2.10. Raspodela zastupljenosti netolerancije na laktozu širom sveta

Interes prehrambene industrije za intenzivno razvijanje procesa hidrolize laktoze posledica je činjenice da više od 70% svetske populacije pati od neke vrste netolerancije na laktozu.⁸⁴ Netolerancija na laktozu predstavlja fiziološki poremećaj koji se javlja usled nedostatka ili potpunog prestanka sinteze enzima β -galaktozidaze u sluzokoži tankog creva ljudi. Starenjem dolazi do smanjenja količine produkovane β -galaktozidaze, a pojava netolerancije varira od 5% do približno 100% u zavisnosti od dela sveta (Slika 2.10). Kod osoba netolerantnih na laktozu, zbog nedostatka ili pak nedovoljne količine β -galaktozidaze u tankom crevu laktoza se neće razgraditi, kao u organizmu zdravih osoba, već će nepromenjena doći do debelog creva. Nesvarena laktoza dovodi do povećanja količine vode i elektrolita u lumenu debelog creva, što dovodi do ubrzanog pražnjenja creva i pojave dijareje.⁸⁵

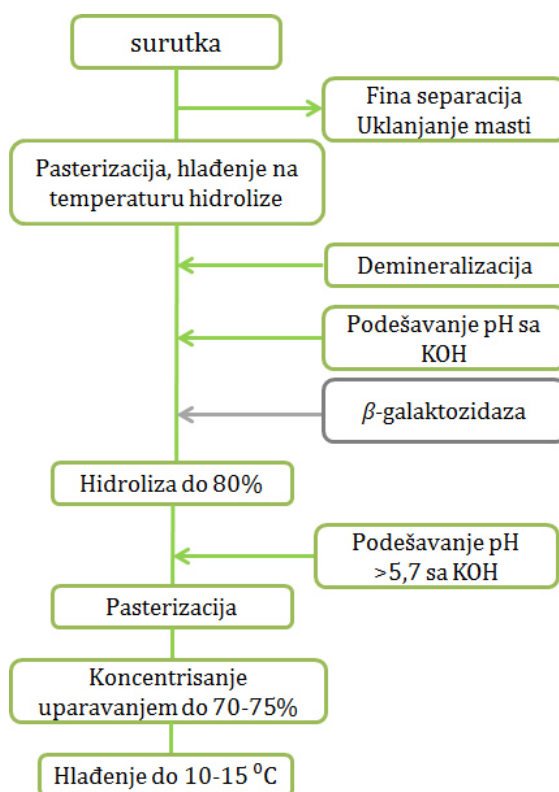


Slika 2.11. Metabolizam laktoze kod zdravih i osoba netolerantnih na laktozu

Laktozu do glukoze i galaktoze, kod ovakvih osoba, potom razgrađuje β -galaktozidaza bakterija gastrointestinalnog trakta, da bi se kasnije oni fermentisali do organskih kiselina kratkog lanca i gasova (CO_2 , H_2 i ponekad CH_4) koji uzrokuju simptome, kao što su nadutost, mučnina, grčevi, i drugo (Slika 2.11). Konzumiranjem proizvoda sa smanjenim udelom laktoze, ali i fermentisanih mlečnih proizvoda mogu se izbeći nelagodnosti vezane za konzumiranje mlečnih proizvoda kod osoba netolerantnih na laktozu.

2.1.3.3. Hidroliza laktoze surutke

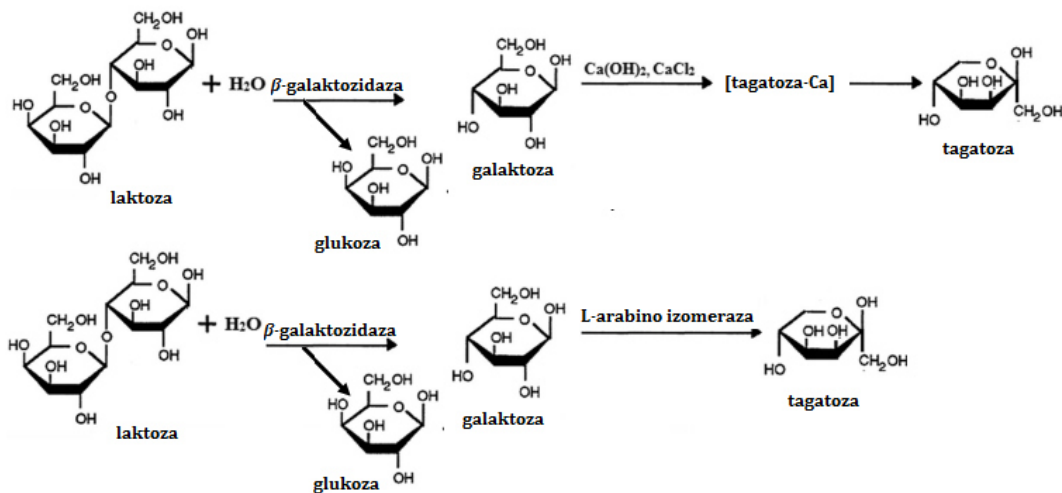
Najvažniji sporedni proizvod u mlekerskoj industriji je surutka, koja u velikim količinama nastaje u proizvodnji sira i kazeina. I pored ogromnih potencijala koje surutka ima, veliki deo proizvedene surutke, naročito u nerazvijenijim zemljama, ispušta se u reke i jezera što predstavlja veliki ekološki problem. Visoka koncentracija laktoze u surutki je jedna od osnovnih prepreka odlaganju u lokalne vodene tokove jer povećava biološke zahteve za kiseonikom (BOD 30000-50000 ppm),⁸⁶ odnosno dovodi do zagađenja životne sredine. Hidrolizom laktoze surutke, korišćenjem β -galaktozidaze, ne samo da se rešava ekološki problem, već nastaje sirup koji svoju primenu nalazi u prehrambenoj industriji za proizvodnju slatkiša i sokova (Slika 2.12).^{86, 87}



Slika 2.12. Šematski prikaz dobijanja sirupa⁵⁵

Pored hidrolize laktoze surutke i njenog prevođenja u sirup podesan za upotrebu u prehrambenoj industriji, laktoza surutke se hidrolaznom aktivnošću β -

galaktozidaze može konvertovati i do drugih vrednih proizvoda, recimo bioetanola^{88, 89} i funkcionalno aktivnog zaslađivača tagatoze.^{66, 88, 89}



Slika 2.13. Hemo-enzimska i enzimaska konverzija laktoze do tagatoze ⁶⁶

Alkoholna fermentacija laktoze surutke predstavlja alternativni pristup bioremedijaciji surutke koja zaostaje nakon odvajanja proteina. Ovaj proces je prvi put opisan četrdesetih godina prošlog veka.⁹⁰ Naime, ovim procesom znatno se smanjuje zagađenje životne sredine, a pri tome se dobija etanol koji je pogodan za primenu u prehrambenoj, hemijskoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Broj mikroorganizama koji su u stanju da direktno fermentišu laktozu do etanola je ograničen (*K. lactis*, *K. fragilis*, *K. marxianus*, *C. pseudotropicalis*).^{91, 92} Direktna fermentacija laktoze surutke do etanola, međutim, nije ekonomski isplativa zbog niskog sadržaja laktoze, a samim tim i niskih prinosa etanola. Stoga su razvijeni procesi fermentisanja koncentrovanih rastvora surutke, što je dovelo do povećanja prinosa etanola, kao i smanjenja troškove njegove separacije. Prinosi u ovim procesima, uglavnom su rasli sa povećanjem koncentracije laktoze (5-20%) kretali su se u opsegu 10-86 g/l etanola.^{91, 92} Međutim, korišćenje koncentrovanih rastvora šećera, kao i visoka koncentracija etanola često su uzrokovale inhibiciju ovih vrsta mikroorganizama. Kako bi se prevazišle ove prepreke, pojedini naučnici su se opredelili za korišćenje proverenih fermentativnih mikroorganizama kao što je *S. cerevisiae*. Imajući u vidu da *S. cerevisiae* nema mehanizme za fermentisanje laktoze, kako bi se fermentacija odigrala potrebno je izvršiti hidrolizu laktoze

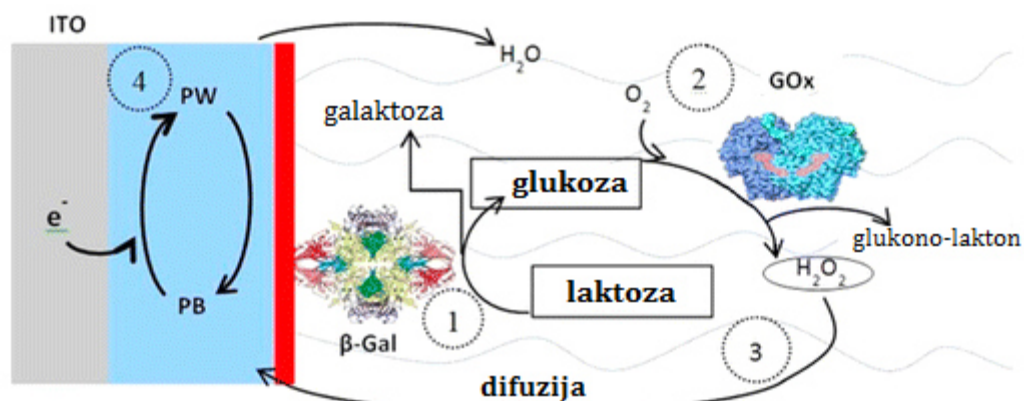
posredstvom β -galaktozidaza do glukoze i galaktoze, a potom započeti fermentaciju.^{93, 94} Postoje brojni primeri kuplovanja ovih procesa, koimobilizacijom β -galaktozidaze ili permeabilizovanih ćelija *K. marxianus* i *S. cerevisiae* u različitim konfiguracijama bioreaktora, gde je postignuto povećanje prinosa.^{95, 96} Sa razvojem genetičkog inženjerstva, razvijeni su rekombinantni sojevi *S. cerevisiae* u koje su ubačeni geni koji kodiraju β -galaktozidaze iz *E. coli* (LacZ)⁹⁷, *A. niger* (LacA)⁹⁸ ili pak β -galaktozidazu (LAC4) i laktoza permeazu (LAC12) *K. lactis*.^{99, 100} Prinosi etanola sa rekombinantnim kvascima su obećavajući, ali još uvek treba dosta uraditi po pitanju povećavanja razmere procesa u cilju buduće industrijske implementacije. Do sada, industrijski procesi proizvodnje etanola iz surutke razvijeni su u Irskoj, Novom Zelandu, Sjedinjenim Američkim Državama i Danskoj.¹⁰¹

2.1.3.4. Biosenzori

Biosenzori predstavljaju analitičke uređaje koje brzo, lako i pre svega selektivno određuju koncentraciju željenih supstanci. Sastoje se iz biološki aktivne komponente (enzima, peptida, nukleinskih kiselina, mikroorganizama, antitela), fizičko-hemijskog pretvarača i procesora elektronskog signala. Prvi komercijalni biosenzori razvijeni su u medicini, za određivanje glukoze u krvi, a danas se koriste u širokoj oblasti rešavanja analitičkih problema: u medicini, ekologiji, prehrambenoj i procesnoj industriji, forenzičkim istraživanjima i drugo.

Enzimski biosenzori su najkorišćenija vrsta biosenzora, kod kojih se kombinuje selektivnost enzima i osetljivost raličitih vrsta detektora. Određivanje sadržaja laktoze predstavlja važno polje kontrole kvaliteta u mlečnoj i prehrambenoj industriji, koje zahteva primenu osetljivih, brzih i pre svega preciznih analitičkih metoda. Stoga, u cilju unapređenja konvencionalnih metoda, razvijeni su biosenzori na bazi β -galaktozidaze. Dosada su opisane različite vrste laktoznih biosenzora, uglavnom prve i druge generacije. Većina njih razvijena je na bazi amperometrijskih merenja, a korišćeni su uglavnom ko-imobilisani enzimi: glukoza oksidaze i β -galaktozidaze,¹⁰² galaktoza oksidaze i β -galaktozidaze,¹⁰³ peroksidaza iz rena, glukoza oksidaza i β -galaktozidaza,^{104, 105} glukoza oksidaza, β -

galaktozidaza i mutarotaza.¹⁰⁴ Na slici 2.14. je prikazana šema biosenzora koji se koristi za detekciju laktoze u mleku, koji se zasniva na dve reakcije koje katalizuju β -galaktozidaza i glukoza oksidaza.



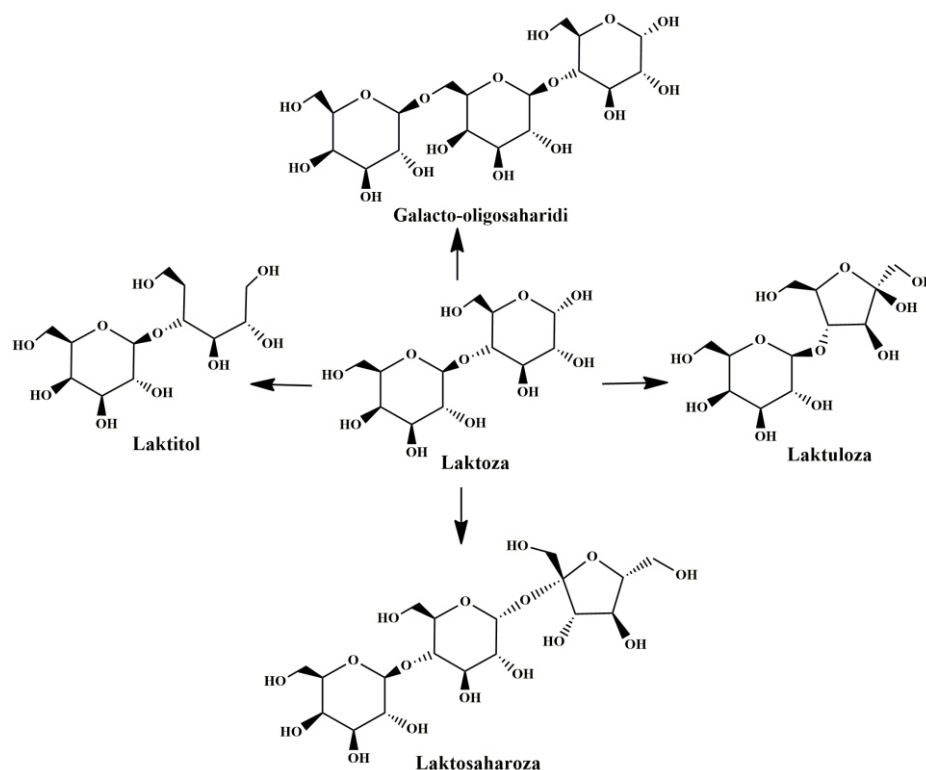
Slika 2.14. Primer biosenzora za određivanje koncentracije laktoze¹⁰⁶

U prvom koraku hidrolizuje se laktoza dejstvom β -galaktozidaze, a drugom koraku se indirektno kvantifikuje ova reakcija tako što se oslobođena glukoza oksiduje pomoću glukoza oksidaze, a elektrohemijski se meri oslobođeni vodonik-peroksid. β -Galaktozidaza je imobilisana u višeslojni film sa polielektrolitima polietileniminom (PEI) i poli-vinilsulfonatom (PVS) na indijum-kalaj-oksidnoj (ITO) elektrodi modifikovanoj slojem Prusko plavog (PB), tako da sveukupna struktura ovog biosenzora izgleda ITO/PB/(PEI/PVS)₁(PEI/ β -Gal)₃₀. Glukoza oksidaza je smeštena unutar elektrohemijske ćelije u rastvoru elektrolita. Reakcija detekcije se odigrava prema mehanizmu prikazanom na slici 14., a koncentracija laktoze određuje se amperometrijskim merenjem sa osetljivošću 0,31 mA/mmol·cm² i sa granicom detekcije 1,13 mmol/l, što je dovoljno za detektovanje laktoze u mleku.¹⁰⁶

2.1.3.5. Sinteza galakto-oligosaharida i drugih funkcionalnih galaktozida

β -Galaktozidaza se tradicionalno koristi kao enzim za hidrolizu laktoze, ali se poslednjih godina sve više pažnje obraća na njenu transgalaktozilacionu aktivnost, koja omogućava proizvodnju niza funkcionalno aktivnih jedinjenja, koje potencijalno mogu naći primenu u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj

industriji. Transgalaktozilacijom katalizovanom β -galaktozidazama koja se odvija pod posebnim uslovima (visoka koncentracija laktoze, visoke temperature i niska aktivnost vode) dolazi do formiranja β -glikozidne veze između galaktoze i drugih jedinjenja sa slobodnom hidroksilnom grupom (šećeri, alkoholi, aromatična jedinjenja i drugi).



Slika 2.15. Sinteza nekih funkcionalno aktivnih jedinjenja transgalaktozilacijom pomoću β -galaktozidaza

Najbolje ispitana grupa jedinjenja jesu galakto-oligosaharidi, koji nastaju prenošenjem galaktoze na molekule laktoze. Galakto-oligosaharidi predstavljaju nesvarljiva jedinjenja koji utiču na sastav i aktivnost mikrobiote creva, čime doprinose sveukupnom zdravlju čoveka i kao takvi smatraju se prebioticima. Međuti, poslednjih godina transgalaktozilacijom nastaju i druga funkcionalno aktivna jedinjenja, kao što su laktuloza, laktosaharoza, laktitol, galakto-oligosaharidi laktuloze i druga. U narednim poglavljima biće više reči o ovim jedinjenjima, njihovom dobijanju i primeni.

2.2. Proizvodnja mikrobnih β -galaktozidaza

Povećanje komercijalnog interesa za β -galaktozidaze, uzrokovano intenzivnim razvojem novih polja njene primene, neminovno je dovelo do porasta proizvodnje enzima. Sa ciljem što efikasnije proizvodnje enzima definisanih svojstava, sve više se teži pronalaženju novih producenata i razvoju efikasnijih postupaka proizvodnje enzima. Kada je reč o producentima β -galaktozidaza, postoji širok spektar potencijalnih producenata među mikroorganizmima, biljkama i životinjama. Međutim, zahvaljujući kratkim vremenima produkcije, jeftinim sirovinama za proizvodnju i visokim prinosima enzima, najčešće se primenjuju mikrobnii postupci proizvodnje enzima.^{3, 55} Takođe, imajući u vidu da se mikrobnii proizvodnja najčešće odigrava u kontrolisanim uslovima, moguće je dobiti enzime ustaljenih svojstava i prinosa. Na količinu i kvalitet dobijenih enzima značajno se može uticati odabirom adekvatnog proizvodnog soja i optimizacijom uslova fermentacije, ali i primenom genetičkih manipulacija, u cilju oplemenjavanja sojeva, kao i dobijanja enzima željenih svojstava i povećane aktivnosti.⁵⁵

2.2.1. Odabir proizvodnog mikroorganizma

Mikroorganizmi generalno proizvode enzime u skladu sa svojim potrebama, pa se tako međusobno razlikuju po količinama produkovanih enzima kao i njihovim svojstvima. Stoga, u cilju odabira odgovarajućeg, treba ispitati što veći broj potencijalnih producenata. Osnovni kriterijumi za izbor pogodnog soja za proizvodnju enzima podrazumevaju pre svega visinu produkovane enzimске aktivnosti i karakteristike samog enzima, ali posebnu pažnju treba obratiti i na mogućnost rasta na jeftinim podlogama, adaptiranost na procesne uslove, genetičku stabilnost, brz i obilan rast u željenom morfološkom obliku i netoksičnost, odnosno da je siguran i pouzdan za upotrebu (poseduje GRAS status).

⁵⁵ Do sada za proizvodnju β -galaktozidaza isprobani su brojni mikroorganizmi (Tabela 2.2). Tradicionalno se koriste producenti iz rodova *Kluyveromyces* i *Aspergillus*, ali poslednjih godina, zbog GRAS statusa, naročito su značajne bakterije mlečne kiseline, za koje je dokazano da proizvode aktivne i stabilne enzimске preparate, koje nije potrebno dodatno prečišćavati, što u mnogome pojeftinjuje

sam proces proizvodnje. Pored toga, interesantni su sa jedne strane psihrofilni i psihrotropni mikroorganizmi, a sa druge strane termotolerantni mikroorganizmi, čiji su temperaturni optimumi skrojeni za određene primene.

Tabela 2.2. Mikrobni producenti β -galaktozidaze ^{5, 19, 20, 26, 29, 30, 35, 39, 40, 44, 50, 107-124}

Bakterije	Kvasci	Plesni
<i>Bacillus circulans</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Aspergillus aculeatus</i>
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Cryptococcus laurentii</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
<i>Lactobacillus sakei</i>	<i>Candida pseudotropicalis</i>	<i>Penicillium canescens</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>		<i>Thermomyces</i>
<i>Lactobacillus pentosus</i>		<i>lanuginosus</i>
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>		<i>Chaetomium thermophile</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>		
<i>Lactobacillus reuteri</i>		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>		
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>		
<i>Lactobacillus crispatus</i>		
<i>Lactobacillus helveticus</i>		
<i>Bifidobacterium infantis</i>		
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>		
<i>Bifidobacterium longum</i>		
<i>Bifidobacterium bifidum</i>		
<i>Streptococcus thermophilus</i>		
<i>Enterobacter cloacae</i>		
<i>Escherichia coli</i>		
<i>Propionibacterium shermanii</i>		
<i>Sulfolobus solfataricus</i>		

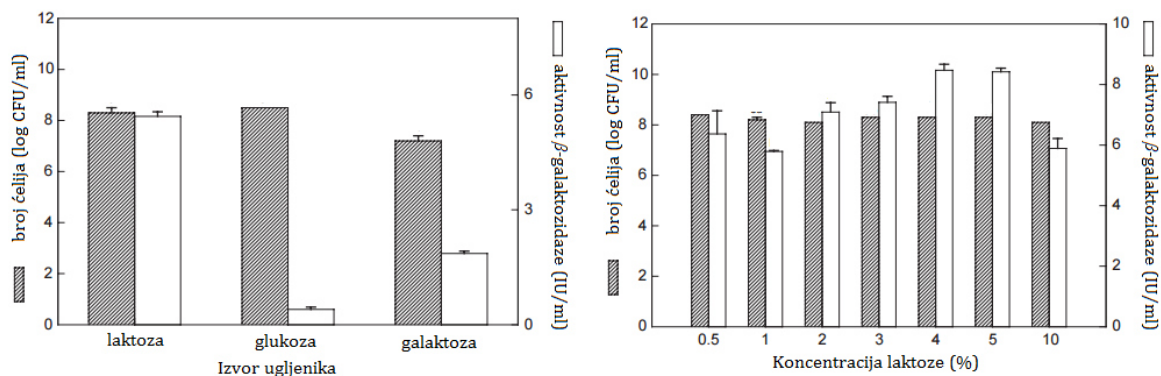
Nakon odabira adekvatnog proizvodnog organizma, u cilju poboljšanja proizvodnje enzima, dodatno se mogu izazvati mutacije mikroorganizma (fizičkim ili hemijskim sredstvima), nakon čega se izoluju mutanti sa najboljim osobinama, ili se pak može izvršiti njihova ekspresija u nekom od domaćina sa izraženom moći produkcije heterologih proteina.⁵⁵

2.2.2. Optimizacija sastava hranljive podloge

Nakon odabira proizvodnog mikroorganizma, u cilju potpunog iskorišćenja njegovog proizvodnog potencijala, treba pristupiti optimizaciji sastava podloge i uslova kultivacije. Ovo predstavlja jako kompleksan zadatak, ali adekvatnom optimizacijom fermentacionih faktora, moguće je višestruko povećati prinose željenog enzima, ali i znatno doprineti racionalizaciji njegove proizvodnje. Prvenstveno treba dobro sagledati fiziološka svojstva producenata, njihove specifične nutritivne zahteve, kao i svojstva enzima koji želimo proizvesti. Kao najvažnije parametre pri optimizaciji hranljive podloge treba istaći vrstu i koncentraciju ugljenih hidrata, proteina, neorganskih soli, induktora, vitamina i faktora rasta u hranljivoj podlozi. Pored njihovih pojedinačnih uticaja, od presudne važnosti za visok prinos enzima mogu biti i njihovi međusobni odnosi. Sa druge strane, u regulaciji ukupne postignute produktivnosti mikroorganizma, učestvuju i procesni parametri produkcije, kao što su pH sredine, temperatura, mešanje, koncentracija rastvorenog kiseonika, kao i niz drugih faktora. Pored toga što treba da obezbedi dobar rast mikroorganizma, optimizacija treba da omogući i visok prinos enzima. Ipak, ovde treba napomenuti da optimalni uslovi za kultivaciju mikroorganizama ne moraju odgovarati optimalnim uslovima za produkciju enzima, što je naročito izraženo kod sinteze nekonstitutivnih enzima.

Brojni naučnici su se bavili optimizacijom uslova za maksimalnu proizvodnju β -galaktozidaze.¹²⁵⁻¹²⁸ Njihovi rezultati, kao što je i očekivano, značajno variraju u zavisnosti od upotrebljenih producenata, međutim moguće je ustanoviti nekoliko opštih trendova koji se pre svega tiču formulisanja optimalnih sastava hranljivih podloga. Naime, opšte je prihvaćeno da je β -galaktozidaza inducibilan enzim, što podrazumeva da se dodavanjem supstrata ovog enzima (laktoza, galakto-oligosaharidi, izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid (IPTG), različiti galaktozidi, nekada i sama galaktoza) može pospešiti produkcija enzima.^{125, 129} Stoga, najčešći pristup u optimizaciji hranljive podloge predstavlja dodavanje različitih izvora ugljenika, primarno laktoze, u hemijski definisane, sintetičke podloge i ispitivanje uticaja svakog od pojedinačnih jedinjenja na prinos i aktivnost enzima.

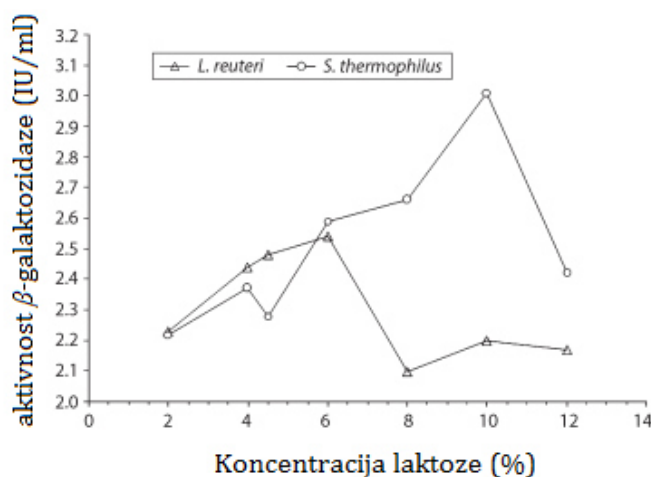
U radu Hsua i saradnika jasno se vidi uticaj različitih šećera, glukoze, galaktoze i laktoze, na rast *Bif. longum* i produkciju β -galaktozidaze. Naime, iako su se glukoza i laktoza pokazale podjednako dobrim izvorima ugljenika sa aspekta rasta mikroorganizama, laktoza se pokazala daleko boljim izborom ugljenika sa aspekta produkcije enzima, dok je glukoza, kao lako fermentibilan izvor ugljenika, očigledno represor sinteze enzima (Slika 2.16).¹²⁵



Slika 2.16. Uticaj dodatka 1% različitih šećera (a) i različitih koncentracija laktoze (b) u komercijalnu MRS podlogu na rast *B. longum* i aktivnost β -galaktozidaze¹²⁵

Slično, u radu Citija i saradnika su ispitivali uticaj inducera na aktivnost dobijene β -galaktozidaze iz *S. lactis*. Najbolji induktor bila je laktoza, dok su metil-3-D-tiogalaktopiranozid, izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid i galaktoza imali ulogu induktora, ali znatno manje efikasnu. Pored toga, melibioza, maltoza i kalcijum-laktobionat su se pokazali kao slabi induktori, a dodata glukoza ponašala se kao represor sinteze enzima.¹²⁹ Kim i Rajagopal, sa druge strane, zaključili su da dodavanje laktoze u podlogu dovodi do inhibicije sinteze β -galaktozidaze iz *L. crispatus*,³¹ a Laksmi (Laxmi) i saradnici da je maksimalna produkcija enzima pomoću *B. animalis* i *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* postignuta u prisustvu galaktoze.¹³⁰ Uprkos ovome, laktoza ostaje najkorišćenije jedinjenje koje se koristi za stimulaciju mikrobne proizvodnje β -galaktozidaza.¹³¹ Pored vrste izvora ugljenika, značajan uticaj na produkciju enzima ima i koncentracija jedinjenja. Kao što se sa slike 2.16. može videti, najviša aktivnost β -galaktozidaze u radu Hsua i saradnika produkovana je pri koncentraciji laktoze od 4 %.¹²⁵ Nakon dodavanja 5% laktoze, aktivnost enzima značajno opada, što se javlja kao posledica

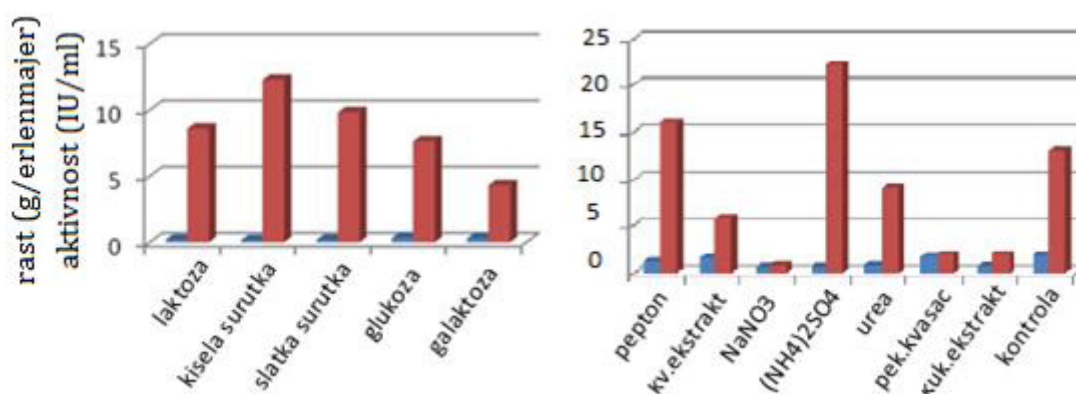
nagomilavanja visoke koncentracije glukoze, što može dovesti do represije sinteze enzima.¹³² Za različite mikroorganizme varira i maksimalna koncentracija laktoze, što se objašnjava različitim afinitetom prema induktoru, kao i različitoj sposobnosti mikroorganizma da se odupre kataboličkoj represiji glukozom. Ovo se jasno može videti na primeru sinteze β -galaktozidaze iz *L. reuteri* i *S. thermophilus* (Slika 2.17), gde su optimalne koncentracije laktoze pri identičnim uslovima gajenja iznosile 6% i 10%, redom.¹³³



Slika 2.17. Uticaj koncentracije laktoze na produkovanu aktivnost β -galaktozidaze iz *L. reuteri* i *S. thermophilus*¹³³

Kao zamena za čistu laktozu u sintetske hranljive podloge se mogu dodati različita jedinjenja, kao što su slatka i kisela surutka, permeat surutke, surutka u prahu, čime se može znatno povećati isplativost procesa. Obrano mleko se pokazalo kao najbolji medijum za proizvodnju β -galaktozidaze za *L. bulgaricus* u radu Tarija i saradnika, u poređenju sa surutkom, surutkom sa dodatkom MRS podloge i surutkom sa dodatkom kvašćevog ekstrakta.¹²⁶ Optimizacijom uslova za produkciju β -galaktozidaze iz *L. acidophilus* bavili su se Ismail i saradnici.¹³⁴ Variranjem izvora ugljenika (glukoza, galaktoza, laktoza, kisela surutka, slatka surutka i obrano mleko) utvrđeno je da je najbolji prinos intracelularne β -galaktozidaze dobijen korišćenjem kisele surutke kao izvora ugljenika nakon 48 h fermentacije, pri temperaturi od 40 °C (Slika 2.18). U istom radu, dodatno poboljšanje prinosa je postignuto korišćenjem neorganskih izvora azota (3,5 %) i

dodavanjem 0,02% MnCl_2 . Maksimalna aktivnost β -galaktozidaze dostizala je vrednost od 51,46 IU/g ćelija.¹³⁴ Kao izvori azota najčešće se koriste različita organska i neorganska jedinjenja: amonijumove soli, aminokiseline i različiti proteinski preparati. amonijum sulfata). Treba imati u vidu da lako fermentabilni izvori azota, na sličan način kao i lako fermentabilni ugljeni hidrati, mogu izazvati represiju gena za sintezu željenog enzima. Za produkciju β -galaktozidaze iz *S. thermophilus*, stimulativan efekat imaju pepton (2%) i ekstrakt kukuruza (2,8%), pri čemu se aktivnost enzima može povećati čak 30 puta.



Slika 2.18. Prikaz uticaja izvora ugljenika i azota, redom, na koncentraciju ćelija (plavo) i aktivnost β -galaktozidaze (crveno)

Takođe, porast u produkciji ovog enzima postiže se dodavanjem neorganskog izvora azota i fosfora. Jokar i Karabasi (Karabassi) su u svom radu kao osnovnu podlogu koristili permeat surutke za gajenje *L. delbrueckii* ssp. *lactis* u cilju optimizacije uslova. Poredeći uticaj dodavanja kvašćevog ekstrakta (1, 2 i 3%), ekstrakta pšenice (1, 2 i 3%) i surutke u prahu (0,5, 1 i 1,5%), došli su do zaključka da uticaj na produkciju β -galaktozidaze, i to u značajnoj meri, imaju kvašćev ekstrakt i surutka u prahu. Najveća aktivnost β -galaktozidaze (4,924 IU/ml) postignuta je kada je u permeat surutke dodato 3% kvašćevog ekstrakta, 1,5% surutke u prahu i 2% ekstrakta pšenice.¹³⁵ Ovi rezultati slažu se sa rezultatima Laksamijai saradnika, koji su poredili uticaj izvora azota (kvašćevog ekstrakta, peptona, hidrolizata kazeina, triptona i amonijum-sulfata) na produkciju β -galaktozidaze *L. delbrueckii* ssp. *lactis*. Najveća aktivnost dobijena je u prisustvu hidrolizata kazeina (46,6 IU/ml) i kvašćevog ekstrakta (46,3 IU/ml). U istom radu,

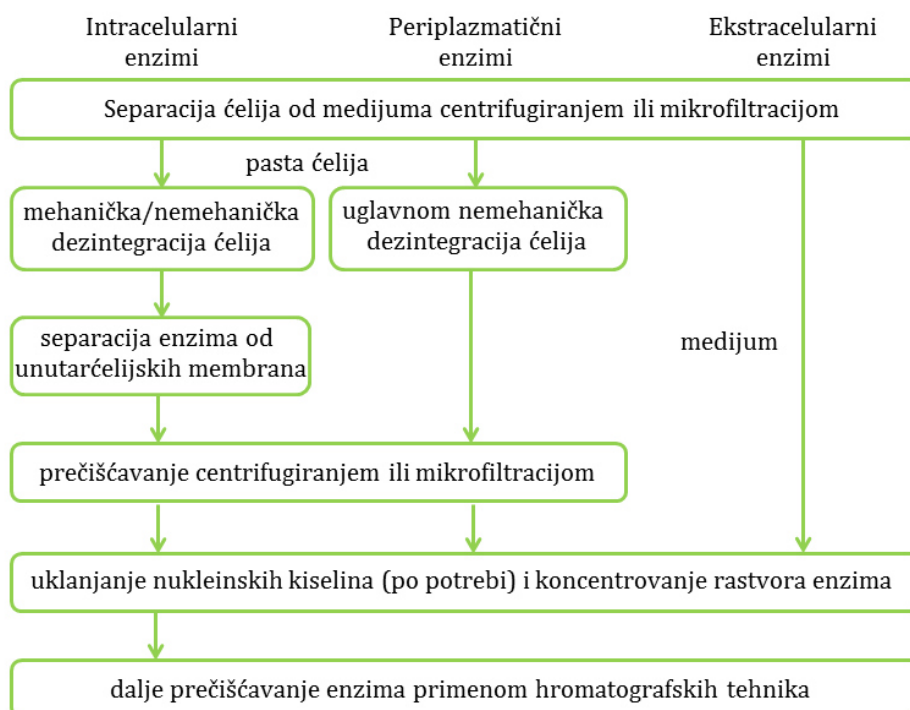
za *B. animalis*, pokazano je da se najbolja aktivnost postiže u prisustvu peptona (46,25 IU/ml) i kvašćevog ekstrakta (43,44 U/ml) uz obavezno dodavanje L-cisteina (0,05%).¹³⁰ Pored surutke i njenih derivata, koje se mogu smatrati jeftinim i lako dostupnim supstratima, za produkciju ekstracelularnih fungalnih β -galaktozidaza kao izvor ugljenika može biti korišćen i drugi agro-industrijski otpad (pirinčana prekrupa, pšenične mekinje, melasa i drugo) uz optimizovanje dodatka izvora azota. Tako je β -galaktozidaza iz *A. niger* dobijena na podlozi korišćenjem pšeničnih mekinja kao izvora ugljenika. Visoki prinosi dobijeni su dodavanjem 0,246% koncentrovanog kukuruznog ekstrakta, ribljeg brašna ili uree, dok su se neorganska jedinjenja (amonijum-sulfat i diamonijum-fosfat) pokazali kao loši izvori azota. U drugom radu, Nizamudin (Nizamuddin) i saradnici uspeali su da dobiju maksimalnu aktivnost β -galaktozidaze pri fermentaciji na čvrstoj podlozi, smeši pšenične i pirinčane prekrupe u koju je dodato 12,5% glukoze i 1% natrijum-nitrata.¹²¹

U cilju dobijanja maksimalne aktivnosti β -galaktozidaze iz *Kluyveromyces marxianus*, Kumari i saradnici su pored optimizacije hranljive podloge (izvori azota i ugljenika) u obzir uzeli u uticaje drugih procesnih parametara (pH, temperatura, aeracija, mešanje). Kao osnovna podloga u njihovom radu korišćen je permeat surutke sa dodatkom kvašćevog ekstrakta, kome su u cilju poboljšanja produkcije β -galaktozidaze dodavani različiti suplementi. Poređenjem različitih izvora azota (amonijum-nitrat, amonijum-sulfat, natrijum-nitrat, L-aspartat, L-glutamat i urea), utvrđeno je da se najbolja aktivnost β -galaktozidaze postiže u prisustvu uree i to u koncentraciji do 0,1%. Što se prisustva soli tiče, najbolja aktivnost je postignuta dodavanjem magnezijum-sulfata. Daljim optimizovanjem uslova, pri pH 5,5, i temperaturi od 30 °C, nakon 28 h fermentacije postignuta je maksimalna aktivnost β -galaktozidaze 1,71 IU/mg.¹³⁶ Rek (Rech) i saradnici dobili su β -galaktozidazu (10 IU/ml) iz *K. marxianus* u aerisanom bioreктору sa 210 g/l surutke, na 37 °C, pri mešanju (500 rpm).¹³⁷ Pinjeiro (Pinheiro) i saradnici pratili su uticaj pritiska na produkciju β -galaktozidaze, pri čemu su dobili da se aktivnost poveća skoro tri puta koristeći pritisak od 6 bar umesto atmosferskog.¹³⁸ Pojedini autori koristili su principe statističkog planiranja eksperimenata kako bi ustanovili

uticaj različitih parametara na proces biosinteze β -galaktozidaze, ali i kako bi utvrdili njihove međusobne uticaje.^{5, 139, 140} Tako je Braga sa saradnicima ispitujući produkciju β -galaktozidaze iz *K. marxianus* došao do sledećeg optimalnog sastava podloge: koncentracija laktoze (iz surutke) 120 g/l, kvašćevog ekstrakta 5 g/l, peptona 15 g/l, amonijum sulfata 15 g/l i otpadna voda od prerade pirinča 30 g/l, pri pH 4, kako bi se dobila maksimalna aktivnost β -galaktozidaze od 10,4 IU/ml.¹³⁹ Sa druge strane Dagbagli i Gonskur, u optimizaciju produkcije β -galaktozidaze iz *K. lactis* uključili su i parametre procesa, kao što su vreme i brzina mešanja, pri čemu su dobili da se maksimalna aktivnost enzima (4,218 IU/mg) dobija pri pH 7,35, brzini mešanja 179,2 rpm, koncentraciji šećera 24,9 g/l u trajanju od 50,9 h.¹⁴⁰

2.2.3. Izolovanje i prečišćavanje enzima

Nakon optimizacije proizvodnje enzima, kako bi dobijeni enzimi bili u željenom obliku i potrebnog nivoa čistoće, neophodno je da prođu kroz niz operacija izolovanja i prečišćavanja. (Slika 2.19)



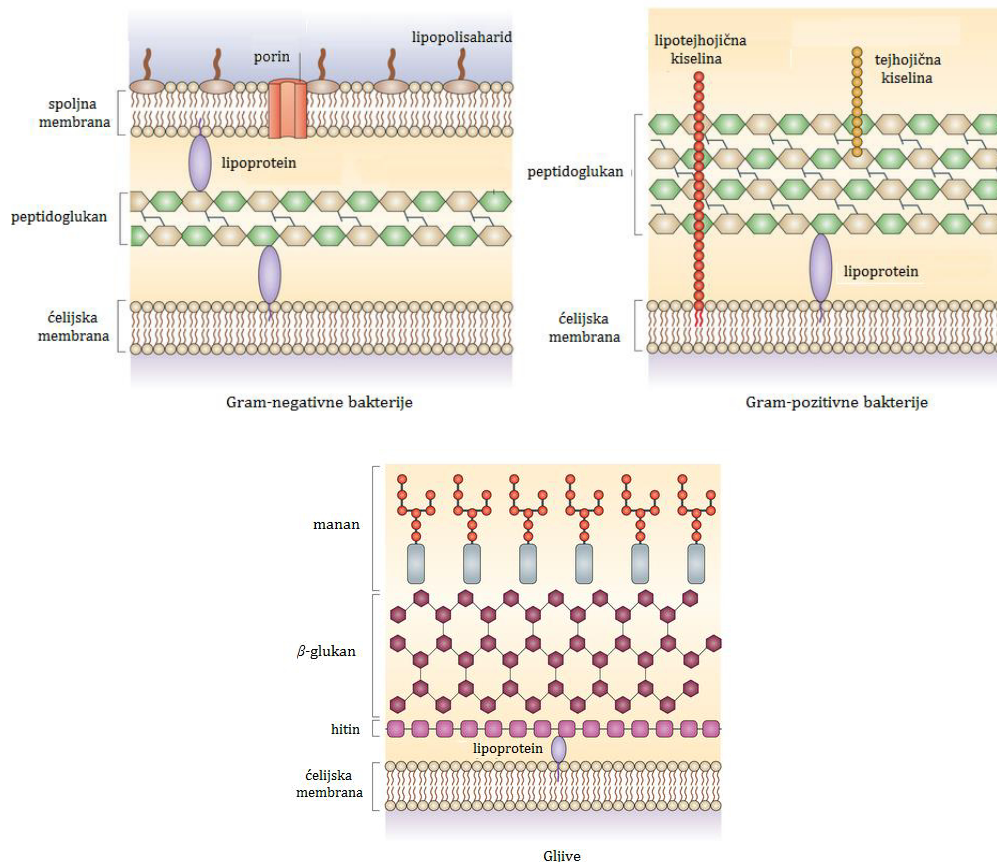
Slika 2.19. Opšta šema izolovanja i prečišćavanja enzima⁵⁵

Pri odabiru adekvatnih metoda treba imati u vidu izvor i lokaciju enzima, koncentraciju produkovanog enzima, njihove fizičko-hemijske karakteristike, kao i polje primene enzima.^{55, 141} Većina mikrobnih β -galaktozidaza (bakterije, kvasci) su intracelularni enzimi i ne mogu biti oslobođeni iz ćelija pod normalnim uslovima fermentacije,³ već je potrebno izvršiti njihovo izolovanje, razaranjem ili ekstrakcijom iz ćelija, a potom, ukoliko je potrebno, izvršiti njihovo prečišćavanje. Dok sa druge strane, β -galaktozidaze poreklom iz plesni, nekih bakterija i genetički manipulisanih organizama predstavljaju ekstracelularne enzime, kod kojih se enzim izoluje iz profermentisanog medijuma. Enzimi se potom, u zavisnosti od polja primene i osobina producenta, mogu koristiti kao sirovi preparati, ili se pak moraju podvrgnuti metodama koncentrovanja i eventualno dodatnog prečišćavanja.

2.2.3.1. Metode razaranja ćelije

Ukoliko je enzim intracelularne prirode, prvi stupanj u procesu njegovog izolovanja podrazumeva dezintegraciju ćelija. Ćelije su od okoline odvojene ćelijskom membranom, a mnoge i ćelijskim zidom, pri čemu su funkcije ovih komponenata ćelije višestruke. Naime, ćelijske membrane održavaju konstantnim sadržaj ćelije i omogućavaju razmenu materija sa spoljašnjom sredinom, dok ćelijski zid čini ćeliju elastičnom i obezbeđuje joj svojevrsnu mehaničku otpornost.¹⁴¹ Stoga, prilikom odabira odgovarajućih metoda za razaranje ćelije, potrebno je poznavati građu ćelijskog zida i imati u vidu specifičnost komponenata koje obezbeđuju njegovu čvrstinu (Slika 2.20). Osnovni otpor razaranju ćelijskog zida Gram pozitivnih bakterija, na primer, čini mreža peptidoglukana. Čvrstina ove mreže zavisi od učestalosti sa kojom se peptidne jedinice javljaju na glukanskim lancima, kao i od stepena njihove umreženosti. Sa druge strane, kod Gram negativnih bakterija ćelijski zid je tanji i manje čvrst, ali je zato njegova struktura složenija, kako u konfiguraciji, tako i u broju makromolekularnih komponenti. Naime, ćelijski zid Gram negativnih bakterija izgrađen je od dva različita sloja, gde lipopolisaharidi, lipoproteini i fosfolipidi čine sastav spoljne membrane, dok je tanki unutrašnji sloj sastavljen od mukopeptida i tehojnih kiselina. Konačno,

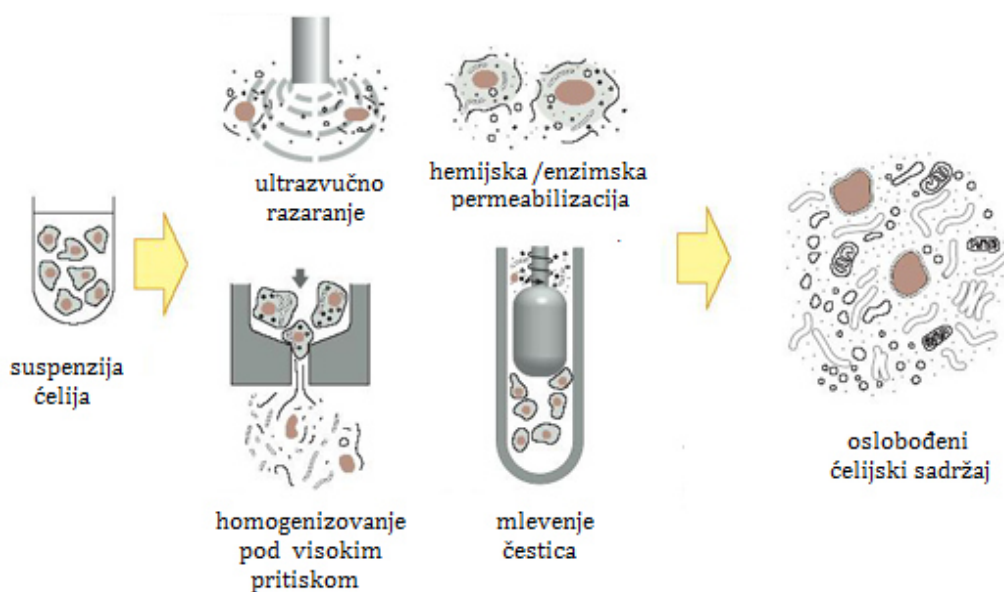
osnovne strukturne komponente ćelijskog zida kvasaca predstavljaju glukani, manani i proteini. Ukupna debljina ćelijskog zida kvasaca je veća nego u slučaju bakterija, ali nasuprot tome, njihovo razaranje je generalno jednostavnije.¹⁴²



Slika 20. Građa ćelijskog zida bakterija i kvasaca ¹⁴³

Treba imati u vidu, međutim, da je građa ćelijskog zida sklona promenama, i da u velikoj meri zavisi od vrste organizma, fiziološkog stanja i starosti ćelije, ali i od spoljašnjih uslova uključujući temperaturu kultivacije, prisustva određenih hemijskih jedinjenja u okolini ćelije, sastava hranjive podloge, faze rasta, kao i specifične brzine rasta.¹⁴¹ Utvrđeno je, naime, da je lakše izvršiti razaranje ćelija u logaritamskoj, nego u stacionarnoj fazi ćelijskog rasta, jer je u stacionarnoj fazi brzina rasta niža, a deo energije se preusmerava sa ćelijske reprodukcije na sintezu komponenata i jačanje strukture ćelijskog zida. ¹⁴² Stoga, u cilju izbora adekvatne metode za dezintegraciju ćelija, treba obratiti pažnju i na ove faktore.

U najširem smislu metode razaranja ćelije mogu se klasifikovati u dve grupe: mehaničke i nemehaničke metode. Mehaničke metode su pogodnije za industrijsku primenu i imaju veći komercijalni značaj, dok su nemehaničke metode, kao što su hemijska i enzimska liza ćelije, osmotski šok, uzastopno odmrzavanje i zamrzavanje, desikacija i druge fizičke metode specifičnije i manje agresivne, ali nepogodne za industrijsku primenu, jer su hemikalije i enzimi koji mogu da razore ćeliju skupi ili je njihovo prisustvo u proizvodu nepoželjno.⁵⁵ U svakom slučaju krajnji ciljevi razaranja ćelija su isti, i to: oslobađanje što veće količine enzima uz maksimalno očuvanje aktivnosti, izbegavanje naknadnih promena strukture proizvoda (denaturacije, oksidacije, proteolize) i smanjenje negativnog uticaja ovog na naredne separacione korake.¹⁴¹



Slika 2.21. Metode razaranja ćelija

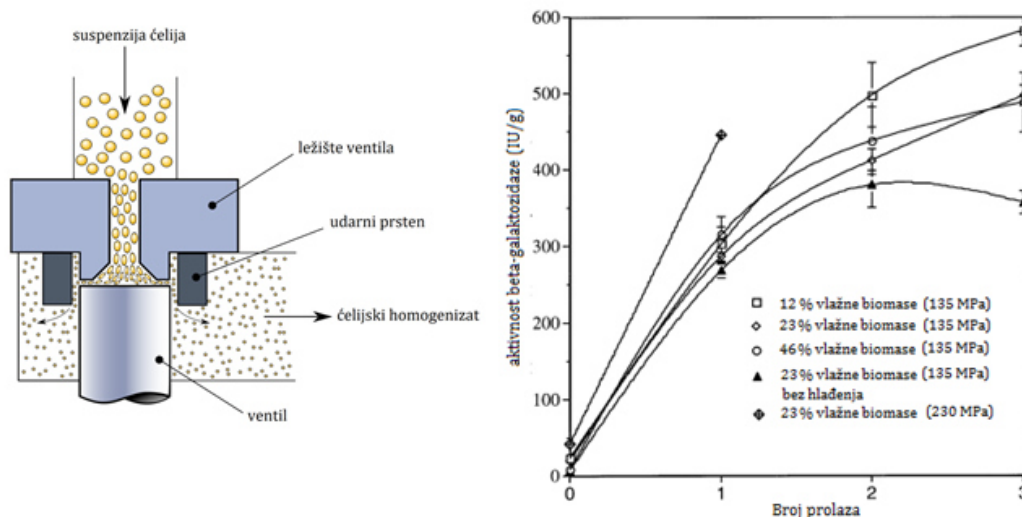
2.2.3.2. Mehaničke metode dezintegracije ćelija

Zajednički princip ove grupe metoda je izloženost ćelija visokom stresu, a mehanizmi razaranja ćelija podrazumevaju fenomene kavitacije, smicanja, sudaranja, ili pak njihove kombinacije.¹⁴² Tokom primene ovih metoda dolazi do oslobađanja velike količine energije, te je neophodno intenzivno hlađenje suspenzije tokom rada kako ne bi došlo do inaktivacije enzima. U ove metode

spadaju: homogenizovanje pod visokim pritiskom, mlevenje u mlinu sa dodatkom abrazivnih sredstava, ultrazvučna dezintegracija i dezintegracija primenom presa.

2.2.3.2.1. Homogenizatori pod visokim pritiskom

Homogenizatori pod visokim pritiskom predstavljaju najčešće korišćene uređaje za dezintegraciju ćelija na industrijskom nivou. Uređaj se sastoji iz pumpe visokog pritiska koja potiskuje suspenziju ćelija kroz ventil za pražnjenje sa suženim izlaznim otvorom u cilindar pumpe (Slika 2.22). Prilikom prolaska suspenzije ćelija pod pritiskom velikom brzinom kroz uski otvor ćelije se razaraju usled delovanja smicajnih sila, pada pritiska i kavitacionog fenomena. Operativni parametri kojima se može manipulirati jesu radni pritisak i vrsta ventila, a optimalni uslovi rada homogenizatora moraju se prilagoditi vrsti ćelija i lokaciji enzima u njoj. Povećanjem operativnog pritiska moguće je smanjiti potreban broj prolaza da bi se postigao željeni stepen dezintegracije, međutim pri takvim uslovima dolazi i do povećanja oslobođene toplote, što se može negativno odraziti na aktivnost enzima, naročito ukoliko su termolabilni.



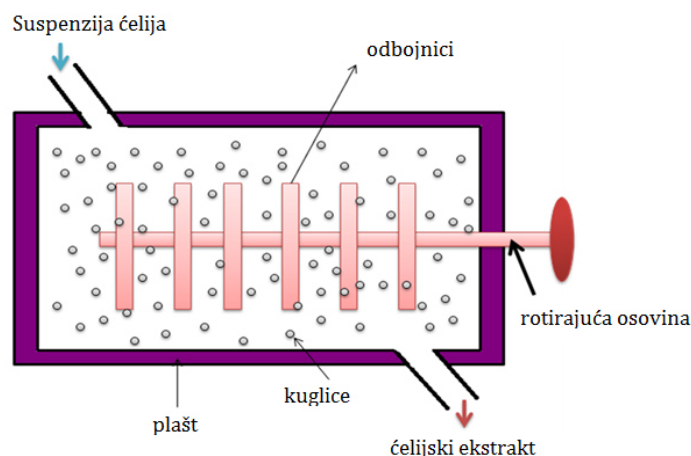
Slika 2.22. Šematski prikaz homogenizatora pod visokim pritiskom. (a) Uticaj različitih faktora na razaranje *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* pomoću homogenizatora pod visokim pritiskom (b) ¹⁴⁴

Tako na primer, u slučaju razaranja *L. delbrueckii ssp. Bulgaricus* (Slika 2.22b), povećanjem operativnog pritiska sa 135 MPa na 200 MPa dolazi do značajnog

povećanja u oslobođenoj aktivnosti β -galaktozidaze, tako da se već pri prvom prolazu ostvaruje produktivnost uporediva sa tri prolaza pri nižem pritisku. Takođe, može se primetiti da sa izostankom hlađenja dolazi do gubitka dela oslobođene aktivnosti, najverovatnije usled termičke denaturacije.¹⁴⁴ U svom radu Kunija (Coonia) i Lele takođe primenjuju ovaj vid razaranja u cilju oslobađanja intracelularne β -galaktozidaze iz *L. acidophilus* pri čemu je postignuta maksimalna aktivnost 0,912 IU/ml nakon 9 prolaza pri pritisku od 55,4 MPa.¹⁴⁵

2.2.3.2.2. Mlevenje ćelija uz dodatak abrazivnih sredstava

Mlevenje ćelija uz dodatak abrazivnih sredstava predstavlja jednostavnu i efikasnu metodu dezintegracije ćelija koja može biti primenjena na laboratorijskom, ali i industrijskom nivou. Dostupan je širok spektar potencijalnih konstrukcija uređaja, a najčešće se prave sa horizontalno ili vertikalno postavljenom komorom sa plaštom za hlađenje u koju su smeštene kuglice.



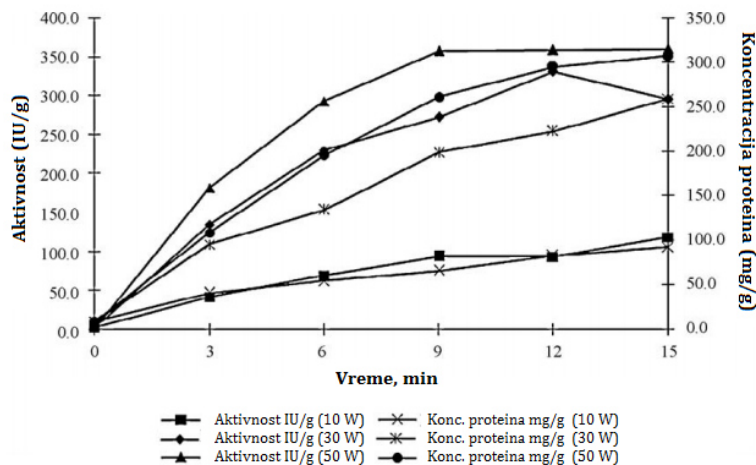
Slika 2.23. Šematski prikaz mlina sa abrazivnim sredstvima

U komori se nalazi i rotirajuća osovina na koju su postavljeni odbojnici (Slika 2.23). Obrtanjem osovine, energija sa odbojnika prelazi na kuglice koje mehanički razbijaju ćelije, ali uspešnom razaranju doprinose i smicajne sile koje se javljaju kretanjem kuglica kroz suspenziju.¹⁴¹ Kao punjenje najčešće se koriste staklene kuglice ili kvarcni pesak, a izbor prečnika i količine punjenja su osnovni parametar za optimizaciju procesa razaranja. Njihov izbor zavisi od lokacija željenog enzima u

ćeliji, tako na primer, za razaranje bakterija i oslobađanje enzima lokalizovanih u citoplazmi pogodnije su sitnije čestice (0,1-0,15 mm), dok se za oslobađanje periplazmatičnih enzima i razaranje kvasca preporučuje upotreba krupnijih čestica (0,25-0,75 mm).¹⁴² Step en efikasnosti razaranja ćelija povećava se sa povećanjem količine punjenja, ali istovremeno povećavaju se količina oslobođene toplote i ukupna potrošnja energije. Pronađeno je da je optimalna koncentracija punjenja 80-85%.^{142, 146} Na efikasnost procesa razaranja pozitivno utiče i povećanje brzine mešanja, čime se takođe povećavaju i potrošnja energije i produkcija toplote. Primeri razaranja ćelija ovim metodom u cilju izolovanja β -galaktozidaze su brojni.^{25, 33, 138, 146} Pri trećem prolasku kroz komoru mlina napunjenu (85%) sa česticama prešnika 0,5 mm pri brzini od 2000 rpm, Garido (Garrido) i saradnici uspeali su da u potpunosti izoluju β -galaktozidazu iz *S. cerevisiae*. U laboratorijskim uslovima, često je korišćena pojednostavljena metoda razaranja pomoću abrazivnih sredstava, što najčešće podrazumeva intenzivno vorteksiranje suspenzije ćelija sa abrazivnim sredstvima.^{134, 147, 148}

2.2.3.2. Ultrazvučna dezintegracija ćelija

Razaranje ćelija može se izvršiti primenom ultrazvuka (iznad 18 kHz) u ultrazvučnom dezintegratoru.



Slika 2.24. Uticaj jačine ultrazvuka na izolovanje bakterijske β -galaktozidaze ¹⁴⁴

Smatra se da se ovo razaranje odvija zahvaljujući fenomenu kavitacije, odnosno stvaranju lokalnih razlika u pritisku usled čega nastaju kavitacioni mehuri koji vremenom rastu i pucaju. Parametri od kojih zavisi efikasnost ove metode su jačina ultrazvuka, dužina trajanja razaranja, kao i zapremina suspenzije ćelija koja se tretira. Osnovni nedostaci ove metode su lokalno oslobađanje velike količine energije koja može dovesti do inaktivacije enzima, kao i osetljivost pojedinih enzima na ultrazvučne talase. Iako postoje primeri korišćenja ove metode za razaranje ćelija u cilju oslobađanja intracelularne galaktozidaze, ova metoda nema veći industrijski značaj.^{135, 149-151}

2.2.3.3. Nemehaničke metode razaranja ćelija

2.2.3.3.1. Fizičke metode razaranja ćelija

Fizičke metode razaranja ćelija su izuzetno jeftine, jednostavne i blage u odnosu na mehaničke metode, ali često zametne, neefikasne i sa ograničenom primenljivošću u većim razmerama.⁵⁵ Jedna od ovih metoda je metoda dekompresije koja podrazumeva rastvaranje gasa unutar ćelija pod visokim pritiskom u odgovarajućem sudu. Nakon otpuštanja pritiska, gas se naglo oslobađa u vidu mehurića koji uzrokuju pucanje i oslobađanje sadržaja ćelije. Potom, u fizičke metode ubraja se metoda koja podrazumeva primenu osmotskog šoka, gde se ćelije prvo suspenduju u puferima visokog osmotskog pritiska, a potom prebace u rastvor niskog osmotskog pritiska, usled čega dolazi do difundovanja molekula vode, pucanja membrana i oslobađanja sadržaja ćelija. Od fizičkih metoda još se primenjuju metode razaranja ćelija uzastopnim zamrzavanjem/odmrzavanjem i sušenje zamrzavanjem.⁵⁵ Međutim, ove metode retko su korišćene za izolovanje β -galaktozidaza, a i u slučajevima kada su korišćene pokazale su se krajnje neefikasnim.^{127, 152}

2.2.3.3.2. Enzimski liza ćelija

Najstariji metod razaranja ćelije bila je metoda autolize, koja se javlja kao posledica produkovanja endogenih enzima. Ovaj način razaranja često se primenjuje kod

kvasaca, međutim, primećeno je da kod bakterija mlečne kiseline takođe dolazi do autolize ćelija, što objašnjava prisustvo slobodne β -galaktozidaze u jogurtu i drugim mlečnim proizvodima. U svom radu Montanari i saradnici dokazali su da *L. brevis* tokom fermentacije ispušta određenu količinu intracelularne β -galaktozidaze u fermentacioni medijum.¹⁵³ Međutim, ova metoda je izuzetno spora i često nedovoljno efikasna. Kako bi se prevažili ovi nedostaci, naučnici su došli na ideju tretiranja ćelija enzimima u cilju postizanja efikasnijeg razaranja. Enzimski liza ćelija kvasaca zbog kompleksne građe (Slika 2.20) zahteva upotrebu smeše enzima: proteaza za razaranje spoljnog proteomananskog sloja i β -(1,3)-glukanaza koji razlažu unutrašnji glukanski sloj, pa je najčešće korišćeni enzimski preparati za razgradnju ćelija kvasaca su zimolaza i litikaza.^{141, 142} Sa druge strane, kada je reč o bakterijama, najčešće korišćeni enzim je lizozim. Ovaj enzim razlaže β -(1,4) veze između N-acetil-muraminske kiseline i N-acetil-D-glukozamina prisutne u peptidoglukanskom sloju, usled čega dolazi do degradacije peptidoglukanske strukture, čime se povećava propustljivost ćelijskog zida i omogućava ekstrakcija intracelularnog sadržaja.¹⁴¹ Njegovim delovanjem efikasno se razara ćelijski zid Gram pozitivnih bakterija, dok kod gram negativnih bakterija prepreku maksimalnoj efikasnosti predstavlja spoljašnji lipoproteinski sloj koji štiti sloj peptidoglukana. Stoga se, za razaranje gram negativnih bakterija, enzim najčešće koristi zajedno sa helirajućim sredstvom (EDTA).¹⁴¹ Iako se ova metoda pokazala izuzetno efikasnom, veći komercijalni značaj ove metode onemogućen je ograničenom dostupnošću i izrazito visokom cenom enzima.

2.2.3.3.3. Hemijska permeabilizacija ćelija

Upotreba hemijskih sredstava (organski rastvarači, deterdženti, baze, antibiotici ili haotropni reagensi) za izolovanje intracelularnih proizvoda zasniva se prvenstveno na povećanju permeabilnosti ćelijske membrane mikroorganizama. Ove metode su široko aplikativne, a uslovi permeabilizacije zavise od vrste i karakteristika tretiranih ćelija, ali i osobina željenog proizvoda. Prilikom primene ove metode, naročitu pažnju treba obratiti na stabilnost enzima u prisustvu sredstava za permeabilizaciju. Najčešće korišćeni hemijski agensi su organski

rastvarači. Za izolovanje β -galaktozidaza isprobani su: toluen, hloroform, etanol, metanol, izopropil alkohol.¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ Pinjo (Pinho) i saradnici su oslobodili približno 90% intracelularne aktivnosti (2,2 IU/g ćelija) nakon inkubacije ćelija sa 2% hloroformom u 0,1 M fosfatnom puferu (pH 7) u trajanju od 9 h.¹⁵⁴ Slične metode ekstrakcije rastvaračima sproveli su i drugi naučnici.^{127, 157, 158} Becera (Becerra) i saradnici ispitali su delovanje različitih rastvarača u cilju ekstrakcije enzima β -galaktozidaze iz *Kluyveromyces lactis*. U prvoj fazi eksperimenta suspenzija ćelija (2 g ćelija vlažne mase u 20 ml 0,5 M fosfatnom puferu, pH=9,5) je tretirana 1% hloroformom na 37 °C u toku 3h. U drugoj fazi eksperimenta ekstrakcija je vršena pomoću četiri različita organska rastvarača (etanol, metanol, izopropanol i *t*-butanol), pri različitim vremenima ekstrakcije (nakon 5 h i 21 h).¹⁵⁸ Pored organskih rastvarača, nejonski deterdženti takođe se koriste za oslobađanje enzima β -galaktozidaza u spoljašnju sredinu, rastvaranjem ćelijske membrane. Najčešće se koriste: Triton X-100, SDS, digitonin i saponin, sami ili u kombinaciji sa organskim rastvaračima.^{155, 156}

2.2.2.3.4. Permeabilizacija mikrobnih ćelija

Utvrđeno je da je industrijska upotreba β -galaktozidaze otežana zbog velikih troškova potrebnih za postizanje dovoljnog prinosa pri oslobađanju aktivnog enzima iz ćelija kao i troškova prečišćavanja, što se naročito odnosi na dobijanje β -galaktozidaze iz bakterija i kvasaca. Stoga, upotreba celih ćelija kao izvora β -galaktozidaze predstavlja interesantnu alternativu. Osnovni problem korišćenja celih ćelija jeste slaba permeabilnost membrane za laktozu, pa su u cilju povećanja permeabilnosti ispitan uticaj različitih hemijskih (organski rastvarači i deterdženti)^{159, 160} i mehaničkih metoda (razaranje abrazivnim sredstvima i primenom presa)¹⁶¹. Deterdženti kao što su digitonin i cetiltrimetilamonijumbromid (CTAB) su se pokazali uspešno u povećanju permeabilnosti ćelija kvasaca što je rezultovalo i nekoliko puta većom aktivnošću permeabilizovanih ćelija u odnosu na netretirane ćelije. Oksigal i Triton X-100 pokazali su se pogodnim u permeabilizaciji ćelija *Streptococcus* sp. pri čemu je postignut visok nivo enzimske aktivnosti.¹⁶² Među različitim rastvaračima testiranim za permeabilizaciju ćelija

kvasaca hloroform, etanol, smeša hloroform-etanol i smeša etanol-toluen rezultirale su dobrim permeabilizacionim prinosom.¹⁶³⁻¹⁶⁶ Etanol u koncentraciji 30-55% uzrokuje 15 puta povećanje aktivnosti β -galaktozidaze tokom permeabilizacije sa *S. thermophilus* i *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*.¹⁶⁷ Hidroliza laktoze surutke i mleka, korišćenjem etanolom permeabilizovanih ćelija, u bioreaktoru sa pakovanim slojem, pokazala je da permeabilizacija povećava brzinu hidrolize laktoze, pri čemu 99,5% laktoze iz surutke mleka hidrolizuje za 30 min na 30°C.¹⁶⁸ Permeabilizovane ćelije sve se više koriste i u sintezi galakto-oligosaharida.^{165, 169, 170} U radu Gobinata (Gobinath) i saradnika, nakon permeabilizacije ćelija *L. plantarum* sa SDS-om, postignut je prinos galakto-oligosaharida od 34%, pri početnoj koncentraciji laktoze od 40% na temperaturi 50 °C nakon 12 h.¹⁶⁵

2.2.3.2 Prečišćavanje mikrobnih β -galaktozidaza

Prečišćavanje enzima iz fermentacione tečnosti ili ćelijskog ekstrakta, dobijenog primenom neke od metoda iz poglavlja 2.2.3, varira od jednostavne jednostepene precipitacione procedure do skupih i hromatografskih tehnika visoke rezolucije, kojima se enzimi razdvajaju na osnovu minimalnih razlika u svojim fizičko-hemijskim osobinama. Često je potrebno više koraka da bi se dostigla željena čistoća enzimskog preparata, a ključ uspešnog i efikasnog prečišćavanja enzima je u odabiru najpogodnija tehnike i optimizaciji njenog učinka. Cilj prečišćavanja je dobijanje preparata željene čistoće u što manjem broju primenjenih koraka, zato je od izuzetne važnosti pre definisanja protokola za prečišćavanje imati jasan cilj primene željenog enzima, odnosno ciljani nivo čistoće enzima.

Prvu fazu prečišćavanja, naročito kod ekstracelularnih enzima, čini koncentrovanje enzima. Na ovaj način, smanjuju se troškovi hemikalija zbog dalje obrade manjih zapremina, kao i operativni troškovi usled manipulacije manjim zapreminama. Najčešće metode koje se koriste za koncentrovanje proizvoda su: ultrafiltracija, taloženje (solima, rastvaračima, polielektrolitima), izmena jona, vakuum dijaliza i liofilizacija.⁵⁵ Za većinu komercijalnih primena mikrobnih β -galaktozidaza, ukoliko

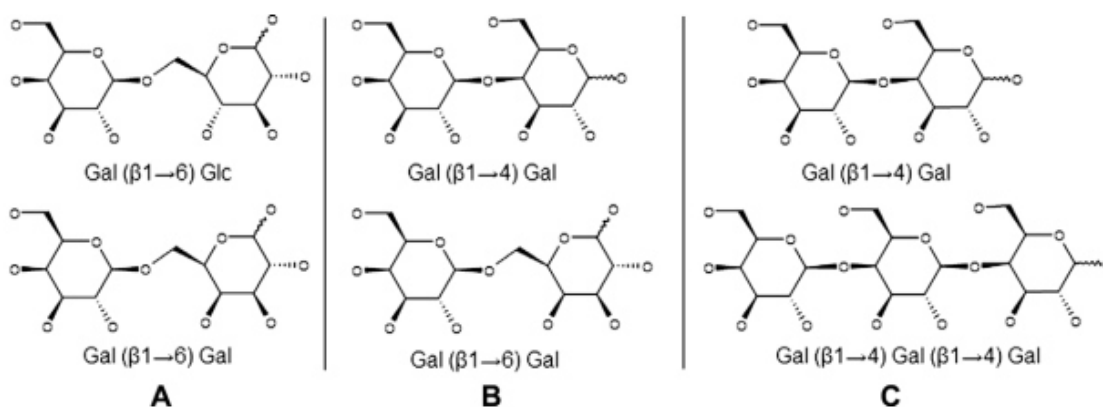
su dobijene pomoću producenata sa GRAS statusom, nisu potrebni naročito prečišćeni enzimski preparati, pa su ove metode i više nego dovoljne. Na primer, u radu Makara (Makkar) i saradnika opisano je prečišćavanje enzima β -galaktozidaze iz *Lb. bulgaricus* primenom isoljavanja.¹⁷¹ Naime, supernatant zaostao nakon centrifugiranja razorenih ćelija *L. bulgaricus*, u kome se nalazi enzim β -galaktozidaza tretira se dodavanjem amonijum-sulfata do 60% zasićenja, pri čemu dolazi do taloženja enzima. Talog se potom odvaja centrifugiranjem i resuspenduje u 0,05 M fosfatnom puferu (pH 6,5), nakon čega se dijalizira u vodi u toku 24 h na 4 °C. Nakon ispitivanja aktivnosti ovako prečišćenog preparata utvrđeno je da se specifična aktivnost enzima povećala čak sedam puta.¹⁷¹ Imajući u vidu da se radi o bakteriji mlečne kiseline koja je sigurna za upotrebu, dalje prečišćavanje nije bilo neophodno. Slično, u svom radu Sad (Saad) je opisao jednostavan postupak prečišćavanja ekstracelularne β -galaktozidaze iz *A. japonicus*.¹⁷² Prvi korak u prečišćavanju predstavljalo je taloženje enzima hladnim etanolom, u odnosu 1:1. Etanol je doveo do sniženja dielektrične konstante rastvora enzima, čime je došlo do povećanja interakcija između naelektrisanih molekula enzima i smanjenja interakcija sa vodom, odnosno taloženja. Talog je potom rastvoren u kalijum-fosfatnom puferu (pH 6,8) i rastvoru je dodato 0,5% bentonita, koji se ponaša kao katjonski izmenjivač. Nakon mešanja enzim β -galaktozidaza zaostaje u rastvoru, potom se vrši njegova dijaliza i liofilizacija. Faktor prečišćavanja ovog enzima iznosio je 6,42, dok je prinos aktivnosti bio oko 25%.¹⁷²

Iako je nekada dovoljno samo izvršiti koncentrovanje enzima, postizanje višeg stepena prečišćenosti omogućava efikasniju upotrebu, a i neophodan je za dodatno karakterisanje (određivanje molarne mase, izoelektrične tačke i slično), pa se dalje prečišćavanje vrši najčešće različitim hromatografskim tehnikama: jonoizmenjivačkom, gel-filtracionom, adsorpcionom, i afinitetnom hromatografijom i hromatofokusiranjem. Za prečišćavanje β -galaktozidaza korišćene su i tehnike razdvajanja u dvofaznim vodenim sistemima (ATPS), nastalim najčešće mešanjem vodenih rastvora dva međusobno nekompatibilna polimera (PEG i dekstran) ili pak polimera i soli (PEG i kalijum-fosfat).¹⁷³⁻¹⁷⁵ De

Silva i Franko (de Silva i Franco) su opisali proces bioafinitetnog razdvajanje β -galaktozidaze iz *K. fragilis* u vodenom dvofaznom sistemu (ATPS) sa hemijski modificovanim PEG-om.¹⁷⁴ Kako je u prethodnim eksperimentima utvrđeno da se β -galaktozidaza iz *K. lactis* ne može od svojih kontaminenata razdvojiti komercijalnim vodenim dvofaznim sistemima, oni su razvili novi sistem u cilju postizanja bolje i efikasnije separacije. Razvijen je novi afinitetni sistem hemijskom modifikacijom PEG 4000, vezivanjem biospecifičnog liganda *p*-aminofenil-1-tio- β -D-galaktopiranozida (APGP). Zamenom konvencionalnog PEG u sistemu 6% PEG 4000 i 8% dekstrana sa sintetisanim PEG-APGP, uočeno je da je faktor prečišćavanja porastao sa 2,8 na 9,7. U drugom koraku sistem 13% PEG-APGP i 9% fosfata korišćen je za izmenu vrednosti koeficijenta raspodele, odnosno u cilju dobijanje enzima iz donje faze bogate solima.¹⁷⁴

2.3. Galakto-oligosaharidi (GOS)

Galakto-oligosaharidi (GOS) predstavljaju kompleksnu smešu nesvarljivih ugljenih hidrata, najčešće izgrađenih od 2-8 monosaharidnih jedinica, terminalne glukoze i nekoliko preostalih galaktoznih jedinica ili pak dve galaktozne jedinice, koji nastaju transgalaktozilacijom laktoze katalizovanom β -galaktozidazama. Ova jedinjenja međusobno se razlikuju po sastavu, vrstama veza, kao i stepenu polimerizacije (Slika 2.25), što značajno utiče i na različitost fizičkih, hemijskih i funkcionalnih svojstava ovih jedinjenja.

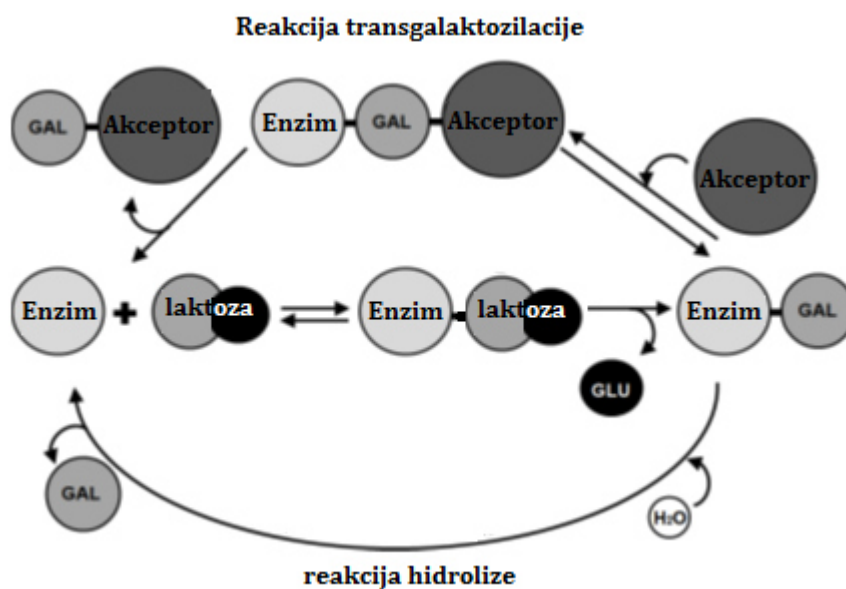


Slika 2.25. Raznovrsnost strukture galakto-oligosaharida: (A) sastav, (B) vrste veza, (C) stepen polimerizacije ¹⁴

Kada su prvi put detektovani, tokom procesa hidrolize laktoze, smatrani su nepoželjnim nusproduktima, koji zbog svog niskog stepena slatkoće i nesvarljivosti negativno utiču na kvalitet dobijenih proizvoda.¹⁷⁶ Međutim, sličnost sa oligosaharidima humanog mleka (HMO), i sposobnost oponašanja njihovih osobina i funkcija, obnovila je interesovane za ova jedinjenja. Imajući ovo u vidu, ne čudi činjenica da se galakto-oligosaharidi u najvećoj meri koriste kao dodatak mlečnim formulama za ishranu beba.^{14, 177} Tokom prethodnih nekoliko decenija, ispitani su i opisani brojni načini dobijanja galakto-oligosaharida, a oni se danas komercijalno proizvode u Japanu i Evropi i smatra se da njihov udeo u svetskom tržištu prebiotika za 2013. godinu iznosio 94100 t, dok se do 2020. godine predviđa rast na oko 175500 t.¹⁷⁸

2.3.1. Proizvodnja galakto-oligosaharida

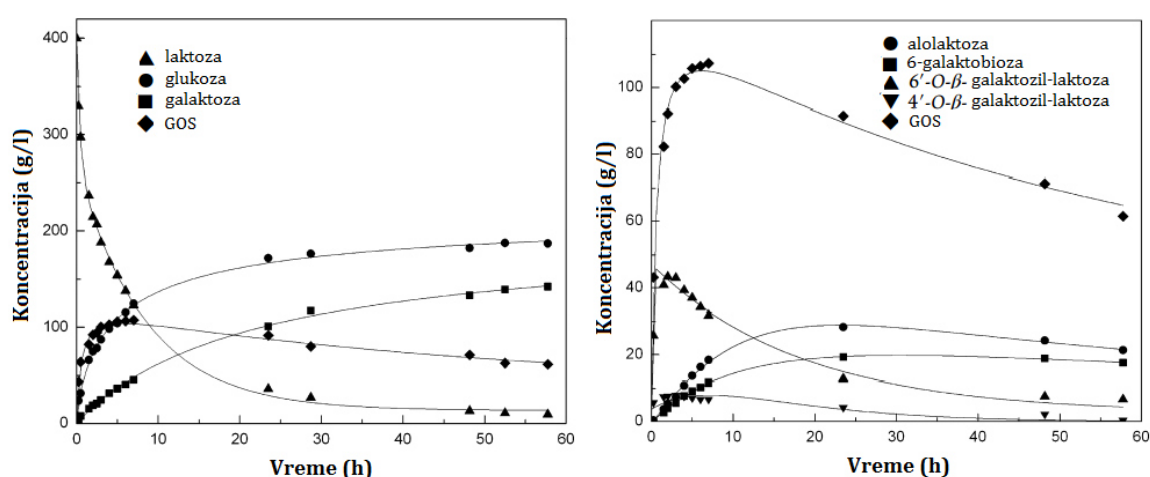
Galakto-oligosaharidi su prisutni u različitim prirodnim izvorima kao što su mleko, voće, povrće i med, ali se uglavnom dobijaju konverzijom laktoze zahvaljujući transgalaktozilacionom delovanju β -galaktozidaza. Postoje primeri hemijske sinteze galakto-oligosaharida pod dejstvom neorganskih kiselina,^{179, 180} kao i primeri sinteze pod dejstvom glikoziltransferaza (EC 2.4.X),^{181, 182} ali oni nisu široko rasprostranjeni. Glikoziltransferaze su jako efikasne, poseduju visoku stereo- i regiospecifičnost, međutim, njihovu širu upotrebu ograničava njihova visoka cena, nedostupnost, kao i potreba za korišćenjem specifičnih supstrata (šećernih nukleotida). β -Galaktozidaze sa druge strane, predstavljaju slabo selektivne, primarno hidrolitičke enzime, ali su veoma dostupne i ne zahtevaju nikakve dodatne korake pripreme supstrata, već koriste široko dostupan supstrat – laktozu. Interesantno je da se za sintezu galakto-oligosaharida mogu koristiti ne samo rastvori laktoze, već i mleko, surutka, derivati surutke, jogurt itd.



Slika 2.26. Mehanizam reakcija katalizovanih β -galaktozidazama¹⁸³

Sinteza galakto-oligosaharida pomoću β -galaktozidaze odigrava se prema već definisanom mehanizmu transgalaktozilacije. Reakcija započinje formiranjem enzim-galaktozil kompleksa, nakon čega enzim vrši prenošenje galaktozil grupe na

neki od akceptora prisutnih u smeši. Pošto svi šećeri u reakciji mogu da reaguju kao akceptori, finalni proizvod predstavlja mešavinu di-, tri-, tetra- i viših saharida sa β -glikozidnim vezama između monosaharidnih jedinica. U zavisnosti od osobina i porekla upotrebljenog enzima, kao i reakcionih uslova enzimske sinteze, dobijaju se različiti prinosi i tipovi formiranih galakto-oligosaharida. Efikasnost transgalaktozilacije je kinetički kontrolisana, jer su i sami galakto-oligosaharidi podložni procesu hidrolize, pa maksimalni prinosi reakcije nisu naročito visoki i kreću se uglavnom u opsegu 20-40% galakto-oligosaharida,¹⁷⁷ sa retkim izuzecima.¹⁸⁴



Slika 2.27. Karakterističan dijagram toka reakcije transgalaktozilacije

U prvoj fazi reakcije primetan je pad koncentracije laktoze, koja se troši na sintezu galakto-oligosaharida, ali i manjim delom na hidrolizu (Slika 2.27). U ovoj fazi očigledno preovladava reakcija transgalaktozilacije. Međutim, kako reakcija napreduje, odnosno kako je koncentracija laktoze manja, samim tim manje dostupna kao akceptor glukozil-jedinica, tako sinteza galakto-oligosaharida usporava, dok sa druge strane dolazi do konstantnog prirasta produkata hidrolize. Ukoliko reakcija traje dovoljno dugo, u jednom trenutku će doći do potpune hidrolize laktoze i galakto-oligosaharida do glukoze i galaktoze. Sa ovog aspekta, od izuzetnog je značaja vreme prekidanja reakcije u cilju dobijanja maksimalnog prinosa proizvoda. Međutim, pored izraženog uticaja na prinos, primećeno je da vreme utiče i na sastav smeše dobijenih galakto-oligosaharida (Slika 2.27b). Naime,

vreme potrebno za sintezu dužih galakto-oligosaharida, može biti znatno duže od vremena potrebnog za sintezu kraćih galakto-oligosaharida, prvenstveno imajući u vidu da je za njihovu sintezu neophodno prisustvo kraćih galakto-oligosaharida. Pored toga, važno je istaći da se reakcije sinteze i hidrolize različitih β -glikozidnih veza odvijaju različitim brzinama, pa tako vreme trajanja reakcije utiče i na strukturu molekula prisutnih u smeši galakto-oligosaharida. Stoga, prilikom odabira optimalnog vremena trajanja reakcije treba naći kompromis između prinosa i željenog sastava smeše galakto-oligosaharida.

Iako su do sada u literaturi opisani brojni primeri dobijanja galakto-oligosaharida, veliki broj faktora koji istovremeno utiču na prinos i strukturu galakto-oligosaharida onemogućava definisanje opštih optimalnih uslova za sintezu galakto-oligosaharida.^{177, 185, 186} Potencijalne strategije za dobijanje visokih prinosa smeše galakto-oligosaharida željenih svojstava obuhvataju odabir adekvatnog mikroorganizma, koji ima visoku transgalaktozilacionu aktivnost, izvođenje reakcije na višim temperaturama, potom korišćenje koncentrovanih rastvora laktoze ili pak rad u sistemima sa sniženom aktivnošću vode.

2.3.1.1. Uticaj reakcionih faktora na sintezu galakto-oligosaharida

2.3.1.1.1. Izbor enzima

Kao što je prethodno rečeno, primarna funkcija β -galaktozidaza jeste katalizovanje reakcije hidrolize laktoze, a afinitet enzima prema reakciji transgalaktozilacije, u značajnoj meri zavisi od prirode korišćenog enzima. Smatra se da ključnu ulogu u tome igra struktura enzima, što je donekle potvrđeno u eksperimentima sa genetički manipulisanim enzimima.^{67, 68} Pored afiniteta enzima prema samoj reakciji transgalaktozilacije, na prinos i sastav galakto-oligosaharida utiču i afinitet enzima prema stvaranju i hidrolizi određenih tipova veza, afinitet prema sintezi galakto-oligosaharida sa većim stepenom polimerizacije, afinitet prema razgradnji galakto-oligosaharida, kao i inhibicija glukozom i galaktozom. Do sada, sinteza galakto-oligosaharida je isprobana sa velikim brojem enzima.^{14, 177} Kao najbolji producenti među kvascima i plesnima pokazala se β -galaktozidaza iz *A. oryzae*,⁶⁰

dok je među bakterijskim β -galaktozidazama najčešće korišćeni producent β -galaktozidaza iz *B. circulans*. U komercijalnoj proizvodnji galakto-oligosaharida zastupljeni su još i β -galaktozidaze iz *Cryptococcus laurentii*, *S. thermophilus* i *B. bifidum*.^{14, 177} Do sada, najbolji prinos galakto-oligosaharida u smeši (63%) postignut je korišćenjem β -galaktozidaze iz *Bifidobacterium infantis*,³⁴ dok je najviša postignuta koncentracija (315 g/l) dobijena konverzijom koncentrovanog rastvora laktoze (600 g/l) pomoću termostabilne β -galaktozidaze iz *Sulfolobus solfataricus*.¹⁸⁴ Utvrđeno je da galakto-oligosaharidi sintetisani pomoću β -galaktozidaza bakterija mlečne kiseline poseduju izraženu fiziološku aktivnost, pa se sve više radi na njihovoj eksploataciji u reakcijama njihovog dobijanja. Takođe je primećeno da su β -galaktozidaze subfamilije GH-42 bakterija mlečne kiseline inhibirane visokim koncentracijama laktoze, i shodno tome imaju znatno niže prinose od β -galaktozidaza subfamilije GH-2 iz istih organizama.¹⁸⁷

Tabela 2. 3. Uticaj porekla enzima na strukturu galakto-oligosaharida^{14, 74, 177}

Mikroorganizam	Vrsta veza	Stepen polimerizacije
<i>Bacillus circulans</i>	β -(1→4), ređe β -(1→2), β -(1→3) i β -(1→6)	di-, tri-, tetrasaharidi
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	β -(1→3)	-
<i>Bifidobacterium infantis</i>	β -(1→3)	di-, tri-, tetrasaharidi
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	β -(1→3) i β -(1→6)	di-, tri-, tetrasaharidi
<i>Lactobacillus reuteri</i>	β -(1→3) i β -(1→6)	di-, tri-, tetrasaharidi
<i>Lactobacillus sp.</i>	β -(1→3) i β -(1→6)	di-, tri- i tetrasaharidi
<i>Streptococcus thermophilus</i>	β -(1→3) i β -(1→6)	Disaharidi
<i>Kluyveromyces lactis</i>	β -(1→4)	uglavnom tri-, tetrasaharidi
<i>Cryptococcus laurentii</i>	β -(1→4)	uglavnom trisaharidi
<i>Aspergillus oryzae</i>	β -(1→6), β -(1→4)	uglavnom tri-, tetrasaharidi

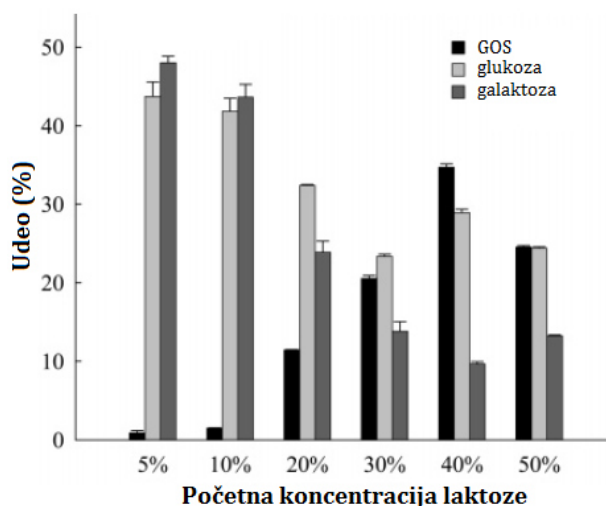
Pored uticaja na prinos enzima, izvor enzima takođe ima značajan uticaj i na strukturu dobijenih galakto-oligosaharida. Naime, pojedine β -galaktozidaze imaju veći afinitet prema stvaranju, odnosno hidrolizi određenih glikozidnih veza, pa tako nastaju smeše galakto-oligosaharida u kome su prisutne različite β -glikozidne veze. Takođe, od porekla enzima zavisi i stepen polimerizacije galakto-oligosaharida. Ova svojstva, međutim, nisu nepromenljiva, jer deluju u sprezi sa

drugim reakcionim faktorima, a podložna su promeni u slučaju imobilizacije enzima, o čemu će biti više reči u narednim poglavljima.

2.3.1.1.2. Uticaj koncentracije laktoze

Iz samog mehanizma reakcije transgalaktozilacije (Slika 2.26) može se uočiti da početna koncentracija laktoze predstavlja ključni faktor u procesu optimizacije sinteze galakto-oligosaharida. Njen uticaj može se tumačiti dvojako. Sa jedne strane, povećanjem koncentracije laktoze raste i koncentracija dostupnog supstrata za reakciju transgalaktozilacije, čime se povećava verovatnoća da će molekuli galaktoze biti preneti na molekule laktoze umesto na molekule vode. Sa druge strane, visoke koncentracije laktoze smanjuju aktivnost vode, čime se istovremeno smanjuje brzina reakcije hidrolize laktoze, ali i hidrolize galakto-oligosaharida. Takođe, postoje indicije da se povećanje koncentracije povoljno odražava i na stabilnost samog enzima.¹⁸⁸ Bez obzira na poreklo korišćenog enzima, literaturni podaci o uticaju laktoze su konzistentni. Naime, smatra se da se pri koncentracijama laktoze iznad 30%, favorizuje reakcija transgalaktozilacije.^{76,}

177



Slika 2.28. Uticaj početne koncentracije laktoze na prinos galakto-oligosaharida¹⁸⁹

U radu Albejraka (Albayrak) i Janga (Yang), na primer, sa povećanjem koncentracije laktoze sa 50 g/l na 500 g/l, maksimalan prinos galakto-oligosaharida u smeši povećava sa 10,5% na 27%.¹⁹⁰ Slični rezultati dobijeni su i u

radu Hsua i saradnika (rezultati prikazani na slici 2.28) pri sintezi galakto-oligosaharida pomoću β -galaktozidaze iz *Bif. longum*. Kao što se sa slike 2.28 može videti, pri nižim koncentracijama laktoze dominira reakcija hidrolize, dok se pri radu sa koncentrovanim rastvorima ravnoteža pomera u smeru transgalaktozilacije. Najbolji prinos 32,5% postignut je pri koncentraciji od 40%, nakon čega prinos galakto-oligosaharida opada verovatno zbog taloženja laktoze usled previsoke koncentracije.¹⁸⁹ Poznato je, naime, da osnovnu prepreku korišćenju koncentrovanih rastvora laktoze, predstavlja njena izuzetno slaba rastvorljivost (oko 250 g/l na 40°C).⁷⁶ Međutim, korišćenjem zasićenih metastabilnih rastvora laktoze,^{76, 191} koji su prethodno predgrejani kako bi došlo do rastvaranja šećera, moguće je ostvariti početne koncentracije čak i iznad 60%. Kako bi se problem slabe rastvorljivosti prevazišao sve više se radi na izolovanju novih enzimskih preparata β -galaktozidaza koje će biti aktivne na visokim temperaturama, što će omogućiti rad sa koncentrovanijim rastvorima laktoze. Do sada su za sintezu galakto-oligosaharida ispitane β -galaktozidaze iz *Thermys* sp. (prinos 30% u ukupnoj smeši šećera)¹⁹², *Pyrococcus furiosus* (22%)¹⁹³, *Sulfolobus solfataricus* (53%)¹⁹⁰, *Thermotoga maritima* (18,2%)¹⁹⁴.

2.3.1.1.3. Uticaj temperature i pH na reakciju transgalaktozilacije

Uticaj temperature na sintezu galakto-oligosaharida, nije naročito izražen, a literaturni podaci pokazuju različite trendove. Iako sa povećanjem temperature dolazi do povećane rastvorljivosti laktoze, ovo nema nekog naročitog značaja kod rada sa mezofilnim enzimima. Nekoliko studija pokazalo je da se povećanjem temperature može favorizovati reakcija transgalaktozilacije, jer je uticaj temperature na brzinu reakcije sinteze izraženiji nego na brzinu reakcije hidrolize, međutim uticaj na prinos galakto-oligosaharida je zanemarljiv.^{119, 195} Iwasaki (Iwasaki) i saradnici su došli do zaključka da je uticaj temperature izuzetno važan faktor kada poredimo transgalaktozilacione aktivnosti enzima različitog porekla, ali da je za pojedinačne enzime oblast temperatura za postizanje maksimalnih prinosa prilično široka i naješće se poklapa sa optimalnom temperaturom za reakciju hidrolize.¹⁹⁶

Slična situacija je i sa pH vrednošću reakcione smeše. Uticaj pH na reakciju transgalaktozilacije može biti značajan i zavisi pre svega od prirode enzima. Postoje indicije da se sa promenom pH može uticati na povećanje selektivnosti enzima prema reakciji transgalaktozilacije. ^{14, 189}

Tabela 2.4. Proizvodnja galakto-oligosaharida pomoću mikrobnih β -galaktozidaza

Mikroorganizam	t (°C)	pH	Laktoza (g/l)	GOS ^a ,% (Conc, g/l)	Produktivnost (g/lh)	Ref.
Bakterije						
<i>Bacillus circulans</i>	40	6,0	46	24	2.2	197
<i>Enterobacter agglomerans</i>	50	7,5	125	38[47]	3.9	198
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	37	6,5	180	23[41]	6.9	199
<i>Lactobacillus reuteri</i>	30	6,5	205	38	3.9	112
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	30	6,5	205	39	7.9	79
<i>Lactobacillus pentosus</i>	30	6,5	205	31	-	24
<i>Lactobacillus sakei</i>	30	6,5	215	44	-	22
<i>Lactobacillus plantarum</i>	37	6,5	205	41	-	23
<i>Lactobacillus fermentum</i>	45	6,5	400	31	-	26
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	39	6,8	500	20[99]	65	200
<i>Bifidobacterium longum</i>	45	6,8	400	33	13	189
<i>Bifidobacterium infantis</i>	60	7,5	300	63[190]	13	34
<i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Bifidobacterium adolescentis</i> <i>Bifidobacterium angulatum</i> <i>Bifidobacterium pseudolongum</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i>	55	7,5	300	47,6 43,1 43,8 26,8 37,6	-	201
<i>Pyrococcus furiosus</i>	80	5,0	270	22[60]	-	202
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	80	6,0	600	53[315]	5.6	203
<i>Thermotoga maritima</i>	80	6,0	500	19[97]	18	204
<i>Thermus sp.</i>	70	7,0	300	30[91]	-	205
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	60	6,5	600	44[264]	-	206
Kvasci						
<i>Kluyveromyces lactis</i>	40	7.0	400	25[99]	25	207
<i>Rhodotorula minuta</i>	60	6.0	200	38[76]	3.2	208
<i>Sterigmatomyces elviae</i>	60	5.0	200	39[78]	3.2	209
<i>Sirobasidium magnum</i>	50	-	360	67[242]	5.8	210
<i>Cryptococcus laurentii</i>	40	4.3	200	40[80]	3.6	211
<i>Sporobolomyces singularis</i>	55	5.0	600	40[242]	8.7	212
Plesni						
<i>Aspergillus oryzae</i>	40	4.5	380	32	24	196
<i>Penicillium sp.</i>	55	4.0	400	40[160]	-	213
<i>Penicillium simplicissimum</i>	50	6.5	600	31[183]	11	214
<i>Talaromyces thermophilus</i>	40	6.5	200	50[100]	13	215
<i>Bullera singularis</i>	45	3.7	300	54[120]	4.8	216

Međutim, u literaturi je sve zastupljeniji podatak da su pH optimumi za reakcije sinteze i hidrolize približno jednaki.^{77, 196}

2.3.1.1.4. Alternativni načini povećanja prinosa galakto-oligosaharida

Optimizacijom uslova donekle se može povećati prinos galakto-oligosaharida, ali pri korišćenju divljih sojeva mikroorganizama ovi prinosi i dalje ostaju relativno skromni. U cilju prevazilaženja ovog problema i povećanja afiniteta enzima prema reakciji transgalaktozilacije, pojedini naučnici primenili su metodu genetičkog inženjerstva. Tako su Jorgensen i saradnici skraćanjem N-terminalnog kraja β -galaktozidaze iz *Bif. bifidum* uspeali da povećaju afinitet prema reakciji transgalaktozilacije 10 puta i ujedno značajno smanje inhibitorno delovanje galaktoze.⁶⁸ Slični rezultati mogu se postići i ciljanim mutacijama, odnosno zamenom aminokiselina u lancu proteina. Recimo, zamena Arg109 u Trp ili Val u molekulu β -galaktozidaze iz *G. stearotermophilus*, dovela je do povećanja prinosa β -Gal(1→3)-Lac deset puta.¹⁹⁹ Takođe, na osnovu poznavanja ponašanja drugih glikozidaza, može se pretpostaviti da će genetičkim inženjerstvom ubuduće biti moguće uticati i na strukturu, a ne samo na prinos proizvoda.⁷⁴

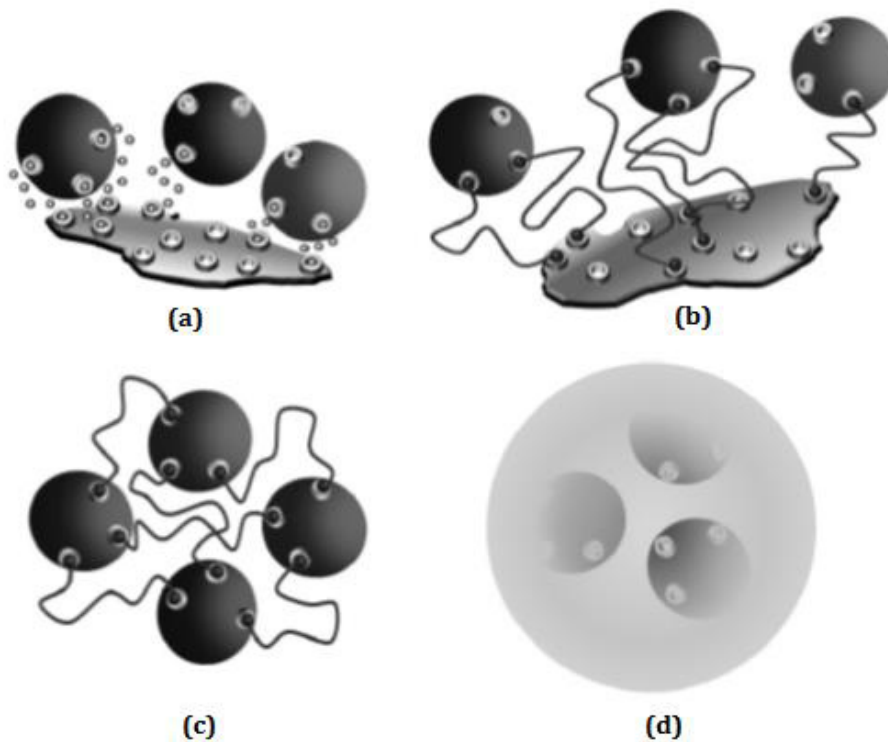
Budući da je raspoloživost laktoze i smanjenje aktivnosti vode ključni parametri u optimizaciji procesa sinteze galakto-oligosaharida, korišćenje veoma koncentrovanih rastvora predstavlja siguran put do postizanja visokih prinosa. Da bi ovo bilo moguće potrebno je reakcije izvoditi na jako visokim temperaturama, što iziskuje pronalaženje novih termostabilnih β -galaktozidaza koje će biti aktivne u takvim uslovima. Smanjenje aktivnosti vode, međutim, može se postići i primenom drugih metoda: zamenom vode (ili dela vodene faze) organskim rastvaračima,²¹⁷⁻²¹⁹ radom u jonskim tečnostima²²⁰ ili dodatkom različitih soli.²²¹ Radom u dvofaznim vodenim sistemima, na primer, korišćenjem dodatka PEG-a, De-Val i Otero sa komercijalnim preparatom Pectinex Ultra-SP, dobili su povećanje prinosa β -Gal(1→6)-Lac za 33% u odnosu na istu reakciju izvedenu u vodenoj sredini.²²² Šin (Shin) i saradnici ispitali su mogućnost sinteze galakto-oligosaharida u dvofaznim sistemima cikloheksan/voda. Maksimalan prinos proizvoda (45%) dobijen je u sistemu sa 5% vode, dok je pod identičnim uslovima u vodenoj sredini

dobijen prinos od 38%.²¹⁷ Uprkos obećavajućim rezultatima, ograničenja u primeni organskih rastvarača predstavljaju slaba rastvorljivost laktoze i nestabilnost enzima u prisustvu rastvarača.⁷⁴

Proizvodi reakcije često mogu predstavljati inhibitore sinteze galakto-oligosaharida, pa se smatra da se njihovim uklanjanjem može sprečiti inhibicija, a ujedno postići značajno poboljšanje procesa jer će se dobiti čistiji krajnji proizvodi.. Postoje različite strategije koje se tiču uklanjanja monosaharida iz smeše. U radu Čenga (Cheng) i saradnika sinteza galakto-oligosaharida pomoću β -galaktozidaze iz *B. circulans* praćena je kontinualnim uklanjanjem nastale glukoze pomoću enzima glukoza oksidaze i katalaze. Prinos disaharida u ovoj reakciji bio je značajno smanjen, ali je zato koncentracija tetrasaharida bila znatno veća u odnosu na kontrolnu reakciju. Sa druge strane, prinos trisaharida ostao je nepromenjen.²²³ Čest primer uklanjanja glukoze podrazumeva i selektivnu fermentaciju pomoću kvasaca. Najčešće se u ovu svrhu koriste kvasci iz roda *Kluyveromyces*, pri čemu dolazi do značajnog prečišćavanja proizvoda.^{223, 224} Danas, sve češće se umesto skupih komercijalnih i prečišćenih enzimskih preparata koriste permeabilizovane ćelije. Njihovom upotrebom znatno se smanjuju troškovi izolovanja i prečišćavanja enzima, ali i omogućava višekratno korišćenje što dodatno dovodi do pojeftinjenja procesa. Ove ćelije mogu zadržati svoju vijabilnost, i kao takve mogu istovremeno vršiti proces tragalaktozilacije, kao i proces fermentacije glukoze, što dovodi do povećanja prinosa reakcije. Takođe, enzim β -galaktozidaza je smeštena unutar ćelije tako da je zaštićena od uslova spoljašnje sredine, pa i u određenoj meri od inhibicije proizvodima reakcije.^{14, 225} Inhibicija proizvodima reakcije može se smanjiti primenom imobilizacije enzima, kao i adekvatnim izborom reaktorskih sistema, o čemu će biti reči u narednim poglavljima.^{14, 177}

2.4. Imobilizacija β -galaktozidaze

Uprkos razvijenoj industrijskoj upotrebi enzima β -galaktozidaze, značajnu prepreku u široj industrijskoj implementaciji predstavlja visoka cena, kao i promenljiva stabilnost enzima pri definisanim uslovima procesa. Stoga, u cilju potpunog iskorišćenja potencijala ovog biokatalizatora, primenjuju se različite metode stabilizacije enzima, a najčešće njegova imobilizacija, odnosno ograničavanje slobodnog kretanja enzima u određenom prostoru uz zadržavanje njegove katalitičke sposobnosti.⁵⁵ Pored sprečavanja naglog gubitka aktivnosti enzima, odnosno povećanja temperaturne ili pH stabilnosti, pravilnim odabirom metode imobilizacije može doći do smanjenja podložnosti inhibiciji supstratom ili proizvodima reakcije, kao i povećanja selektivnosti biokatalizatora, što može biti od izuzetnog značaja u slučaju reakcije sinteze galakto-oligosaharida. Sa aspekta industrijske primene treba istaći mogućnost upotrebe imobilisanih enzima u kontinualnim sistemima, jer omogućavaju lakše praćenje, kontrolu i automatizaciju procesa.



Slika 2.29. Metode imobilizacije¹⁸³: fizička adsorpcija (a), kovalentno vezivanje (b), umrežavanje (c) i obuhvatanje enzima nosačem (d)

Po završetku reakcionog ciklusa enzim se može jednostavno i efikasno ukloniti iz reakcione smeše, pri čemu se eliminiše potencijalna kontaminacija proizvoda i dodatni troškovi prečišćavanja proizvoda. Imobilisani enzim se potom može ponovo koristiti, čime se značajno umanjuju troškovi procesa. Uprkos nabrojanim prednostima, imobilizacija enzima nije uvek tehnološki i ekonomski opravdana, jer enzim gubi aktivnost tokom imobilizacije, a često dolazi i do pojave difuzionih limitacija pri upotrebi imobilisanih enzima. Međutim, ovi problemi mogu se prevazići poznavanjem svojstava enzima i adekvatnim izborom metode imobilizacije.

Prvi primer imobilizacije β -galaktozidaze datira iz 1969. godine, kada su Šarp i saradnici izvršili imobilizaciju enzima na porozne DEAE celulozne ploče.²²⁶ U literaturi je, od tada, opisan veliki broj metoda imobilizacije: adsorpcija, kovalentna imobilizacija, umrežavanje enzima i obuhvatanje enzima nosačem. (Slika 2.29) Iako su podaci o primeni imobilisanih preparata u realnim industrijskim uslovima retki (SnamProgetti (Italija) i Sumitomo Chemicals (Japan), Valio (Finska) i drugi) i uglavnom vezani za hidrolizu laktoze iz mleka i surutke^{8, 227}.

2.4.1. Imobilizacija adsorpcijom

Najstariji, i ujedno najčešće korišćen metod imobilizacije je adsorpcija, pri kojoj se enzim zadržava na površini nerastvornih nosača formiranjem slabih privlačnih sila (Van der Valsovih sila, vodoničnih veza, hidrofobnih interakcija i elektrostatičkog privlačenja). Prednosti ove metode jesu niski troškovi, jednostavnost i brzina izvođenja. Blagi reakcioni uslovi uzrokuju neznatno narušavanje konformacije samog enzima, pa su aktivnost i specifičnost adsorbovanog enzima uglavnom nepromenjene. Nosači korišćeni za ovu metodu su jeftini i dostupni, a zahvaljujući reverzibilnosti metode po završetku rada mogu se regenerisati i iznova koristiti. U literaturi su opisani brojni primeri primene različitih nosača za imobilizaciju β -galaktozidaza, koji mogu biti neorganske (oksidi aluminijuma²²⁸ i cinka^{229, 230}, silika^{228, 231}, celit^{228, 232}, zeolit²³³) i organske prirode (celuloza, hitozan²³⁴, aktivni ugljenik²³⁵ i jonoizmenjivačke smole²³⁶⁻²³⁸). Na jačinu i stepen vezivanja biokatalizatora utiču kako priroda nosača, tako i temperatura, pH rastvora i jonska

jačina. Karakteristike nosača kao što su veličina čestica, specifična površina, veličina i raspored pora, hidrofilnost/hidrofobnost mogu da imaju veliki uticaj na količinu i raspodelu biokatalizatora na površini nosača, a samim tim i na aktivnost, specifičnost i stabilnost imobilisanog sistema. Husain i saradnici došli su do zaključka da je veličina čestica, odnosno njihova specifična površina od izuzetne važnosti za efikasnost procesa imobilizacije.²²⁹ Naime, oni su izvršili imobilizaciju na čestice cink-oksida i nano-čestice cink-oksida, pri čemu su prinosi aktivnosti 60% i 85%, redom. Takođe, enzim imobilisan na nano-čestice pokazao je znatno veću stabilnost na pH 7, u prisustvu galaktoze, kao i veću operativnu stabilnost²³¹. Do sličnog zaključka došla je Klajn (Klein) sa saradnicima, pri imobilizaciji na čestice hitozana milimetarskih dimenzija i nano-čestice hitozana. Veća specifična površina nano-čestica omogućila je znatno veću koncentraciju vezanih proteina, kao i veću aktivnost imobilisanih enzima, dok je izraženija poroznost makro-čestica omogućila veću termičku stabilnost imobilisanog preparata.²³⁴

Ova metoda, međutim, ima i niz nedostataka, pre svega formiranje slabih veza između enzima i nosača, što može dovesti do desorpcije enzima, kao i osetljivost na spoljašnje faktore kao što su temperatura i jonska jačina. U velikom broju slučajeva hemijski ili fizički predtretman nosača može doprineti jačem i specifičnijem vezivanju biokatalizatora za nosač, a često se izvodi i naknadni tretman imobilisanog enzima hemijskim reagensom radi post-imobilizacionog umrežavanja.^{239,218} U svom radu Gudini sa saradnicima izvršila je optimizaciju procesa adsorpcije β -galaktozidaze iz *A. oryzae* na jonoizmenjivački smolu Duolite A568 primenom metode statistički planiranog eksperimenta, a potom dobijeni imobilisani enzim dodatno stabilisala umrežavanjem glutaraldehydom. Zadržana aktivnost nakon 30 ciklusa neumreženog imobilisanog enzima iznosila je 51%, dok je zadržana aktivnost dodatno umreženog preparata iznosila 90% početne vrednosti.²³⁹ Slično, β -Galaktozidaza iz *A. oryzae* imobilisana adsorpcijom i umrežavanjem na konkanavalin A-celulozu zadržala je 78% početne vrednosti aktivnosti i pokazala značajnu stabilnost u odnosu na slobodan enzim pri skladištenju. Aktivnost nakon jednog meseca iznosila je 93% početne vrednosti za imobilisanu, a 63% početne vrednosti za slobodnu β -galaktozidazu.²⁴⁰ Liu i saradnici razvili su novi nosač, magnetne nanočestice obložene polietilenom, sa

izraženom sposobnošću adsorpcije (3,2 puta veća od komercijalnog nosača DEAE-Sepharose). Imobilisana β -galaktozidaza iz *K. lactis* pokazala je izuzetno visoku katalitičku aktivnost i operativnu stabilnost u reakciji sinteze galakto-oligosaharida. Nakon 15 ciklusa, zadržana aktivnost na enzimu iznosila je 84,6%, a tokom tih 15 ciklusa sintetisano je 4,5 kg galakto-oligosaharida/g nosača. Nosač se može regenerisati i ponovo koristiti, a nakon dvadeset desorpcija, njegov kapacitet se smanjio za samo 7%.²⁴¹

Nosači za imobilizaciju ne moraju biti isključivo čestice. Imobilizacija se može izvršiti i na površinu membrana. Tako je u radu Engela β -galaktozidaza iz *K. lactis* imobilisana na jonoizmenjivačku membranu u cilju uspostavljanja kontinualnog procesa sinteze galakto-oligosaharida. Što se hidrodinamičkih parametara tiče, ovaj proces je bio zadovoljavajući, međutim nije doveo do promena u prinosu galakto-oligosaharida u odnosu na slobodan enzim.²⁴²

2.4.2. Obuhvatanje enzima nosačem

Obuhvatanje enzima nosačem predstavlja fizičko ograničavanje kretanja enzima unutar određenog zatvorenog prostora. Pod ovim pojmom podrazumevaju se procesi smeštanja enzima u matrice polimera, u/iza polupropustljive membrane, uključujući i mikroinkapsulaciju.^{3,55} Osnovne prednosti ovog načina imobilizacije jesu jednostavnost dobijanja čestica, kao i njihova mehanička stabilnost, a mana mogućnost postepenog gubitka imobilisanog enzima curenjem kroz pore u toku kontinualne upotrebe. Međutim, ovo se može prevazići korišćenjem posebnih tehnika umrežavanja enzima bifunkcionalnim ili multifunkcionalnim agensima. Matrice koje se koriste za imobilizaciju najčešće predstavljaju polimerne materijale, kao što su alginat, agar, κ -karaginan, pektin, želatin, poliakrilamid i kolagen i drugi. Jovanović-Malinovska sa saradnicima imobilisala je β -galaktozidazu iz *A. oryzae* u PVA čestice za sintezu galakto-oligosaharida. Imobilisani enzim zadržao je čak 95% početne aktivnosti nakon 7 ciklusa u reaktoru sa pakovanim slojem. Maksimalan postignut prinos iznosio je 30% (w/w) pri početnoj koncentraciji laktoze od 40%, što je odgovaralo produktivnosti od 117g/h.²⁴³ U svom radu Sen i saradnici uporedili su mikroinkapsulirane čestice β -

galaktozidaze iz *B. circulans* u protočnom reaktoru sa slobodnim enzimom, pri čemu su dobili znatno povećanje u prnosu galakto-oligosaharida.²⁴⁴ Ovaj način imobilizacije veoma je zastupljen i u imobilisanju celih ćelija.²⁴⁵ Nasuprot inkapsulaciji enzima i ćelija, zadržavanje β -galaktozidaze ultrafiltracionim membranama predstavlja metodu imobilizacije koja omogućava efikasniju sintezu galakto-oligosaharida zahvaljujući izostajanju difuzionih limitacija i promene enzima usled vezivanja za čestice. Brojni su primeri primene ovakvih membrana u reaktorima za sintezu galakto-oligosaharida,^{207, 246} o čemu će biti reči u narednom poglavlju.

2.4.3. Kovalentna imobilizacija

Kovalentna imobilizacija podrazumeva zadržavanje enzima na površini nosača formiranjem kovalentnih veza između funkcionalnih grupa enzima i čvrstih nosača. Enzim se za nosač vezuje preko svojih amino (α - i ϵ -lizin), karboksilnih grupa, sulfhidrilnih grupa ostataka cisteina, imidazolnih grupa, hidroksilnih grupa i fenolnog jezgra tirozina.⁵⁵ Ovim postupkom imobilizacije, usled stvaranja stabilnih hemijskih veza sa nosačem, ostvaruje se velika stabilnost u širokom opsegu spoljnih uslova i ne dolazi do spiranja enzima. Sa druge strane nedostaci ove metode su visoka cena i gubitak aktivnosti uzrokovan izlaganjem enzima najčešće agresivnim hemijskim supstancama, kao i nepovoljnim uslovima reakcije.^{3, 55} Različiti materijali mogu biti korišćeni kao nosači za kovalentnu imobilizaciju, a pre same imobilizacije neophodno je aktivirati funkcionalne grupe nosača odgovarajućim hemijskim agensima (cijanogen bromid, karbodiimid i glutaraldehid). Pod aktiviranjem nosača se podrazumeva hemijska reakcija između nosača i aktivatora pri čemu se na površini nosača stvaraju nove grupe (obično elektrofilne) koje imaju veliku reaktivnost prema funkcionalnim grupama u molekulu enzima (obično nukleofilne). Kovalentna imobilizacija se zato najčešće sastoji iz dve faze: aktiviranje i modifikacija nosača i vezivanje enzima za aktiviran nosač.^{55 247} Do sada je opisan veliki broj metoda za kovalentnu imobilizaciju β -galaktozidaze, međutim kao i u prethodnim slučajevima, dobijeni imobilizati uglavnom su korišćeni u reakcijama hidrolize laktoze. Međutim, postoji i nekoliko

primera imobilizacija koji se vrše sa ciljem upotrebe u reakcijama transgalaktozilacije.²⁴⁸ Najinteresantniji su svakako rezultati postignuti u studijama Albajraka i Janga koji su izvršili kovalentno vezivanje β -galaktozidaze iz *A. oryzae* na pamučnu tkaninu funkcionalizovanu *p*-toluensulfonil hloridom koju su potom upotrebili u protočnom reaktoru. Poluživot ovako dobijenog enzima iznosio je 48 dana na temperaturi od 50 °C, što je čak 25 više od slobodnog enzima.¹⁹⁰ U svom narednom radu isti autori izvršili su agregaciju enzima pomoću polietilenamina i dodatnim umrežavanjem pomoću glutaraldehida u cilju postizanja bolje specifične aktivnosti enzima.²⁴⁹ Imajući u vidu prednosti višetačkastog kovalentnog vezivanja enzima Huerta i saradnici izvršili su imobilizaciju β -galaktozidaze na gluoksil agarozu. Dobijeni preparat primenjen je u deset konsektivnih reakcija sinteze galakto-oligosaharida, pri čemu je dobijen biokatalizator znatno poboljšanih karakteristika (veće stabilnosti i otpornosti na imobilizaciju), ali i značajna količina proizvoda po jedinici mase biokatalizatora (8,5 kg/g nosača).¹⁹¹ Sa druge strane, kako bi dodatno unapredili proces separacije biokatalizatora Pan i saradnici razvili su proces kovalentne imobilizacije na magnetne Fe₃O₄ nanočestice. Ovako dobijeni imobilisani preparati pokazali su izuzetnu pH i termalnu, ali i operativnu stabilnost budući da su zadržali više od 90% aktivnosti nakon 15 ciklusa produkcije galakto-oligosaharida. U reakciji sinteze galakto-oligosaharida postignut je prinos od 15%.²⁵⁰ Slično, enzim iz *K. lactis* imobilisan je na magnetne kompozite u radu Nerija i saradnika pri čemu je u reakciji sinteze galakto-oligosaharida potvrđeno odsustvo difuzionih limitacija iz znatno povećanu stabilnost imobilisanog preparata.^{251,252} Do sada, samo je u dva rada prijavljena imobilizacija β -galaktozidaza dobijenih iz bakterija roda *Lactobacillus*. Naime, β -galaktozidazu iz *L. plantarum* nedavno su Benavente i saradnici višetačkasto imobilisali na gluoksil agarozu i primenili u sinteze galakto-oligosaharida, pri čemu je prinos iznosio oko 35%.²⁵³ U drugom radu, isti enzim imobilisan je na nanočestice ZnO, ali je imobilisani enzim korišćen u reakciji hidrolize laktoze.²⁵⁴

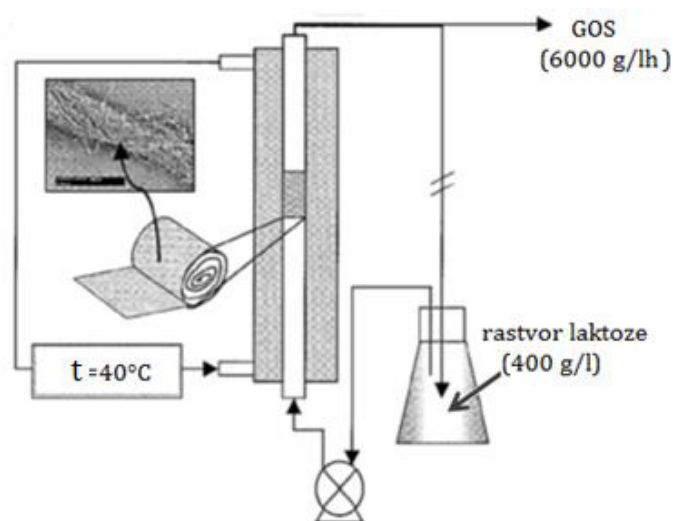
2.4.4. Imobilizacija umrežavanjem enzima

Imobilizacija enzima umrežavanjem zasniva se na formiranju intermolekulskih veza između molekula enzima i bifunkcionalnog agensa (glutaraldehyd, dimetilsuberimidat, bis-diazobenzidin i drugi). Poslednjih decenija, sve više se radi na razvoju enzima umreženih bez bifunkcionalnog agensa, formiranjem intramolekulskih veza unutar samog enzima (formiranjem Šifovih baza između dialdehida glutarne kiseline i slobodnih amino grupa molekula). Na taj način nastaju umreženi enzimi (cross-linked enzymes – CLE) ili pak umreženi enzimski kristali (cross-linked enzyme crystals - CLEC). Ovako imobilisani enzimi imaju veliku aktivnost po jedinici zapremine, ali nisu primenljivi za industrijsku upotrebu zbog slabih mehaničkih osobina. Osnovna prednost umrežavanja enzima je to što u tom slučaju nije potrebno korišćenje nosača za imobilizaciju, mogu se primenjivati neprečišćeni enzimski preparati, a koprecipitacijom sa polimerima može se podešavati mikrookruženje enzima. Tek nedavno je utvrđeno je da se aktivne imobilisane β -galaktozidaze mogu dobiti i umrežavanjem agregata (crosslinked enzyme aggregates-CLEA.⁵⁵ U radu Lija i saradnika pokazano je da CLEAs poseduju izuzetnu termičku i operativnu stabilnost u radu sa dvofaznim sistemima. Naime, nakon deset ciklusa vrednost zadržane aktivnosti iznosila je 52%, dok je sa druge strane postignuto povećanje prinosa u odnosu na slobodan enzim.²⁵⁵ Sa druge strane, u radu Gaura i saradnika, pokazano je da CLEAs β -galaktozidaze iz *A. oryzae* u vodenoj imaju veći afinitet prema reakciji hidrolize laktoze (78% hidrolize za 12 h) u odnosu na reakciju transgalaktozilacije.²³²

2.5. Reaktori za sintezu galakto-oligosaharida

Enzimaska sinteza galakto-oligosaharida do sada je isprobana u različitim reaktorskim konfiguracijama i pri različitim režimima rada. Industrijska proizvodnja galakto-oligosaharida u većini slučajeva odvija se korišćenjem slobodne β -galaktozidaze u šaržnim bioreaktorima sa mešanjem.²⁵⁶ Međutim, u literaturi opisano je više različitih konstrukcija reaktora koji uključuju upotrebu slobodnih, imobilisanih enzima ili pak korišćenje permeabilizovanih ćelija. Kao najčešće korišćeni tip reaktora sa imobilisanim enzimima javljaju se šaržni bioreaktori sa mešanjem.^{191, 232, 251, 252} Prinosi u ovom tipu reaktora su uporedivi sa prinosima u šaržnim reaktorima sa slobodnim enzimom. Takođe, ovaj tip izvođenja reakcije favorizuje nastajanje viših galakto-oligosaharida, ali nakon određenog vremena dolazi do naglog pada u prinosu proizvoda usled preovladavanja reakcije hidrolize.²⁵⁷ Bilo je pokušaja izvođenja sinteze galakto-oligosaharida korišćenjem šaržnih bioreaktora sa recirkulacijom,²⁵⁸ kao i dolivnih postupaka²⁵⁹. Takođe, Mogard (Maugard) i saradnici pokušali su da iskoriste prednosti mikrotalasnog zračenja nad konvencionalnim načinom izvođenja eksperimenata, u cilju poboljšanja procesa sinteze galakto-oligosaharida pomoću β -galaktozidaze iz *K. lactis* imobilisane na jonoizmenjivačku smolu Duolite A-568. Izvođenjem reakcije u uslovima smanjene aktivnosti vode, dodatkom organskog rastvarača (heksana), postignuto je značajno povećanje (217 puta) u selektivnosti imobilisanog preparata prema reakciji transgalaktozilacije.²³⁸ Međutim, u cilju razvoja kontinualnog izvođenja procesa, i prevazilaženja problema vezanih za inhibiciju proizvodima reakcije, najčešće su ispitivani bioreaktori sa pakovanim slojem.^{249, 260} Prednosti ovih reaktora u odnosu na šaržne ogledaju se u postojanju visoke koncentracije enzimske aktivnosti, što rezultira visokom produktivnošću sistema. Međutim, imajući u vidu sklonost laktoze ka kristalizaciji, u ovim reaktorima potrebno je koristiti niže početne koncentracije laktoze (5-20%) u poređenju sa šaržnim sistemima, što može dovesti do smanjenja prinosa. Netipični predstavnik ove grupe reaktora, sa postignutom najvećom produktivnošću (6000 g/lh) u poređenju sa do sada korišćenim reaktorima (i do 50 puta), jeste reaktor sa β -galaktozidazom imobilisanom na pamučnu tkaninu modifikovanu

polietileniminom, i potom dodatno umreženu glutaraldehydom. Parčići tkanine uvijeni su u obilku valjaka i jedan na drugi poređani unutar reaktora. Visoka poroznost, nizak pad pritiska, i visoka mehanička snaga tkanine omogućili su stabilnu konverziju napojne smeše (rastvor laktoze koncentracije 400 g/l u 0,1M puferu pH 4,5) pri protoku 37 ml/min u toku tri dana. Prinos galakto-oligosaharida iznosio je 25-26% u odnosu na ukupne šećere u smeši (70% trisaharida i 25% tetrasaharida), pri konverziji laktoze od 50%. Takođe dobar rezultat postignut je u protočnom reaktoru sa pakovanim slojem opisanim u radu Šina (Shin) i saradnika, koji su koristeći β -galaktozidazu iz *Bullera singularis* imobilisanu prostom adsorpcijom na hitozanske čestice postigli je prinos galakto-oligosaharida od 55% (od čega je 84% trisaharida) i uspeli da održe kontinualnu proizvodnju u toku 15 dana.²⁶¹

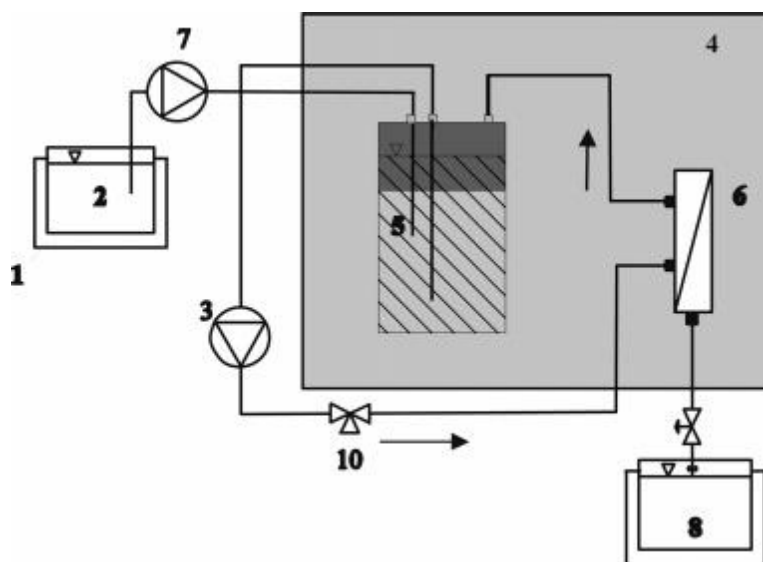


Slika 2.30. Šematski prikaz bioreaktora sa β -galaktozidazom imobilisanom na pamučnu tkaninu²⁴⁹

Kao što se iz opisanih primera može videti, kao glavni proizvodi reakcije nastaju trisaharidi, što je generalno odlika svih protočnih reaktora. Pored primene imobilisanih enzima, postoje primeri korišćenja i imobilisanih celih permeabilizovanih ćelija u bioreaktoru sa pakovanim slojem.²⁶²

Takođe značajna, i često korišćena grupa reaktora za sintezu galakto-oligosaharida jesu membranski reaktori. Osnovna prednost ove grupe reaktora je mogućnost istovremenog odigravanja procesa i separacije produkata. Membrane koje se

koriste mogu biti od različitih materijala i različitih oblika i različitog stepena poroznosti. Najčešće se koriste polimerne membrane jer se one mogu dobijati u najrazličitijim oblicima i mogu se lako modifikovati tako da poseduju tačno određene karakteristike koje su bitne za određenu namenu.²⁶³ Enzimi mogu biti zadržani membranama,^{207, 264} ili pak imobilisani na površini membrana.^{258, 263} U zavisnosti od veličine pora membrane, enzim se zadržava u okviru sistema dok se supstance male molekulske mase (supstrati i proizvod reakcije) odvoje iz sistema. U slučaju sinteze galakto-oligosaharida najčešće se u tu svrhu koriste ultrafiltracione membrane.¹⁴ Foda i saradnici utvrdili su da je primenom ove tehnologije moguće proizvesti galakto-oligosaharide iz permeata surutke.²⁶⁵ Generalno, osnovni nedostaci ovog tipa reaktora jesu posojanje visokih tangencijalnih napona i korišćenje visokih pritisaka koji se mogu negativno odraziti na aktivnost enzima.¹⁴ Međutim, studija Matele (Matella) i saradnika pokazala je da su efekti pritiska na aktivnost enzima zanemarljivi u odnosu na slobodan enzim u šaržnom sistemu, ali i da je mešanje ključni parametar ovog procesa jer omogućava bolju rastvorljivost šećera i bolji kontakt sa enzimom, čime se poboljšavaju njegove performanse.



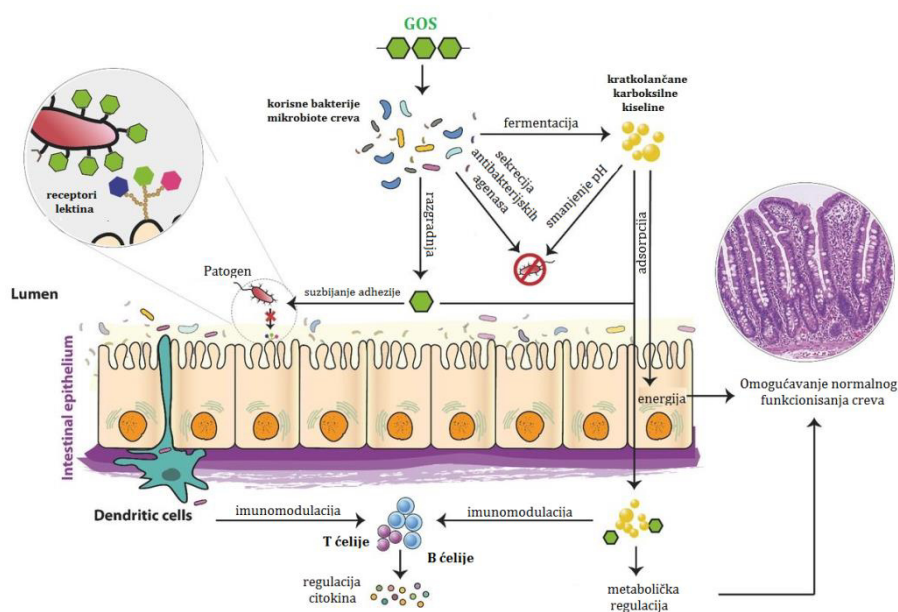
Slika 2.31. Šaržni reaktor kuplovan sa membranom za tangencijalnu filtraciju: (1) ledeno kupatilo, (2) kontejner za supstrat, (3) peristaltička pumpa, (4) vodeno kupatilo, (5) bioreaktor, (6) membrana za tangencijalnu filtraciju, (7) pumpa, (8) odvod sistema, (10) ventil za uzorkovanje ²⁶⁶

Maksimalan prinos (20-22%) u njihovoj studiji postignut je nakon 15-17 minuta, što je odgovaralo maksimalnom prinosu u šaržnom reaktoru.²⁶⁷ Sa druge strane, u eksperimentu sa komercijalnom β -galaktozidazom iz *K. lactis*, paralelno izvedenom u šaržnom bioreaktoru i ultrafiltracionom reaktoru pokazano je da se produktivnosti u ova dva sistema značajno razlikuju. Naime, pri početnoj koncentraciji laktoze od 31%, maksimalan prinos u šaržnom reaktoru postignut je nakon 1 h i iznosio je 7,6 mg galakto-oligosaharida/IU, dok je u kontinualnom procesu postignuto 16-26 mg galakto-oligosaharida/IU.²⁰⁷ Zanimljivo je da konfiguracija reaktora ne utiče samo na prinos, već i na sastav sintetisane smeše galakto-oligosaharida. Poređenjem kontinualnog reaktora sa mešanjem sa spoljnom membranom za tangencijalnu filtraciju (Slika 2.31) i klasičnog šaržnog reaktora sa mešanjem primećeno je da nakon konverzije preko 65% laktoze prinos galakto-oligosaharida bio niži u kontinualnom sistemu, zahvaljujući nižem udelu GOS3 i GOS4. Takođe, β -galaktozidaza iz *L. reuteri* pokazala je veću specifičnost prema formiranju β -(1→6) veza imajući u vidu da su osnovni proizvodi reakcije bili β -D-Gal- β -(1→6)-D-Glc i β -D-Gal- β -(1→6)-D-Gal.²⁶⁶ Membrane sa manjim veličine pora se mogu istovremeno koristiti za sintezu i prečišćavanje galakto-oligosaharida od monosaharida (glukoze i galaktoze) nastalih hidrolizom laktoze. Tako, na primer, primenom nanofiltracionih membrana moguće je dobiti proizvod koji sadrži 88% laktoze i galakto-oligosaharida.

2.6. Primena galakto-oligosaharida

2.6.1. Fiziološka aktivnost galakto-oligosaharida

Galakto-oligosaharidi predstavljaju kompleksnu grupu ugljenih hidrata, izgrađenih od glukoze i galaktoze međusobno povezanih β -glikozidnim vezama, koji zahvaljujući strukturi i izraženoj stabilnosti u kiseloj sredini uglavnom ne podležu razgradnji u gornjem delu gastrointestinalnog trakta čoveka, već stižu nepromenjeni do debelog creva gde ostvaruju svoju prebiotičku funkciju. Uticaj galakto-oligosaharida na zdravlje čoveka ostvaruje se putem dva osnovna mehanizma. Prvenstveno, oni omogućavaju selektivnu proliferaciju korisnih bakterija mikrobiote (naročito bifidobakterija i laktobacila),^{177, 268} koji dalje štite organizam od kolonizacije patogena i poboljšavaju imuni sistem domaćina, čime sprečavaju pojavu različitih zapaljenskih infekcija.²⁶⁹



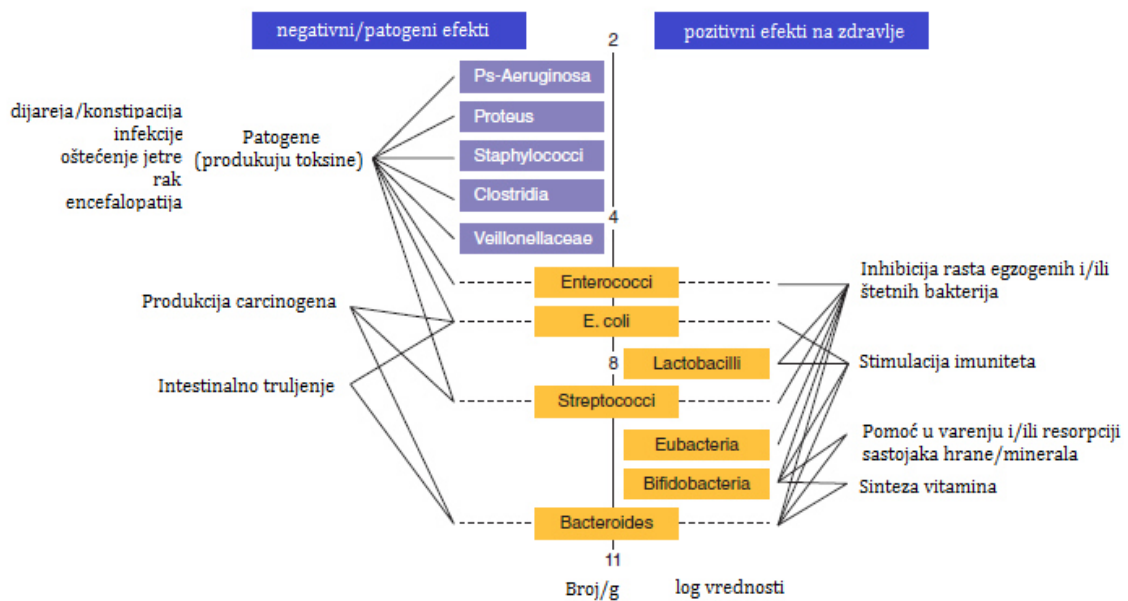
Slika 2.32. Mehanizmi delovanja galakto-oligosaharida²⁷⁰

Sa druge strane, fermentacijom galakto-oligosaharida dolazi do sinteze kratkolančanih karboksilnih kiselina u crevnom traktu domaćina, čije se prisustvo povezuje sa brojnim pozitivnim efektima po zdravlje čoveka, uključujući smanjenje rizika od pojave raka, povećanje resorpcije minerala, poboljšanje rada

creva, kontrolu nivoa masti i holesterola u serumu, i suzbijanja infekcija i zapaljenskih bolesti creva.^{268, 271}

2.6.1.1. Zdravstveni benefiti konzumiranja galakto-oligosaharida

Gastrointestinalni trakt čoveka nastanjuje kompleksna zajednica bakterija, eukariotskih mikroorganizama, arhea, virusa i bakteriofaga, među kojima najbrojniju grupu predstavljaju bakterije. Kolonizacija gastrointestinalnog trakta odigrava se odmah nakon rođenja i neznatno se menja tokom ostatka života. Prosečan broj organizama koji čine mikrobiotu zdravog odraslog čoveka procenjuje se na 10^{14} , a identifikovano je 300-500 različitih vrsta bakterija.^{177, 256}



Slika 2.33. Sastav i efekti dominantnih bakterija mikrobiote gastro-intestinalnog trakta čoveka²⁵⁶

Ove bakterije možemo podeliti na one koje imaju pozitivan efekat na zdravlje čoveka (bifidobakterije i laktobacili) i one koje mogu imati štetan uticaj ukoliko se njihov broj poveća (npr. *Clostridia*), zato je za zdravlje čoveka od izuzetne važnosti održavanje ravnoteže među ovim mikroorganizmima.²⁶⁹ *Bifidobacterium* i neke *Lactobacillus* vrste igraju važnu ulogu u fiziologiji mikrobiote digestivnog trakta ljudi. One povećavaju otpornost na infekcije i bolesti koje prouzrokuju dijareju,

stimulišu imuni sistem i štite od kancera (Slika 2.33).²⁶⁹ Tokom života sastav intestinalne mikroflore je najvećim delom nepromenljiv, ali može se menjati pod uticajem starenja, ishrane i opšteg zdravstvenog stanja. Primećeno je da je intestinalna mikrobiota beba koje se hrane majčinim mlekom mnogo bogatija bifidobakterijama od onih koje se hrane mlečnim formulama, što je posledica bifinogenog efekta oligosaharida humanog mleka uključujući i galakto-oligosaharide. Zahvaljujući ovim saznanjima, sprovedena su brojna *in vitro* i *in vivo* istraživanja, o uticaju unosa galakto-oligosaharida na proliferaciju mikrobiote creva, kako beba, tako i odraslih. U studiji Harmana (Haarman) i Knola dokazano je da hranjenjem beba smešom koja sadrži 90% galakto-oligosaharida i 10% frukto-oligosaharida dugog lanca, dolazi do povećanja koncentracije bifidobakterija i laktobacila, pri čemu ukupan sastav mikrobiote jako sličan onome kod beba hranjenih majčinim mlekom, čak i bogatiji laktobacilima.²⁷² Do sličnih zaključaka došli su Moro i saradnici, koji su takođe primetili pozitivan uticaj na konzistenciju i pH vrednost stolice beba.²⁷³ Posmatranjem uticaja galakto-oligosaharida na sastav mikrobiote zdravog odraslog čoveka naučnici su zaključili da je dnevni unos od 10 g galakto-oligosaharida dovoljan da se uoči značajan bifidogeni efekat, dok je kod starijih, i ljudi srednjih godina, kod kojih je populacija ovih bakterija manje brojna dovoljno uneti 2,5 g dnevno da bi se ta brojnost povećala.¹⁸⁶ U jednom kliničkom ispitivanju, pacijentima sa sindromom iritabilnog creva davane su različite doze galakto-oligosaharida u trajanju od 12 nedelja. Broj bifidobakterija se znatno uvećao, a nadimanje u crevima je oslabilo.²⁷⁴ Kako se aktivnost galakto-oligosaharida zasniva na selektivnom korišćenju od strane bakterija creva, novija ispitivanja su pokazala da na funkcionalnu aktivnost, a pogotovu na bifidogeni efekat, značajno utiče struktura galakto-oligosaharida, pre svega stepen polimerizacije i vrste veza između monosaharidnih jedinica. Tako je u radu Depejnta (Depeinta) i saradnika utvrđeno da unošenje 3,6 g/dan smeše galakto-oligosaharida koja se sastoji pretežno od β -(1→3) i, u manjem obimu, β -(1→4) i β -(1→6) veza dovodi do značajnijeg prebiotičkog (bifinogenog) efekta u odnosu na unošenje većih koncentracija (4,9 g/d) smeše galakto-oligosaharida sa β -(1→4) i/ili β -(1→6) vezama.²⁷⁵ Kardel-Kobas (Cardelle-Cobas) i saradnici odredili su da smeše galakto-oligosaharida sa pretežno β -(1→6) vezama imaju neznatno

izraženiji bifidogeni efekat od prečišćenih preparata sa isključivo β -(1→4) vezama.²⁷⁶ Komercijalno dostupni preparati, danas, uglavnom predstavljaju smeše galakto-oligosaharida koji poseduju β -(1→4) i β -(1→6), zbog čega se poslednjih godina intenzivno radi na razvoju procesa sinteze galakto-oligosaharida pomoću bakterija mlečne kiseline u cilju sinteze galakto-oligosaharide željene strukture (sa većim udelom β -(1→3) veza). Međutim u odnosu na druge komercijalne prebiotske preparate (frukto-oligosaharide i laktulozu), pokazano je da korisne bakterije znatno selektivnije metabolišu galakto-oligosaharide.

Održavanje ravnoteže mikrobiote creva, ključni je faktor normalnog funkcionisanja crevne barijere, preko koje je omogućena regulacija transporta materija, ali i mehanizama odbrane od patogena. Brojne studije na životinjama su pokazale da galakto-oligosaharidi poboljšavaju funkciju crevne barijere, i to na više načina. Naime, povećanjem broja korisnih bakterija vrši se supresija neželjenih bakterija i virusa.²⁶⁹ Potom, povećavanjem koncentracije sekretovanih imunoglobulina dolazi do njihove smanjene adhezije na zidove sluzokože creva, a fermentacijom galakto-oligosaharida nastaju masne kiseline kratkog lanca koje dovode do snižavanja pH sredine, što dovodi do inhibicije normalne funkcije patogena. Sa druge strane, galakto-oligosaharidi mogu i direktno da inhibiraju delovanje unutrašnjih patogena zahvaljujući sposobnosti da imitiraju mesta za vezivanje na površini patogena pomoću kojih se oni vezuju na površinu epitelijalnih ćelija. Tako umesto da se veže za površinu creva domaćina i izazove infekciju, patogen će se vezati za galakto-oligosaharid.¹⁸⁶ Važnost ovog mehanizma odbrane, vidi se na primeru izostanka gastrointestinalnih infekcija kod beba u naročito osetljivom periodu dojenja.²⁵⁶ Pokazano je u brojnim studijama da su galakto-oligosaharidi, kao i drugi poznati prebiotici (frukto-oligosaharidi, inulin i laktuloza) inhibitori vezivanja bakterije *E. coli* za ćelije tkiva, pri čemu je utvrđeno da galakto-oligosaharidi imaju najveću moć inhibicije.²⁷⁷ U drugim studijama pokazano je da galakto-oligosaharidi imaju sposobnost inhibiranja kolonizacije i širenja *S. typhimurium*,¹⁸⁶ *L. monocytogenes*,²⁷⁸ ali i adheziju toksina kolere (enterotoksina produkovanom od strane *Vibrio cholera*) za kolonocite čoveka.²⁷⁹

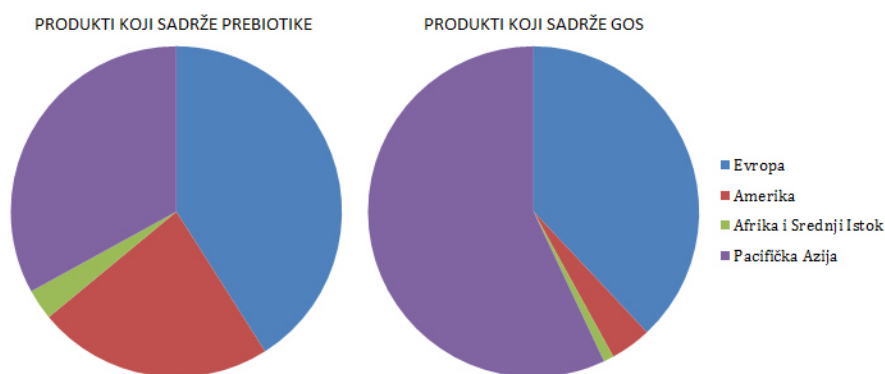
Mikrobiota creva jako je bitna u razvoju i održavanju imunog sistema domaćina. U crevnom sistemu čoveka nalazi se veći deo imunog sistema čoveka nazvan limfoidno tkivo sluzokože creva (60% ukupnog limfnog tkiva). Pošto su neprestano u kontaktu, smatra se da sastav mikrobiote creva utiče na sastav ovog limfoidnog tkiva, odnosno promena sastava mikrobiote odražava se i na nastanak promena u ovom tkivu, a samim tim i promena u imunom sistemu domaćina. Tačan mehanizam ovih promena nije u potpunosti ispitan, ali smatra se da postoje dva puta regulacije: direktan interakcijom sa receptorima imunih ćelija i indirektan delovanjem na korisne bakterije mikrobiote.²⁶⁹ U novijoj studiji Vulević i saradnika, pokazano je da konzumiranje galakto-oligosaharida ne dovodi samo do povećanja broja korisnih i smanjenja broja manje korisnih bakterija, već dovodi do pozitivnih efekata na imunitet domaćina. Ovo se može videti kroz povećanje aktivnosti i fagocitoze ćelija ubica, povećanje sekrecije anti-inflamatornih citokina, interleukina-10 (IL-10) i sniženje koncentracije pro-inflamatornih citokinina (IL-6, IL-1 β i TNF- α).²⁸⁰ Imajući u vidu uticaj galakto-oligosaharida na imunitet, veruje se da oni igraju ključnu ulogu i u prevenciji alergija.

Fermentacijom galakto-oligosaharida u crevnom traktu nastaju kratkolančane karboksilne kiseline, uglavnom sirćetna, propionska i buterna kiselina. Najveći deo ovih kiselina se resorbuje u crevnom traktu omogućavajući domaćinu da iskoristi energiju iz hrane koja nije svarena u gornjim delovima sistema za varenje. One utiču na ćelijski transport i prenos energije u epitelijalnim ćelijama creva, rast i diferencijaciju ćelija. Njihovim oslobađanjem u lumen creva dolazi do snižavanja pH vrednosti sredine, što omogućava povećanje koncentracije joniziranih minerala, posebno kalcijuma i magnezijuma čime se omogućava njihova lakša resorpcija. Ovo je naročito važno kada je reč o kalcijumu koji je ključan za gustinu koštane mase. Pojedinačne funkcije kratkolančanih karboksilnih kiselina su različite. Butirat ima ključnu ulogu u detoksikaciji lumena debelog creva i samim tim ulogu u prevenciji kolorektalnog karcinoma i brojnih drugih inflamacija. Sa druge strane, propionat omogućava kontrolu jetre nad lipidnim i ugljenohidratnim metabolizmom, obezbeđuje energiju mišićima, bubrezima, srcu i mozgu. Osim toga važna je i potencijalna uloga propionata kao izazivača osećaja sitosti, što u

mnogome doprinosi smanjenju gojaznosti. Pojedine studije su pokazale da proizvodi prebiotičke fermentacije mogu da spreče rast i pospeše smrt kancerogenih ćelija u debelom crevu, dok druge ovu funkciju opovrgavaju. Osim na mikrofloru crevnog trakta, prebiotici, pa tako i galakto-oligosaharidi utiču i na poboljšanje stolice, resorpciju minerala i regulisanje telesne mase. Međutim, veće doze galakto-oligosaharida (do 5g/d), ako se konzumiraju sedam dana, povećavaju učestalost defekacije.¹⁸⁶

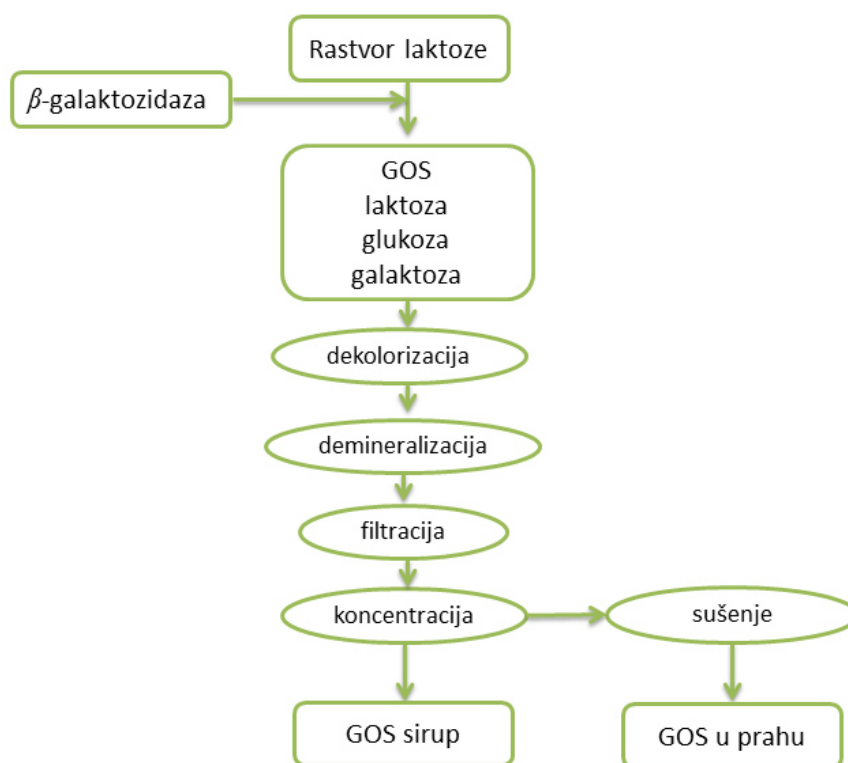
2.6.1.2. Industrijska proizvodnja galakto-oligosaharida

Uprkos činjenici da su galakto-oligosaharidi, nusprodukti dobijeni hemijskom ili enzimskom konverzijom laktoze, bili poznati još pre 60 godina, značajnija industrijska proizvodnja otpočinje tek osamdesetih godina prošlog veka, nakon obnovljenog interesovanja za sintezu ovih jedinjenja sa potencijalnom fiziološkom aktivnošću. Pionirskom na polju komercijalne proizvodnje galakto-oligosaharida smatra se japanska kompanija Yakult Honsha, u čijim se postrojenjima galakto-oligosaharidi sintetišu upotrebom β -galaktozidaza iz *Sporobolomyces singularis* i *Kluyveromyces lactis* (reakcija transgalaktozilacije i hidrolize zaostale laktoze, respektivno) od 1989. godine.²⁵⁶ Do 1995. godine u Japanu razvijen je širok spektar komercijalno dostupnih proizvoda uključujući hranu za bebe, kliničke nutritivne proizvode, kao i brojne proizvode koji se mogu podvesti pod pojam funkcionalne hrane.



Slika 234. Proizvodnja proizvoda koji sadrže prebiotike (a) i galakto-oligosaharide (b) u različitim delovima sveta²⁵⁶

Danas, najznačajnijim proizvođačem galakto-oligosaharida na svetskom tržištu smatra se Holandska kompanija FrieslandCampina Domo, a najveći deo proizvodnje odvija se u Evropi i Japanu (Slika 2.34). Sa druge strane, proizvodnja galakto-oligosaharida na teritoriji Amerike gotovo je zanemarljiva. Većina kompanija bavi se sintezom galakto-oligosaharida u cilju formulisanja sopstvenih proizvoda sa dodatom funkcionalnom vrednošću, dok je komercijalna proizvodnja galakto-oligosaharida za plasman na tržište retka. Ovakva proizvodnja najčešće podrazumeva konverziju koncentrovanih rastvora rafinisane laktoze ili permeata surutke (20-40 g/100 g laktoze) pomoću slobodnog enzima β -galaktozidaze (tabela 2.4) u šaržnim ili kontinualnim reaktorima sa mešanjem, nakon čega se reakcija zaustavlja, a proizvod obezboji pomoću aktivnog uglja i deminerališe u narednom koraku jonoizmenjivačkom hromatografijom (Slika 2.35).



Slika 2.35. Šema dobijanja galakto-oligosaharida ¹⁸⁶

Proizvod se potom filtrira i koncentriše do 67-74 g/100 g suve materije za proizvodnju sirupa, ili do koncentracije 50 g/100 g suve materije za proizvodnju praškastih preparata, koji se dobijaju naknadnim sušenjem raspršivanjem.¹⁸⁶

Dobijeni preparati, bilo da je reč o sirupima ili praškastim preparatima, predstavljaju kompleksne smeše oligosaharida različitog stepena polimerizacije, neproreagovale laktoze i monomernih šećera (glukoze i galaktoze). Koncentracije galakto-oligosaharida u komercijalnim proizvodima variraju između 20 i 90% suve materije (Tabela 2.5). Važno je, međutim, istaći da se ovi proizvodi međusobno ne razlikuju samo u stepenu čistoće, već i u sastavu galakto-oligosaharida, pre svega stepenu polimerizacije, kao i vrsti prisutnih veza. Kao što je već ranije rečeno, ovo je najverovatnije posledica razlike u korišćenim enzimima. Tako je dominantna vrsta veza prisutna u galakto-oligosaharidima proizvoda Oligomate β -(1→6), u galakto-oligosaharidima proizvoda Bimuno β -(1→3), dok Vivinal GOS, Cup Oligo i Purimune uglavnom sadrže galakto-oligosaharide u kojima dominiraju β -(1→4) glukozidne veze.^{177, 186}

Tabela 2.5. Komercijalni proizvodi galakto-oligosaharida

Proizvod	Proizvođač	Mikroorganizam	GOS (%)
Vivinal GOS	FrieslandCampina Domo	<i>Bacillus circulans</i>	44,3-69
Oligomate 55	Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd	<i>Sporobolomyces singularis</i> <i>Kluyveromyces lactis</i>	50-60
Bimuno	Clasado BioSciences	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	48-55
Cup Oligo	Kowa Company Ltd./ Nissin Sugar Co., Ltd.	<i>Cryptococcus laurentii</i>	52-70
Promovita GOS	Corn Products Inc.	<i>Bacillus circulans</i>	
Purimune	GTC Nutrition	<i>Bacillus circulans</i>	90 sm
Floraid GOS	Wright Agri Industries Limited	<i>Aspergillus oryzae</i>	28,5

2.6.1.2.1. Primena galakto-oligosaharida u mlečnim formulama za bebe

Poznato je da se kolonizacija digestivnog trakta beba vrši neposredno po rođenju, a za uspostavljanje zdrave, bifidobakterijama bogate, mikrobiote odgovorni su oligosaharidi humanog mleka.^{268, 281} Oni predstavljaju dominantnu funkcionalnu komponentu humanog mleka,²⁸¹ čija se koncentracija kreće u proseku oko 8-12 g/l (najviša je u kolostrumu i opada tokom perioda laktacije).^{177, 282} Tradicionalne mlečne formule, međutim, u svom sastavu ne sadrže ove oligosaharide, pa je crevna mikrobiota ovako hranjenih beba raznovrsnija, sa većim brojem potencijalno štetnih organizama kao što su klostridije i enterokoke. U cilju

poboljšanja funkcionalnih svojstava mlečnih formula, u njih su inkorporirana jedinjenja koja imaju sposobnost replikacije funkcionalne aktivnosti oligosaharida humanog mleka u crevnom traktu beba. Imajući u vidu da su u izvesnoj meri već prisutni u mleku i da dokazano imaju prebiotske sposobnosti, galakto-oligosaharidi predstavljaju idealne dodatke mlečnim formulama, jer pored dokazanog prebiotskog dejstva, oni omogućavaju uspostavljanje i održanje imunog sistema, i štite od kolonizacije patogena tokom ovog osetljivog perioda.^{269, 283} Mlečne formule obično sadrže 6-8 g/l galakto-oligosaharida, a često se koriste u smeši zajedno sa drugim prebioticima kao što su frukto-oligosaharidi i/ili oligosaharidi pektina.

2.6.1.2.2. Primena galakto-oligosaharida u prehrambenoj industriji

Iako se u najvećoj meri koriste kao dodaci različitim mlečnim formulama, galakto-oligosaharidi, zahvaljujući svojim prebiotskim i dobrim fizičkim svojstvima, našli su primenu u širokom spektru prehrambenih proizvoda: fermentisani mlečni proizvodi, sokovi, peciva, džemovi, slatkiši. Zahvaljujući dokazanoj prebiotskoj sposobnosti galakto-oligosaharida, ovi proizvodi mogu se smatrati funkcionalnom hranom, jer se pod funkcionalnom hranom podrazumeva hrana koja ima povoljan uticaj na ljudsko zdravlje, mimo uobičajenih nutritivnih funkcija. Pored prethodno opisanih fizioloških svojstava galakto-oligosaharida, koja se prevashodno odnose na njihovu prebiotsku aktivnost, širu upotrebu galakto-oligosaharida omogućavaju, a ujedno i određuju i njihova izuzetno povoljna fizičko-hemijska svojstva, kao što su: niska slatkoća, dobra rastvorljivost, stabilnost i druge. Naime, galakto-oligosaharidi su potpuno rastvorljivi u vodi, mleku i drugim mlečnim proizvodima, i što je još važnije ne utiču na viskozitet samih proizvoda. Neutralnog su, slabo slatkog ukusa (30-60% saharoze), pa ne menjaju ukus proizvoda.¹⁸⁶ Izuzetno su stabilni u kiseloj sredini (na 37 °C nekoliko meseci pri pH 2) što nije slučaj sa drugim prebioticima, pa se kao takvi mogu primeniti kao zaslađivači u voćnim sokovima. Stabilni su i do 10 minuta na temperaturi od 160 °C pri pH 7, kao i 10 minuta na temperaturi od 100 °C pri pH2.¹⁸⁶ Idealni su za upotrebu u hlebu i pecivima, jer se prilikom fermentacije i pečenja ne razgrađuju. Oni imaju

funkciju zadržavanja vlage, odnosno sprečavanju isušivanja proizvoda, a dodatno doprinose njegovom ukusu i poboljšanoj teksturi. Budući da su nerazgradivi u gornjem delu digestivnog trakta poseduju jako malu energetska vrednost (1-2 kcal/g), mogu se koristiti i u dijetetskim proizvodima kao zamena za šećere, a imajući u vidu njihovu strukturu nerazgradivi su za bakterije usne duplje, pogodna su zamena veštačkim zaslađivačima jer ne izazivaju karijes.

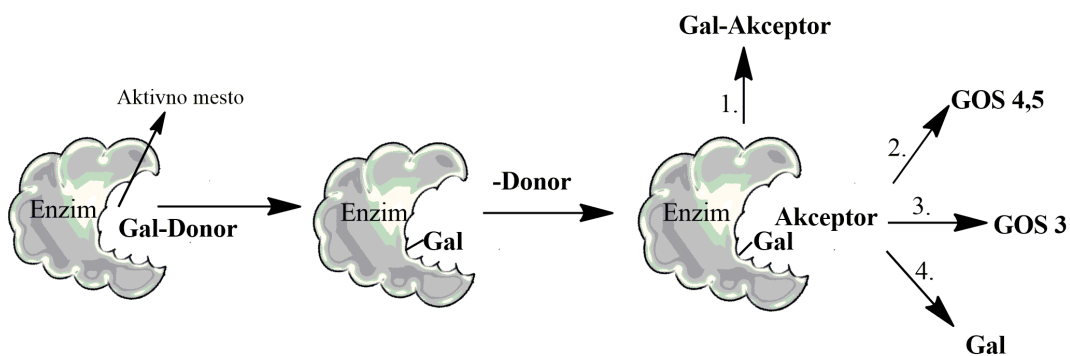
2.6.1.2.3. Ostale primena galakto-oligosaharida

Pored prehrambenih proizvoda, galakto-oligosaharidi se koriste i u farmaceutskim i kozmetičkim proizvodima. Njihovo prebiotsko dejstvo, odnosno stimulacija rasta i aktivnosti korisnih i supresija rasta loših bakterija, može se primentiti i na bakterije kože. Na primer, kod pacijenata kod kojih je došlo do proliferacije bakterije *Propionibacterium acnes*, konvencionalne kozmetičke strategije za rešavanje ovog problema podrazumevale bi korišćenje antibakterijskih agenasa, koji su efikasni u smanjivanju broja *P. acnes*, ali bi ujedno smanjile i broj korisnih bakterija poput *S. epidermidis*. Nasuprot tome, tretiranje prebioticima (npr. galakto-oligosaharidima) dovelo bi do ponovnog uspostavljanja balansa bakterija kože, suzbijajući rast *P. acnes*, ali ne na uštrb korisnih bakterija.²⁸⁴

Upotreba galakto-oligosaharida u industriji stočne hrane i hrane za ljubimce takođe je u porastu. Naime, galakto-oligosaharidi se sve više koriste za ishranu živine,²⁸⁵⁻²⁸⁷ svinja,²⁸⁸ riba^{289, 290} i to u cilju poboljšanja opšteg zdravlja i rasta životinja, poboljšanja balansa crevne mikrobiote, smanjivanje upotrebe antibiotika, sprečavanje rane smrtnosti, kao i smanjenje fekalnih mirisa i produkcije metana kod preživara.²⁶⁸

2.7. Transgalaktozilacija u prisustvu alternativnih akceptora

U prethodnim poglavljima, kad je reč o transgalaktozilacionoj aktivnosti, akcenat je bio na sintezi galakto-oligosaharida iz laktoze, kao najznačajnijoj i najbolje ispitanoj grupi funkcionalno aktivnih galaktozida. Međutim, kao akceptori galaktozil grupe, koja potiče od laktoze ili pak nekog jednostavnog galaktozida (na primer *o*-NPG), mogu se javiti i druga jedinjenja sa slobodnom hidroksilnom grupom. U zavisnosti od prirode akceptora mogu nastati: hetero-oligosaharidi iz drugih šećera^{291, 292} ili šećernih alkohola, glukokonjugati²⁹³ i alkilgalaktozidi.⁷⁴ Efikasnost reakcija transgalaktozilacije, kao što je već rečeno, u mnogome zavisi od prirode enzima, kao i od primenjenih reakcionih uslova. Kao i u slučaju galakto-oligosaharida, struktura sintetisanih jedinjenja i njihova svojstva znatno variraju u zavisnosti od primenjenog enzima. Međutim, iako nisu strogo specifični kao glukozidaze, pravilnom odabirom enzima i pažljivom optimizacijom procesa moguće je dobiti željene izomere različitih jedinjenja.^{294, 295} Takođe, ovde treba istaći da pri primeni alternativnih galaktozil-akceptora dolazi do promene specifičnosti enzima. Budući da su dobijeni proizvodi podložni hidrolizi u toku reakcije, prinosi ovako dobijenih proizvoda nisu naročito visoki.



Slika 2.36. Šema dobijanja različitih galaktozida: (1) alternativni akceptor, (2) galakto-oligosaharid, (3) laktoza, (4) voda

U cilju optimizacije procesa sinteze, primenjeni su različiti prisupi. Generalno, može se zaključiti da je u optimizaciju neophodno uključiti i novi parametar, a to je molarni odnos laktoze i akceptora.⁷⁴ Teoretski, u cilju postizanja boljih prinosa, i favorizovanja reakcije sinteze galaktozida, trebalo bi raditi u sistemima sa visokim koncentracijama laktoze i što višim molarnim odnosima, međutim potencijalni

akceptori često deluju inhibitorno na aktivnost enzima, dovodeći do pada prinosa proizvoda.²²¹ Interesantno je da se često pristupa korišćenju organskih rastvarača i dvofaznih sistema (voda-organski rastvarač)²⁹⁶ ili pak dodavanju različitih supstanci (soli, silika) u cilju smanjenja aktivnosti vode, što nije bio čest slučaj kod sinteze galakto-oligosaharida.^{221, 297} Najpoznatije jedinjenje, koje se dobija transgalaktozilacijom u prisustvu alternativnih akceptora pomoću β -galatozidaza, svakako je laktuloza. Laktuloza je sintetski, nesvarljivi slabo sladak šećer koji se koristi za treatment hronične konstipacije i hepatičke encefalopatije, komplikacija bolesti jetre.⁸¹ U intestinalnom traktu ljudi, slično galakto-oligosaharidima obavlja prebiotsku aktivnost. Međutim, postoji još čitav niz jedinjenja (laktitol, laktosaharoza, galaktozidi laktuloze) pretežno sličnih osobina i polja primene, čija je sinteza pomoću β -galaktozidaze još uvek u povoju.^{81, 298} Naime, u reakciji transgalaktozilacije mogu učestvovati različiti šećeri (fruktoza, saharoza, laktuloza) i šećerni alkoholi (manitol, ksilitol, eritritol i sorbitol), pri čemu se dobijaju raznovrsne smeše jedinjenja, koja imaju poboljšana prebiotska, ali i organoleptička svojstva.^{221, 299} Pored toga, još uvek se intenzivno radi na pronalaženju što boljih supstituenata za humane oligosaharide mleka koji će biti inkorporirani u mlečne formule za bebe. Stoga, postoje brojne studije galaktozilovanja fukoze, N-acetilglukozamina, N-acetilgalaktozamina i manoze.²⁹⁶ Galaktozilovanjem se postiže povećanje rastvorljivosti, fiziološki aktivnih lipofilnih jedinjenja, čime se povećava njihova dostupnost, aktivnost i poboljšavaju hemijske osobine.²⁹³ Sa druge strane, glikokonjugati (glikoproteini i glikolipidi) takođe predstavljaju važne činioce u procesu prepoznavanja u biološkim procesima, kao što su tumori, bakterijske i virusne infekcije i drugo. Stoga ne čudi činjenica da su često aktivne komponente lekova sa ciljanim delovanjem.²⁹⁷ Tako, zahvaljujući strukturnoj sličnosti sa funkcionalno aktivnim jedinjenjima, sve više pažnje posvećuje se i dobijanju galaktozida niske molarne mase koji ispoljavaju interesantne funkcionalne osobine. Na primer, galaktozilglicerol i amini laktuloze ispoljavaju anti-tumornu aktivnost, dok galaktozil-aldoksimi imaju funkciju inhibicije galektina. Ovo saznanje je od izuzetne važnosti jer se preterana ekspresija ljudskog galektina 3 može dovesti u vezu sa brojnim bolestima, kao što su karcinom, bolesti srca i hematološka oboljenja. Na taj način galaktozidi aglikona

mogu naći ulogu u farmaceutskoj industriji kao perspektivan lek za lečenje ovih bolesti.²⁹⁴ Kada su pitanju alkoholi dužeg lanca, alkil galaktozidi mogu imati ulogu i u drugim granama industrije, osim u prehrambenoj i farmaceutskoj. Naime, alkilgalaktozidi predstavljaju prirodne, netoksične, nejonske surfaktante, sa poboljšanim karakteristikama u odnosu na konvencionalne surfaktante. Malo pene, netoksični su, ne izazivaju iritaciju kože i oka, a pored toga su i biodegradabilni i biokompatibilni. Uglavnom se koriste kao komponente u formulacijama za čišćenje i kozmetičkim preparatima, ali zahvaljujući izuzetnim karakteristikama mogu se koristiti i u druge svrhe, kao emulgatori, vlažioci i drugo.^{85, 300}

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Materijali

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitani su sledeći mikroorganizmi za proizvodnju enzima β -galaktozidaze: *Lactobacillus reuteri* ATCC 23271, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* NRRL B 4564, *Lactobacillus casei* ssp. *casei* NRRL B 441, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009, *Lactobacillus helveticus* NRRL B 734, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC 11842, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* NRRL-B-1924, *Streptococcus termophilus* S3, *Propionibacterium shermanii*, *Kluyveromyces lactis* NRRL-YB-3678, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus oryzae* DMS 1862 (Katedra za Biohemijско inženjerstvo i biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerzitet u Beogradu).

Kao komponente za pripremu hranljivih podloga za rast mikroorganizama i produkciju enzima korišćeni su: Pepton-1, Mesni ekstrakt, Ekstrakt kvasca, De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) bujon, Hranljivi bujon, Agar, Glukoza, Galaktoza, Laktoza (Torlak, Srbija), surutka i mleko u prahu (Lenic Laboratories, Srbija). Pored navedenog, potrebni mikronutrijenti su obezbeđeni u vidu dodatka sledećih soli: KH_2PO_4 , CH_3COONa , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, MnSO_4 (Centrohem, Srbija), $\text{HOC}(\text{CO}_2\text{NH}_4)(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{NH}_4)_2$ (Kemika, Hrvatska), NaCl (Lach-ner, Češka) i Tween 80® (DIFCO®, SAD).

Za izolovanje enzima korišćeni su organski rastvarači: toluen, hloroform, aceton, etanol, SDS (Sigma Aldrich, SAD), kvarcni pesak različite granulacije (Kopovi Ub, Srbija) i laktozim iz ljuske jajeta (Sigma Aldrich, SAD). Prečišćavanje enzima vršeno je primenom DEAE sefaroze i Sefadex 250G (Sigma Aldrich, SAD).

Određivanje aktivnosti enzima vršeno je hidrolizom *o*-nitrofenol- β -D-galaktopiranozida, *o*-NPG (TCI Europe, Belgija), a koncentracija proteina korišćenjem Comassie Brilliant Blue G-250 i albumina iz goveđeg seruma, BSA (Sigma Aldrich, SAD).

Kao nosači za imobilizaciju β -galaktozidaza korišćeni su:

- Purolite® A109 (Purolite, SAD)
- Lifetech nosači, i to: ECR8305F, ECR8309F, ECR8404F, ECR8409F, ECR8285F, ECR1508, ECR1604, ECR8806 (Purolite, SAD)
- Eupergit® C i Eupergit® C250L (Röhm GmbH & Co., Degussa, Nemačka)
- Aerosil® 380 (Evonik Industries, Nemačka)

Hemikalije korišćene u reakcijama transgalaktozilacije: laktoza (Sigma Aldrich, SAD), salicin (TCI Europe, Belgija) i sorbitol (Sigma Aldrich, SAD). A za analizu uzoraka HPLC metodom korišćeni su rastvarači HPLC čistoće (voda, metanol) (JT Baker, SAD).

Od uređaja u ovom radu korišćeni su:

- analitička vaga (Mettler AJ100, Švajcarska)
- tehnička vaga (Chyo Balance Corp., MP-3000, Japan)
- autoklav (Sutjeska, Srbija)
- termostat za rast mikroorganizama (Memmert, Nemačka)
- centrifuga (MiniSpin Eppendorf, SAD i Sigma® 2-16, Eppendorf, Engleska)
- vorteks (REAX 7000, Heidolph, Nemačka)
- ultrazvučno kupatilo, tip USK 28, radna frekvencija 40 kHz (EI Niš, Srbija)
- UV-spektrofotometar (Ultrospec™ 3300 pro, Amersham Biosciences, UK)
- magnetna mešalica (IKA, Nemačka)
- roler mikser (IKA, Nemačka)
- HPLC (Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific, Thermo Scientific, SAD)
- RI detektor (RefractoMax 520, ERC, Nemačka)
- orbitalna tresilica (KS 4000i control, IKA, Nemačka)
- pH metar (inoLab pH 720, WTW, Nemačka)

3.2. Metode

3.2.1. Preliminarna selekcija mikrobnih producenata β -galaktozidaza

Selekcija proizvodnog mikroorganizma izvršena je zasejavanjem različitih kultura u sintetskim podlogama i pri uslovima koji su određeni na osnovu pregleda literature. (Tabela 3.1)

Tabela 3.1. Uslovi gajenja mikroorganizama i produkcije enzima

Mikroorganizam	Uslovi gajenja
Bakterije	
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 23271, <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469, <i>Lactobacillus helveticus</i> ATCC 15009, <i>Lactobacillus helveticus</i> NRRL B 734, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> NRRL-B-1924,	MRSL bujon (pH 6,5), 37 °C, mikroaerofilno, bez mešanja
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> NRRL B 4564, <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i> NRRL B 441, <i>Streptococcus termophilus</i> S3, <i>Propionibacterium shermanii</i>	MRSL bujon (pH 6,5), 30 °C, mikroaerofilno, bez mešanja
Kvasac	
<i>Kluyveromyces lactis</i> NRRL-YB-3678	YPL bujon, 30 °C, aerobno, sa mešanjem 150 rpm
Plesni	
<i>Aspergillus oryzae</i> DMS 1862	PLA bujon, 30 °C, aerobno, sa mešanjem 150 rpm

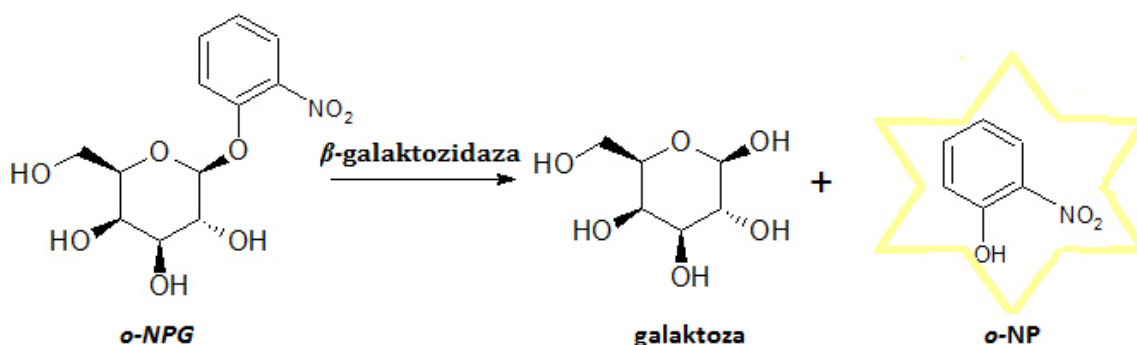
Tabela 3.2. Sastav korišćenih podloga

MRSL bujon		YPL bujon		PLA bujon	
Pepton	10 g/l	Pepton	20 g/l	Infuzija krompira	4g/l
Mesni ekstrakt	10 g/l	Kvašćev ekstrakt	10 g/l	Laktoza	20 g/l
Kvašćev ekstrakt	5 g/l	Laktoza	20 g/l		
Laktoza	20 g/l				
Tween 80	1 g/l				
Natrijum acetat	5 g/l				
Amonijum citrat	2 g/l				
Magnezijum sulfat	0,1 g/l				
Mangan sulfat	0,05 g/l				
di-Kalijum hidrogenfosfat	2 g/l				

Sve podloge (Tabela 3.2.) su sterilisane na 121 °C, u trajanju od 30 minuta. Za zasejavanje je korišćena 24 satna mikrobna kultura (2%) u odgovarajućem bujonu (Tabela 3.1.). Fermentacija je izvođena u erlenmajerima sa zapreminom bujona od 200 ml u termostatu ili na orbitalnom šejkeru pri brzini od 150 rpm, na odgovarajućoj temperaturi u trajanju od 2 dana. Nakon fermentacije, celokupna zapremina erlenmajera je centrifugirana (12000 rpm). U slučaju bakterija i kvasca odvojene ćelije su resuspendovane u 0,1 M natrijum-fosfatnom puferu (pH 7) i podvrgnute razaranju u cilju ekstrakcije intracelularne aktivnosti. Nakon razaranja, ostaci ćelija su uklonjeni centrifugiranjem, a u supernatantu je potom određena aktivnost (poglavlje 3.2.2). U slučaju plesni, dobijeni supernatant testiran je na prisustvo ekstracelularne β -galaktozidaze (poglavlje 3.2.2).

3.2.2. Određivanje aktivnosti β -galaktozidaze

Metoda za određivanje hidrolitičke aktivnosti β -galaktozidaze se zasniva na hidrolizi *o*-nitrofenil- β -galaktozida (*o*-NPG) do *o*-nitrofenola i β -galaktoze. *o*-Nitrofenol je jedinjenje sa apsorpcionim maksimumom na 410 nm, stoga se koristi se za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima.



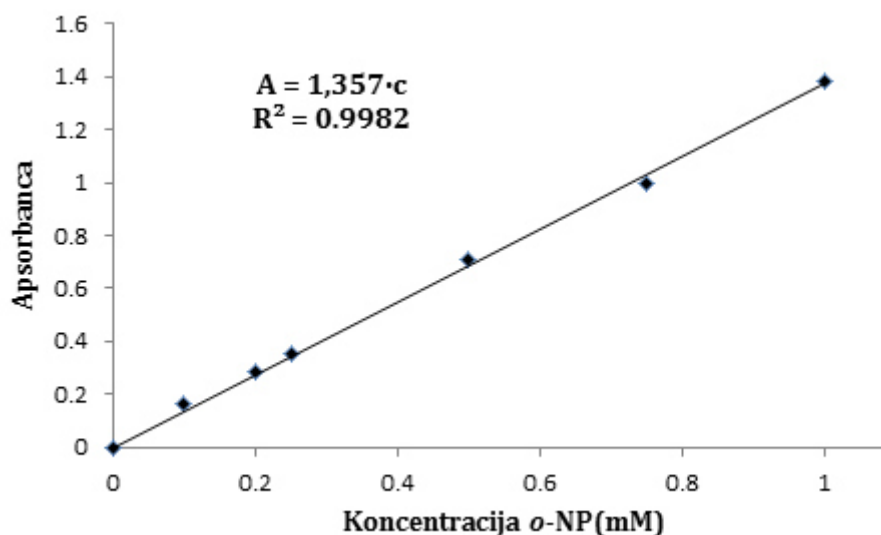
Slika 3.1. Reakcija hidrolize *o*-NPG

Aktivnost β -galaktozidaze određivana je hidrolizom 10 mM *o*-NPG u 0,1 M odgovarajućem puferu. Tok reakcije je praćen u toku 2 minuta merenjem koncentracije oslobođenog *o*-NP spektrofotometrijski na 410 nm. Aktivnost enzima se računa iz nagiba konstruisane prave ($\Delta A/\Delta t$), a jedna internacionalna jedinica (IU) se definiše kao količina enzima koja katalizuje oslobađanje 1 μ mol *o*-NP u minutu pod definisanim uslovima.

$$Akt \text{ (IU/ml)} = \frac{\Delta A / \Delta t \cdot V_{rs}}{\varepsilon \cdot V_e} \cdot R \quad (3.1.)$$

gde je $\Delta A / \Delta t$ nagib konstruisane prave (min^{-1}), V_{rs} zapremina reakcione smeše (ml), V_e zapremina enzima (ml), ε molarni ekstincioni koeficijent (mM^{-1}).

Molarni ekstincioni koeficijent za *o*-NP (ε) je određen iz nagiba standardne prave za *o*-NP u opsegu koncentracija (0-1 mM).



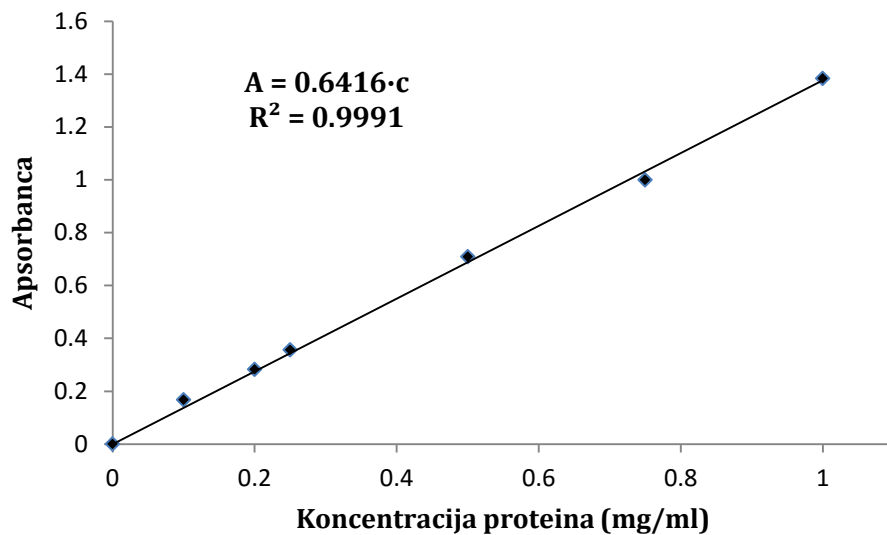
Slika 3.2. Standardna prava za određivanje molarog ekstincionog koeficijenta

3.2.3. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u uzorcima određena je primenom metode po Bredfordu (Bradford).³⁰¹ Smeša se sastojala iz 2 ml Bredfordovog reagensa i 40 μl ispitivanog uzorka, a merenja su vršena nakon 5 min spektrofotometrijski na 595 nm. Sam reagens pripreman je ne sledeći način: 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 se rastvori u 50 ml 95% etanola, doda se 100 ml 85% fosforne kiseline i razblaži do 1 l destilovanom vodom. Nakon toga se rastvor filtrira i čuva u tamnoj boci, ne duže od jednog meseca. Standardna prava konstruisana je za svaku novu količinu pripremljenog Bredfordovog reagensa primenom albumina iz goveđeg seruma (BSA) u opsegu koncentracija 0,1-1 mg/ml.

Koncentracija proteina u uzorcima se računa prema jednačini:

$$c_{\text{proteina}} \text{ (mg/ml)} = \frac{A(595 \text{ nm})}{0,6416} \quad (3.2.)$$



Slika 3.3. Standardna prava za određivanje koncentracije proteina po Bredfordu

3.2.4. Optimizacija uslova fermentacije

Eksperimenti optimizacije različitih uslova fermentacije (dužine trajanja, načina gajenja, brzine mešanja, sastava podloge) izvode se na isti način, submerznim gajenjem u erlenmajerima sa 200 ml modifikovanog bujona (MRSL osim u eksperimentima gde se varira vrsta i koncentracija šećera). Fermentacija započinje dodavanjem 2% inokuluma 24 satne mikrobne kulture *L. acidophilus* i izvodi se u termostatu ili vazdušnoj tresilici sa mešanjem (u zavisnosti od faktora koji se ispituje) na 37 °C. Vrednosti variranih parametara naglašene su za svaki pojedinačni eksperiment. Nakon definisanog vremena trajanja fermentacije, biomasa je odvojena centrifugiranjem (10 min na 12000 rpm), dva puta isprana 0,1 M natrijum fosfatnim puferom (pH 7) i resuspendovana u istom puferu (0,2 g suve mase ćelija/10 ml pufera). Suspenzija ćelija je dalje podvrgnuta procesu razaranja ćelija vorteksiranjem sa staklenim kuglicama (33% w/v) u trajanju od 10 min. Nakon razaranja, suspenzija je centrifugirana 10 min na 12000 rpm, a dobijeni supernatant dalje je podvrgnut ispitivanju aktivnosti β -galaktozidaze i koncentracije proteina.

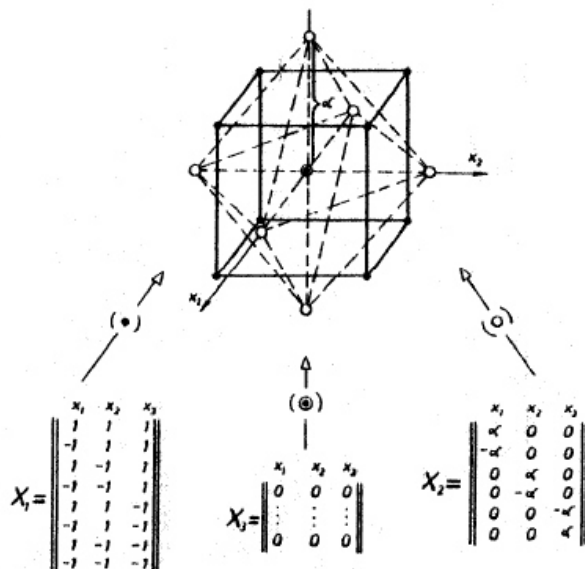
3.2.5. Određivanje broja ćelija

U cilju praćenja kinetike rasta *L. acidophilus* u toku 4 dana, na svakih 24 h određivan je broj ćelija indirektnom metodom brojanja kolonija na čvrstoj podlozi. U zavisnosti od pretpostavljene koncentracije bakterija u fermentacionom medijumu odabiraju se tri razblaženja iz kojih se prenosi po 1 ml u Petri šolje. Razblaženja su pravljena tako što se 1 ml fermentacionog medijuma pomeša sa 9 ml sterilnog 0,85% rastvora NaCl (fiziološki rastvor), što predstavlja razblaženje 10 puta. Uzastopnim prenošenjem 1 ml dobijenog razblaženja u novih 9 ml sterilnog 0,85% rastvora NaCl nekoliko puta dobija se serija razblaženja pri čemu je svako sledeće deset puta veće. Uzorci se u Petri kutijama prelivaju hranljivom podlogom MRS agar. Po očvršćavanju prvog sloja MRS agara, Petri kutije se prelivaju jos jednim slojem MRS agara, kako bi se obezbedili mikroaerofilni uslovi za rast *L. acidophilus*. Nakon obeležavanja, Petri šolje se inkubiraju u termostatu na 37 °C u trajanju od 48 h. Broj izraslih kolonija je određivan Kohovom metodom. Ukupan broj živih ćelija u 1 ml fermentacione podloge dobija se množenjem ukupnog broja kolonija izraslih na Petri šolji sa odgovarajućim razblaženjem. U slučaju da postoje prisutne ćelije na više Petri kutija uzima se srednja vrednost broja ćelija.

3.2.6. Centralni kompozitni rotabilni plan i metoda odzivnih površina

Za ispitivanje uticaja i optimizaciju procesnih parametara tokom izrade ove doktorske disertacije upotrebljeno je statističko planiranje eksperimenata, a za analiziranje rezultata metoda odzivnih površina. Uticaj tri (u slučaju oprimizacije proizvodnje enzima β -galaktozidaze), četiri (u slučaju sinteze salicin galaktozida), i konačno pet (u slučaju sinteze galaktzida sorbitola) eksperimentalnih faktora ispitan je pomoću centralnog kompozitnog rotabilnog eksperimentalnog plana na pet nivoa vrednosti ispitivanih faktora. Rotabilni planovi su veoma česti u eksperimentalnom istraživanju, modelovanju i adaptivnom upravljanju višefaktornim procesima. Osnovna karakteristika ovih planova je da je disperzija modela dobijenog pomoću ovog plana konstantna u svim tačkama hipersfere radijusa, i da ne zavisi, dakle, od pravca u višefaktornom eksperimentalnom

prostoru, već samo od radijusa faktornog prostora. To znači da sve tačke koje su jednako udaljene od centralne tačke eksperimentalnog plana imaju istu količinu informacija koje sadrži model dobijen na osnovu ovog plana. Formiranje ortogonalnih planova je ilustrovano na slici 40. na primeru formiranja trofaktornih planova.



Slika 3.4. Centralni kompozitni rotabilni eksperimentalni plan u trofaktornom prostoru ³⁰²

Dobijeni rezultati su modelovani jednačinom drugog reda koja uključuje članove koji opisuju interakciju između različitih faktora:

$$Y = \beta_{k0} + \sum_{i=1}^n \beta_{ki} X_i + \sum_{i=1}^n \beta_{kii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \beta_{kij} X_i X_j \quad (3.3.)$$

gde je n broj faktora, Y odzivna veličina, β_{k0} , β_{ki} , β_{kii} i β_{kij} koeficijenti za odsečak, linearni, kvadratni i interaktivni koeficijenti regresije, a X_i i X_j nezavisne varijable. Adekvatnost modela je testirana disperzionom analizom modela. Vrednosti koeficijenata i njihova statistička signifikantnost su određeni metodom najmanjih kvadrata korišćenjem programa Matlab 7.0. Adekvatnost regresionog modela, tj. adekvatnost matematičkog ispitivanja datog objekta ispitivanja (predstavljenog skupom eksperimentalnih rezultata), sastoji se u upoređivanju disperzije eksperimentalnih rezultata u odnosu na krivu regresije, i disperzije eksperimentalnih rezultata u tačkama eksperimentalnog plana.³⁰²

3.2.7. Optimizacija uslova fermentacije primenom centralnog kompozitnog rotabilnog eksperimentalnog plana i metode odzivnih površina

U cilju optimizacije i sagledavanja međusobnih interakcija odabranih parametara procesa fermentacije izvedeni su eksperimenti korišćenjem centralnog kompozitnog rotabilnog eksperimentalnog plana za tri eksperimentalna faktora: temperatura, X_1 (26,6 - 43,4 °C), koncentracija inokuluma, X_2 (2,8 - 11,2%) i koncentracije laktoze, X_3 (1,48 - 6,52%), na pet nivoa vrednosti (Tabela 3.3). Sve fermentacije se izvode u erlenmajerima sa modifikovanim MRSL bujonom (sa odgovarajućom koncentracijom laktoze) na vazdušnoj tresilici sa mešanjem (150 rpm) na odgovarajućoj temperaturi.

Tabela 3.3. Eksperimentalni plan sa kodiranim i realnim vrednostima

Faktori	Kodirane vrednosti				
	-1,682	-1	0	1	1,682
Temperatura, X_1 (°C)	26,6	30	35	40	43,4
Koncentracija inokuluma, X_2 (%)	2,8	4,5	7,0	9,5	11,2
Koncentracija laktoze, X_3 (%)	1,48	2,5	4,0	5,5	6,52

3.2.8. Metode za razaranje ćelija

Nakon odvajanja ćelija centrifugiranjem, ćelije se isperu dva puta u 0,1 M natrijum fosfatnom puferu (pH 7) i resuspenduju u istom puferu kao u poglavlju 3.2.4. Nakon toga suspenzija ćelija podvrgava se različitim metodama izolovanja enzima opisanim u nastavku.

3.2.8.1. Ekstrakcija β -galaktozidaze lizozimom

U spremljenu suspenziju ćelija dodaje se lizozim iz ljuske jajeta koncentracije 10 mg/ml nakon čega se smeša inkubira na 37 °C u toku 15 min. U smešu se potom dodaje 0,5 ml 4 M rastvora NaCl i smeša se ponovo inkubira na 37 °C u toku 50 min.³⁰³ Nakon inkubacije, smeša se centrifugira (10 min na 12000 rpm), a u dobijenom supernatantu se određuje aktivnost β -galaktozidaze i koncentracija proteina.

3.2.8.1. Permeabilizacija organskim rastvaračima

Suspenziji ćelija dodato je 0,1 ml hloroforma i 0,05 ml 0,1% rastvora SDS. Rastvor je promešan i odtavljen da stoji 5 min na 37 °C. Nakon toga smeša je centrifugirana i u supernatantu je ispitana aktivnost β -galaktozidaze.¹⁵⁶

Suspenziji ćelija (5 ml) dodato je 0,1 ml toluena. Rastvor se inkubira do 1h, uz povremeno mešanje i povremeno otvaranje boce. Smeša je ostavljena na sobnoj temperaturi sedam dana, a uzorci za ispitivanje aktivnosti uzimani su svakog dana.

Suspenziji ćelija dodata je ekvivalentna zapremina 40 % (v/v) rastvora etanola i acetona (u dva odvojena eksperimenta). Smeša se intenzivno mešana 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga smeša je centrifugirana i u supernatantu, ali i u ćelijskom ostatku je ispitana aktivnost β -galaktozidaze.

3.2.8.3. Mehaničke metode za razaranje ćelija

Suspenziji ćelija dodat je kvarcni pesak (33% w/v). Smeša je potom intenzivno mešana na vorteksu u trajanju od 10 minuta. Nakon toga smeša je centrifugirana i u supernatantu, je ispitana aktivnost β -galaktozidaze.

Suspenziji ćelija dodat je kvarcni pesak (33% w/v). Smeša je potom intenzivno mlevena u avanu u trajanju od 10 minuta. Nakon toga smeša je centrifugirana i u supernatantu, je ispitana aktivnost β -galaktozidaze.

Suspenzija ćelija se stavlja u ultrazvučno kupatilo i razaranje traje 10 minuta, sa povremenim pauzama za hlađenje u ledenom kupatilu na 30 s. Nakon toga smeša je centrifugirana i u supernatantu, je ispitana aktivnost β -galaktozidaze.

Suspenziji ćelija dodat je kvarcni pesak (33% w/v). Smeša se potom stavlja u ultrazvučno kupatilo i razaranje traje 10 minuta, sa povremenim pauzama za hlađenje u ledenom kupatilu na 30 s. Nakon toga smeša je centrifugirana i u supernatantu, je ispitana aktivnost β -galaktozidaze.

Suspenzija ćelija se zaledi na sat vremena u zamrzivaču (-4 °C). Zaleđena suspenzija potom se uranja u ultrazvučno kupatilo i razaranje traje dok se

suspenzija ne otopi (oko 1 min). Ovakva procedura ponavlja se 5 puta. Nakon toga smeša je centrifugirana i u supernatantu, je ispitana aktivnost β -galaktozidaze.

3.2.9. Ispitivanje temperaturnog profila dobijenog enzima

Da bi se odredio temperaturni profil dobijenih enzima, primenjena je modifikacija prethodno opisane metode za određivanje aktivnosti β -galaktozidaze. Rastvor supstrata (10 mM *o*-NPG) i enzim su odvojeno inkubirani na ispitivanim temperaturama (30-60 °C), a zatim su pomešani i reakcija je praćena spektrofotometrijski na već opisan način.

3.2.10. Ispitivanje pH profila dobijenog enzima

Da bi se odredio pH profil dobijenih enzima, primenjena je modifikacija prethodno opisane metode za određivanje aktivnosti β -galaktozidaze. Rastvor supstrata 10 mM *o*-NPG u 0,1 M puferima u opsegu pH 4-8 (acetatni i fosfatni) i enzim su odvojeno inkubirani na optimalnoj temperaturi, a zatim su pomešani i reakcija je praćena spektrofotometrijski na već opisan način.

3.2.11. Ispitivanje temperaturne stabilnosti enzima

U svrhu određivanja termičke stabilnosti enzima rastvori enzima inkubirani su na različitim temperaturama (50, 55 i 60 °C) u toku 24 h. Inaktivacija enzima praćena je merenjem aktivnosti u odgovarajućim vremenskim intervalima (u početku na petnaest minuta, a kasnije prema potrebi) na već opisan način.

Dobijeni rezultati fitovani su eksponencijalnim modelom inaktivacije:

$$\frac{Akt}{Akt_0} = e^{-k_d t} \quad (3.4.)$$

Gde je Akt_0 početna vrednost aktivnosti (IU/ml), Akt vrednost aktivnosti (IU/ml) nakon vremena t (h), a k_d vrednost konstante brzine inaktivacije (h^{-1}).

Nakon sto je određena vrednost k_d određeno je i $t_{1/2}$ vreme polu-života enzima na datoj temperaturi (h) i E_d energija inaktivacije (J/mol), pomoću jednačina:

$$t_{1/2} = \frac{-\ln(0,5)}{k_d} \quad (3.5.)$$

$$\ln(k_d) = -\frac{E_d}{R} \cdot \frac{1}{T} + c \quad (3.6.)$$

3.2.12. Ispitivanje pH stabilnosti enzima

U svrhu određivanja termičke stabilnosti enzima rastvori enzima inkubirani su u različitim 0,1 M puferima (pH 4-8) na 55 °C u toku 24 h. Inaktivacija enzima praćena je merenjem aktivnosti u odgovarajućim vremenskim intervalima na već opisan način.

3.2.13. Ispitivanje aktivnosti enzima u prisustvu jona metala

Da bi se odredio uticaj različitih jona metala (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) na aktivnost enzima, primenjena je modifikacija prethodno opisane metode za određivanje aktivnosti β -galaktozidaze. Rastvor supstrata (*o*-NPG) u odgovarajućem 0,1 M puferu, rastvor soli (hlorida) odgovarajuće koncentracije (1 mM, 10 mM i 100 mM) i enzim su odvojeno inkubirani na optimalnoj temperaturi, a zatim su pomešani i reakcija je praćena spektrofotometrijski na već opisan način.

3.2.14. Ispitivanje kinetičkih parametara enzima

U svrhu određivanja kinetičkih parametara hidrolize *o*-NPG i laktoze rastvori enzima dodati su rastvorima supstrata različitih koncentracija (1-50 mM u slučaju *o*-NPG i 1-500 mM u slučaju laktoze) u odgovarajućim 0,1 M puferima i praćeno je nastajanje proizvoda reakcije (brzina hemijskih reakcija). Rezultati su fitovani Mihaelis-Mentenovom:

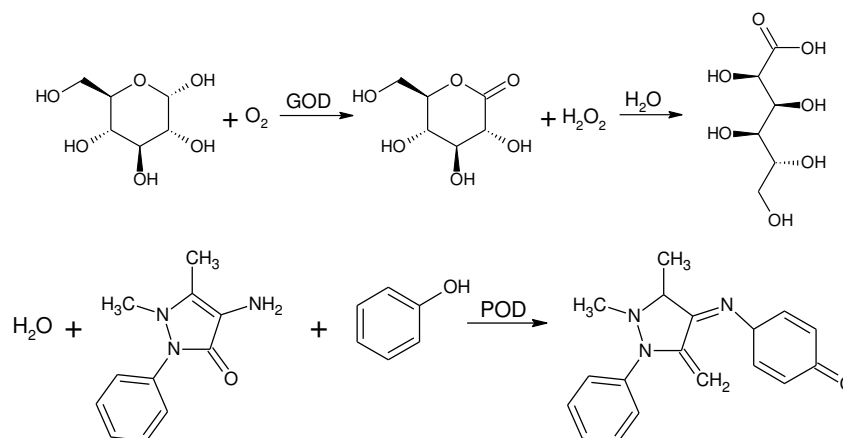
$$V_0 = \frac{v_m \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (3.7.)$$

i Lajnviver-Burkovom jednačinom:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{v_m} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_m} \quad (3.8.)$$

3.2.15. Određivanje koncentracije glukoze GOD-PAP reagensom

Metoda određivanja glukoze se zasniva na spektrofotometrijskom merenju intenziteta boje nastalog kompleksa (hinonimin) na 505 nm, koji je proporcionalan koncentraciji glukoze u uzorku. Određivanje glukoze je u skladu sa sledećom reakcijom:



Slika 3.5. Reakcija određivanja koncentracije glukoze

Prvu reakciju katalizuje enzim glukoza-oksidadza (GOD) i u njoj dolazi do oksidacije aldehidne grupe β -D-glukoze pri čemu nastaje glukonska kiselina i vodonik-peroksid. U prisustvu peroksidaze indikatorska boja iz leuko- neobojenog oblika oksidacijom pomoću H_2O_2 prelazi u obojeni oblik.

Priprema uzoraka za merenje apsorbance se vrši na sledeći način - u prvu kivetu koja predstavlja slepu probu sipa se samo reagens (1 ml), u drugu 100 μl internog standarda (rastvor glukoze) i 1 ml reagensa, a u ostale se raspoređuje po 100 μl uzorka i 1 ml reagensa. Apsorbanca ovako pripremljenih uzoraka nakon temperiranja 10 min na 37 $^\circ\text{C}$ se meri na 505 nm.

Koncentracija nastale glukoze se izračunava prema sledećoj jednačini:

$$C_{glukoze} = \frac{A_{uzorka}}{A_{standarda}} \cdot C_{standarda} \quad (3.9.)$$

3.2.16. Prečišćavanje enzima i određivanje molarne mase enzima

Nativna i SDS elektroforeza rađene su na 12%-tnom poliakrilamidnom gelu. Proteinske trake detektovane su bojenjem CBB-om (Coomassie Brilliant Blue) i srebrom.

3.2.17. Enzimaska sinteza galakto-oligosaharida

Sve reakcije sinteze galakto+oligosaharida izvođene su u erlenmajerima na termostatiranoj orbitalnoj tresilici na 50 °C (u slučaju *A. oryzae* i 45 °C u slučaju *L. acidophilus*) pri mešanju (200 rpm). U erlenmajere se odmeri definisana količina enzima i doda se 20 ml rastvora laktoze koncentracije 400 g/l. Uzorci su uzimani u određenim vremenskim intervalima, kuvani 10 min na 100 °C da bi se zaustavila reakcija, razblaženi u skladu sa potrebama, filtrirani kroz 0,2 mm filter i dalje analizirani HPLC-om. Kontrolni uzorak, bez enzima, podvrgnut je istom tretmanu i u njemu nisu detektovani proizvodi.

U cilju optimizacije parametara sinteze galakto-oligosaharida u pojedinačnim eksperimentima varirani su temperatura (40-60 °C), pH (4-7), početna koncentracija laktoze (100-600 g/l), dok su ostali parametri držani na konstantnim vrednostima. Svi eksperimenti praćeni su u toku vremena.

3.2.18. HPLC kvantitativna analiza proizvoda reakcije

Analiza prethodno pripremljenih uzoraka je vršena na Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific HPLC uređaju. Za razdvajanje galakto-oligosaharida, kao i galaktozida drugih šećera korišćena je kolona za šećere (Hyper REZ XP Carbohydrate Ca²⁺, 300 mm × 7.7 mm, 8µm) na 80 °C. Kao mobilna faza korišćena je voda sa protokom od 0,6 ml/min. Detekcija proizvoda je vršena pomoću RI detektora (RefractoMax 520).

3.2.19. Karakterizacija proizvoda spektrofotometrijom jonske pokretljivosti

Određivanje molekulske mase proizvoda reakcija transgalaktozilacije je izvedeno spektrometrijom jonske pokretljivosti pomoću Synapt G2 Si masenog

spektrometra visoke rezolucije (Waters Corp., Manchester, UK). U ovom uređaju joni se razdvajaju na osnovu razlike u brzinama kretanja u medijumu koji se sastoji od azota i helijuma. Reakciona smeša je razblažena 1000 puta u smeši methanol/voda (1:1, v/v), centrifugirana 10 min na 10000×g i supernatant je injektiran u instrument brzinom 5 µl/min. Instrument je korišćen u pozitivnom jonizacionom režimu.

3.2.20. Imobilizacija enzima

3.2.20.1. Imobilizacija enzima na makroporozne nosače

Imobilizacija na makroporozne nosače podrazumevala je inkubiranje 20 mg nosača i 1 ml rastvora enzima određene koncentracije (u slučaju *L. acidophilus* koncentracija enzima je bila konstantna, a varirana je zapremina dodatog enzima) u odgovarajućem puferu na 25 °C uz mešanje na roler šejkeru. Nakon definisanog vremena, imobilisani enzim je odvajan od supernatanta, ispiran tri puta sa po 1 ml pufera u kome je vršena imobilizacija i sušen na 37 °C. Uslovi za svaki pojedinačni slučaj opisani su prilikom komentaranja rezultata)

3.2.20.2 Priprema i modifikacija nosača za imobilizaciju

3.2.20.2.1. Priprema Purolite A109 za imobilizaciju

Nosač je potrebno pripremiti za imobilizaciju, odnosno modifikaciju. Potrebna količina se odmeri u erlenmajer, a potom joj se doda 5% (v/v) rastvor sumporne kiseline, tako da tečnost prekriva kuglice nosača. Erlenmajer se potom ostavlja u ultrazvučnom kupatilu 15 minuta, nakon čega se nosač odvaja vakuum-filtracijom i ispira sa velikom količinom destilovane vode. Ovako profiltriran, nosač se vraća u erlenmajer i meša sa rastvorom natrijum-hidroksida koncentracije 1 M, vraća se u ultrazvučno kupatilo na 15 minuta. Sledi filtracija uz ispiranje vodom, nakon čega se dodaje acetonitril i nosač se vraća na 15 minuta u ultrazvučno kupatilo. Nosač se opet profiltrira, ispira vodom i na kraju suši. Nakon ove procedure, može se smatrati da je nosač očišćen i spreman za imobilizaciju enzima, odnosno dalju modifikaciju.

3.2.20.2.2. Modifikacija nosača cijanuril hloridom

1g očišćenog Purolite® A-109 sa 5 g cijanuril hlorida rastvorenog u 250 ml acetona i par kapi trietilamina. Smeša se ostavlja na magnetnoj mešalici na 2h, na temeparturi od 0 °C. Nakon završene reakcije, nosač se dva puta spira acetonom i suši u vakuum sušilici na 40 °C, 24h. Ovako pripremljen nosač koristimo za imobilizaciju enzima.

3.2.20.2.3. Modifikacija nosača uvođenjem epoksi grupa

Inkubira se 1g očišćenog Purolite® A-109 sa 3 ml 1M rastvora NaOH i 330 µl epihlorhidrina. Reakcija se odvija na orbitalnoj mešalici (100 rpm), pola sata, na temperaturi od 55 °C. Zatim se nosač profiltrira, ispere acetonom dva puta i osuši u vakuum sušilici na 40 °C, 24h. Ovako pripremljen nosač koristimo za imobilizaciju enzima.

3.2.20.2.4. Modifikacija nosača cisteinom i glutaraldehidom

Da bi se nosač, aktivirao pomoću cisteina, odmeri se 2,0 g nosača i doda 20 ml 1M rastvora cisteina. Po dodavanju rastvora, nosač se ostavlja na tresilici da se termostatira na 25 °C tokom 48 sati. Potom se nosač ispira, kako bi se uklonio nevezani cistein. Na 2,0 g nosača, dodaje se 33,6 ml 25% rastvora glutaraldehida i 22,4 ml 0,2M fosfatnog pufera (pH 7), a potom se termostatira na tresilici naredna 24 časa. Nakon termostatiranja, rastvor sa nosačem se filtrira i ispira da bi se uklonio nevezani glutaraldehid. Rastvor je potrebno dugo ispirati, kako bi se isprala žuta boja rastvora koja potiče od glutaraldehida.

3.2.20.2.5. Modifikacija nosača etilendiaminom i glutaraldehidom

Da bi se nosač, Eupergit®C 250L, aktivirao pomoću etilendiamina (EDA), 1 g nosača se tretira sa 10 ml rastvora koji sadrži 1M etilendiamina (EDA) na 60 °C pri pH 10 tokom 4 časa. Aktivirani nosač se ispere puferom i dalje aktivira glutaraldehidom na već opisan način.

3.2.20.3. Modifikacija enzima

Enzim je rastvoren u 0,1M natrijum-acetatnom puferu (pH=4,75) i koncentracija ovog rastvora iznosi 2mg/ml. U 10 ml ovog rastvora dodaje se 0,0155g EDC-a, a zatim se se smeša ostavlja 1,5 h uz orbitalno mešanje. Nakon toga, u smešu se dodaje 2,2 ml 0,5 M hidroksilamina i smeša se dijalizira preko noći, u odnosu na 0,1M natrijum-acetatni pufer, na temperaturi od 4 °C. Rastvor modifikovanog enzima se odmah potom koristi za imobilizaciju.

3.2.20.4. Imobilizacija enzima na silika nano-čestice

Imobilizacija na silika nano-čestice podrazumevala je inkubiranje 1 mg nosača i 1 ml rastvora enzima koncentracije proteina 230 mg/g nosača u odgovarajućem puferu na 25 °C uz mešanje na roler šejkeru. Nakon definisanog vremena, imobilisani enzim je odvajan od supernatanta centrifugiranjem, ispiran tri puta sa po 1 ml pufera u kome je vršena imobilizacija i sušen na 37 °C.

3.2.20.5 Modifikacija silika nano-čestica

3.2.20.5.1. Modifikacija APTMS-om

U balon od 50 ml je stavljeno je 300 mg nanosilika čestica i 1,18 ml aminosilana (maseni odnos između nanočestica i silana 1:1). Potom, dodato je 36 ml toluena, 50 µl trietilamina i kontinuirano je dovođen je azot tokom trajanja reakcije modifikacije. Reakcija modifikacije je izvođena na sobnoj temperaturi u trajanju od 48 h i uz mešanje na magnetnoj mešalici pri brzini 600 min⁻¹. Nakon završene modifikacije, modifikovana silika je filtrirana, ispirana sa 3 puta po 5 ml toluena i podvrgnuta ultrazvuku u trajanju od 5 min kako bi se uklonio neproreagovali aminosilan. Prečišćena modifikovana silika je dispergovana u etanolu.

3.2.20.5.2. Modifikacija nanosilika-APTMS čestica cijanurilhloridom

Amino grupe koje se nalaze na površini ovih čestica reagovaće sa atomima hlora s-triazin prstena cijanurilhlorida, pri čemu dolazi do reakcije supstitucije. U balon je

stavljeno 200 mg nosača, 1g cijanurilhlorida, 70 ml acetona i 50 µl trietiamina. Pripremljena reakciona smeša je ostavljena tokom 2 h na 0 °C i pri brzini obrtaja mešalice od 400 rpm. Nakon završetka reakcije aktivacije, nosač je izdvojen na vakuum-filtracijom i ispran tri puta sa po 5 ml acetona. Ovako pripremljeni nosač nakon sušenja u vakuum sušnici korišćen je za imobilizaciju enzima.

3.2.21. Sinteza galakto-oligosaharida sa imobilisanim enzimom

Sve reakcije sinteze galakto-oligosaharida izvođene su u erlenmajerima na termostatiranoj orbitalnoj tresilici na 50 °C (u slučaju *A. oryzae* i 45 °C u slučaju *L. acidophilus*) pri mešanju (200 rpm). U erlenmajere se odmeri definisana količina enzima i doda se 20 ml rastvora laktoze koncentracije 100-600 g/l. Uzorci su uzimani u određenim vremenskim intervalima, kuvani 10 min na 100 °C da bi se zaustavila reakcija, razblaženi u skladu sa potrebama, filtrirani kroz 0,2 mm filter i dalje analizirani HPLC-om. Kontrolni uzorak, bez enzima, podvrgnut je istom tretmanu i u njemu nisu detektovani proizvodi.

3.2.22. Određivanje operativne stabilnosti biokatalizatora

Eksperimenti su izvođeni pod definisanim reakcionim uslovima u toku određenog vremenskog perioda (3 h) i za to vreme uzimani su uzorci za kvantitativnu analizu. Nakon definisanog vremenskog perioda, imobilisani enzim je odvajan od ostatka reakcione smeše vakuum-filtracijom, ispiran tri puta sa po 20 ml 0,1 M odgovarajućeg pufera, prosušen na 37 °C i nakon toga je korišćen u narednom reakcionom ciklusu. Rezultati su izraženi kao relativna aktivnost imobilisanog enzima u odnosu na prvi reakcioni ciklus.

3.2.23. Sinteza galakto-oligosaharida u reaktoru sa fluidizovanim slojem

Kada je reakcija sinteze galakto-oligosaharida izvođena u semi-kontinualnom sistemu, primenjen je stakleni cevni bioreaktor dimenzija 136 mm (dužina) × 9 mm (unutrašnji prečnik) sa ukupnom zapreminom od 8,7 ml opremljen plaštom kroz koji je proticala voda predgrejana na 50 °C. Kolona je punjena različitim količinama imobilisanog enzima, dok je zapremina reakcione smeše (400 g/l) koja

je zagrevana do 50 °C uz mešanje u erlenmajeru na magnetnoj mešalici iznosila 80 ml. Ova smeša je upumpavana u reaktor sa biokatalizatorom posredstvom peristaltičke pumpe pri različitim protocima, a smeša je semi-kontinualno recirkulisana tako što je nakon izlaska iz reaktora povratnim tokom odvođena u rezervoar sa mešanjem i ponovo upumpavana na početak kolone.

Uzorci su uzimani u određenim vremenskim intervalima, kuvani 10 min na 100 °C da bi se zaustavila reakcija, razblaženi u skladu sa potrebama, filtrirani kroz 0,2 mm filter i dalje analizirani HPLC-om. Kontrolni uzorak, bez enzima, podvrgnut je istom tretmanu i u njemu nisu detektovani proizvodi.

3.2.24. Sinteza galaktozida salicina

Sve reakcije sinteze su izvedene u šlifovanim erlenmajerima na vazdušnoj tresilici na 150 rpm na temperaturi optimalnoj za dati enzim. Salicin, laktoza i enzim, koncentracija navedenih u Tabeli 11, su rastvoreni u 5 ml acetatnog pufera (pH 4,5). Vreme reakcije je takođe predviđeno eksperimentalnim planom. Reakcija je prekinuta kuvanjem 10 minuta na 100 °C, uzorci su adekvatno razblaženi, centrifugirani i zatim analizirani korišćenjem HPLC metode.

Tabela 3.4. Eksperimentalni plan sa kodiranim i realnim vrednostima

Faktori	Kodirane vrednosti				
	-2	-1	0	1	2
Koncentracija laktoze, X_1 (mM)	40	180	320	460	600
Koncentracija salicina, X_2 (mM)	10	35	60	85	105
Koncentracija enzima, X_3 (IU)	40	120	200	280	360
Vreme, X_4 (h)	2	4,5	7	9,5	12

3.2.25. HPLC analiza uzoraka galaktozida salicina

Za analizu salicin galaktozida korišćena je reverzno-fazna kolona (Hypersil gold C18, 150 mm × 4.6 mm, 5 µm). Metoda je razvijana utvrđivanjem optimalnog protoka i sastava mobilne faze variranjem ovih parametara u cilju postizanja odgovarajućeg razdvajanja jedinjenja. Došlo se do sledećih vrednosti, koje obezbeđuju najpogodniji režim rada: U toku prva dva minuta sastav mobilne faze

je bio konstantan, i to: 90% vode (A) i 10% metanola sa 0,1% mravlje kiseline (B). U narednih 6 min uspostavljen je gradijent 10-90% (B), a naredna 3 minuta sastav mobilne faze je ponovo konstantan (90% B). U toku analiza, protok je bio konstantan (1 ml/min). Retenciona vremena i površine pikova, u vidu hromatograma, dobijeni su UV detekcijom na 210 nm. Prinos proizvoda je izražen u odnosu na iskorišćenje salicina.

3.2.26. Sinteza galaktozida sorbitola

Sve reakcije sinteze su izvedene u šlifovanim erlenmajerima na vazdušnoj tresilici na 150 min^{-1} na temperaturi optimalnoj za dati enzim. Salicin, laktoza i enzim, koncentracija navedenih u Tabeli 12, su rastvoreni u 5 ml acetatnog pufera (pH 4,5). Vreme reakcije je takođe predviđeno eksperimentalnim planom. Reakcija je prekinuta kuvanjem 10 minuta na $100 \text{ }^\circ\text{C}$, uzorci su adekvatno razblaženi, centrifugirani i zatim analizirani korišćenjem HPLC metode.

Tabela 3.5. Eksperimentalni plan sa kodiranim i realnim vrednostima

Faktori	Kodirane vrednosti				
	-2	-1	0	1	2
Koncentracija enzima, X_1 (mg/ml)	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Koncentracija laktoze, X_2 (mM)	100	200	300	400	500
Molarni odnos sorbitol:laktoza, X_3	1	3	5	7	9
Koncentracija NaCl, X_4 (M)	0	0,2	0,4	0,6	0,8
Vreme, X_5 (h)	2	4,5	7	9,5	12

4. REZULTATI I DISKUSIJA

Cilj ove disertacije je da se razvoju novih transgalaktozilacionih procesa katalizovanih β -galaktozidazama doprinese na više nivoa: 1) mikrobnom proizvodnjom, izolovanjem i primenom u transgalaktozilaciji enzima koji nije ranije primenjivan, 2) optimizacijom uslova transgalaktozilacije sa aspekta prinosa proizvoda i strukture dobijenih proizvoda, 3) dobijanjem imobilisanih β -galaktozidaza visoke transgalaktozilacione aktivnosti i stabilnosti, 4) izborom optimalne reaktorske konfiguracije za primenu ovih imobilisanih enzima, 5) sintezom novih β -galaktozida sa potencijalnom fiziološkom aktivnošću.

4.1. Proizvodnja mikrobnih β -galaktozidaza

4.1.1. Preliminarna selekcija mikrobnih producenata β -galaktozidaza

U prvoj fazi izrade ove doktorske disertacije ispitan je veliki broj mikroorganizama iz kolekcije Katedre za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju (Tabela 4.12) u cilju izbora potencijalnih producenata β -galaktozidaza. Primarni eksperimenti obuhvatili su gajenje mikroorganizama na odgovarajućim sintetskim podlogama u toku 24 h, pri uslovima (temperatura, pH podloge, mešanje) koji su opisani u literaturi kao optimalni za rast i produkciju enzima pojedinačnih mikroorganizama. Odabir najboljih producenata izvršen je prvenstveno sa aspekta prinosa aktivnosti (IU/ml), a potom i sa aspekta svojstava dobijenih enzimskih preparata.

Rezultati ovih preliminarnih eksperimenata, kao što se može videti u tabeli 4.1, pokazali su da su bakterije nesumnjivo efikasniji producenti u odnosu na ostale ispitane grupe mikroorganizama. Naime, bakterija mlečne kiseline *L. acidophilus* predstavlja daleko najefikasnijeg producenta enzima β -galaktozidaze (0,671 IU/ml) među ispitanim mikroorganizmima. Nešto manju aktivnost enzima proizvele su *L. reuteri* (0,420 IU/ml), *L. helveticus* ATTC 15009 (0,344 IU/ml), potom *P. shermanii* (0,257 IU/ml) i *S. termophilus* (0,110 IU/ml). Ostali mikroorganizmi nisu proizvele enzim, ili su pak dobijene aktivnosti enzima zanemarljive, te su oni isključeni kao potencijalni producenti β -galaktozidaza.

U skladu sa ovim rezultatima, u nastavku eksperimentalnog rada ispitana su najvažnija svojstva (temperaturni i pH optimum) dobijenih enzimskih preparata za dalju primenu u reakcijama hidrolize i transgalaktozilacije. Imajući u vidu da su dobijeni enzimski preparati sličnih svojstava, te da se polja njihove primene neće bitno razlikovati, vodili smo se kriterijumom visine produkovane aktivnosti, kao i atraktivnosti proizvodnog mikroorganizma.

Tabela 4.1. Produkovane aktivnosti β -galaktozidaze

Mikroorganizam	Aktivnost (IU/ml)
Bakterije	
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 23271	0,420
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	0,671
<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> NRRL B 4564	-
<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>casei</i> NRRL B 441	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469	-
<i>Lactobacillus helveticus</i> ATCC 15009	0,344
<i>Lactobacillus helveticus</i> NRRL B 734	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842	0,011
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> NRRL-B-1924	-
<i>Streptococcus termophilus</i> S3	0,110
<i>Propionibacterium shermanii</i>	0,257
Kvasac	
<i>Kluyveromyces lactis</i> NRRL-YB-3678	0,049
Plesni	
<i>Rhizopus oryzae</i>	-
<i>Aspergillus oryzae</i> DMS 1862	-

Naime, poslednjih godina bakterije mlečne kiseline privlače sve više pažnje kao potencijalni izvori β -galaktozidaza najviše zahvaljujući svom statusu sigurnih za upotrebu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, čime se omogućava neometano korišćenje enzima bez primene komplikovanih metoda prečišćavanja.

Stoga, u nastavku eksperimentalnog rada ove doktorske disertacije, biće izvršena detaljna optimizacija procesa proizvodnje enzima β -galaktozidaze pomoću

bakterije mlečne kiseline *L. acidophilus*, variranjem sastava fermentacione podloge i parametara produkcije koji pozitivno utiču na regulaciju biosinteze enzima.

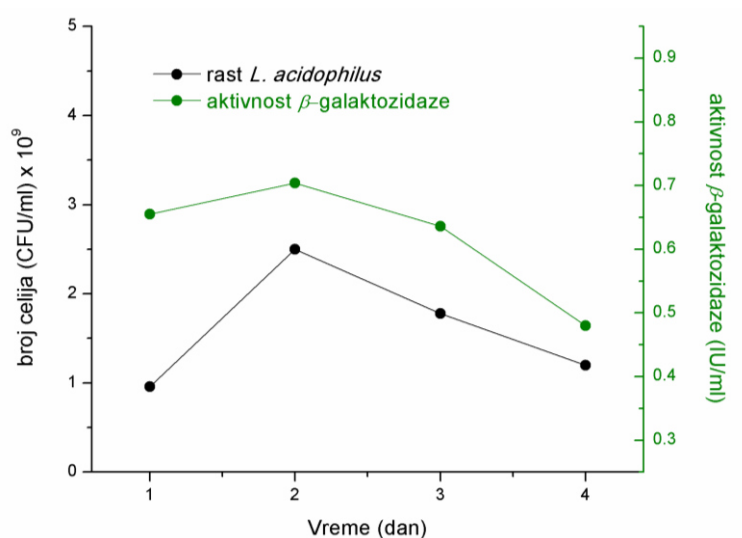
Tabela 4.2. Svojstva dobijenih β -galaktozidaza iz različitih mikroorganizama

Mikroorganizam	t optimum (°C)	pH optimum
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 23271	45	6,8
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	45	6,8
<i>Lactobacillus helveticus</i> ATCC 15009	45	6,8
<i>Propionibacterium shermanii</i>	45-50	7,0
<i>Kluyveromyces lactis</i>	45-50	6,5

4.1.2. Ispitivanje kinetike mikrobnog rasta i biosinteze β -galaktozidaza

U cilju definisanja optimalnih uslova fermentacije sa aspekta maksimalne proizvodnje enzima β -galaktozidaze, prvi eksperimenti su obuhvatili proučavanje kinetike rasta *L. acidophilus* i proizvodnje β -galaktozidaze. Za potrebe ovog eksperimenta *L. acidophilus* je gajen u tečnom medijumu (MRSL bujon), u termostatu na 37 °C pri mikroaerofilnim uslovima. Fermentacija je trajala 4 dana, a uzorci za određivanje broja ćelija i produkovane enzimske aktivnosti uzimani su svakih 24h. Kao što je prikazano na slici 42., krive kinetike ćelijskog rasta i proizvedene aktivnosti enzima pokazale su sličan trend. Naime, produkovana aktivnosti dostiže maksimalnu aktivnost (0,718 IU/ml) posle dva dana, kada je ujedno i broj ćelija najveći ($2,5 \times 10^9$ ćelija). Nakon toga, primećeno je postupno smanjenje enzimske aktivnosti, što je verovatno blisko povezano sa činjenicom da je kultura ušla u stacionarnu fazu rasta nakon dva dana. Slični rezultati, odnosno maksimalan prinos aktivnosti enzima na početku stacionarne faze, prijavljeni su i ranije u literaturi za različite mikroorganizme.^{127, 304} Ovakvo ponašanje *L. acidophilus* se najverovatnije može objasniti ranijim nalazima da tokom stacionarne faze rasta dolazi do značajnih promena u sastavu, a samim tim i strukturi ćelijskog zida.¹⁴²

Naime, pri prelasku u stacionarnu fazu dolazi do drastičnog povećanja umreženosti peptidoglukana, čime se povećava gustina i debljina ovog sloja, što dalje rezultira otežanim oslobađanjem intracelularnih enzima.¹⁴²



Slika 4.1. Kinetika rasta i produkcije β -galaktozidaze iz *L. acidophilus* u tečnom medijumu (MRSL bujon), 37 °C pri dodatku 2% inokuluma.

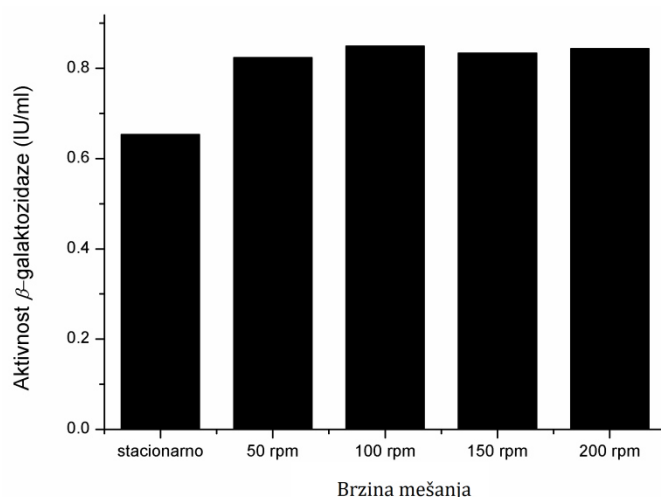
Takođe, jedan od potencijalnih razloga za smanjenje aktivnosti enzima predstavlja i smanjenje koncentracije laktoze (induktora ovog enzima), odnosno sa druge strane, povećanje koncentracije njenih produkata razgradnje, pre svega glukoze u fermentacionom medijumu. Naime, dokazano je da glukoza, kao lako iskoristivi izvor ugljenika u podlozi, dovodi do represije proizvodnje β -galaktozidaze kod nekih mikroorganizama.¹¹³ Konačno, smanjenje aktivnosti enzima, može biti povezano i sa porastom produkcije proteaza, koje mogu dovesti do nestabilnosti i inaktivacije enzima.^{127, 133}

Ovde treba napomenuti da je istovremeno sa merenjem oslobođene intracelularne aktivnosti enzima, tokom praćenog perioda fermentacije, merena i potencijalna ekstracelularna aktivnost u uzorcima fermentacionog medijuma. Naime, pregledom literature primećeno je da pojedine bakterije mlečne kiseline (*L. brevis* i *L. plantarum*) mogu da proizvode ekstracelularno enzim β -galaktozidazu,¹⁵³ što je objašnjeno navodnom autolizom ćelija u stacionarnoj fazi rasta bakterija. Međutim, u našem eksperimentu, ekstracelularna aktivnost nije detektovana, te će stoga u

narednim poglavljima posebna pažnja biti obraćena na pronalaženje što učinkovitijih načina ekstrakcije intracelularne β -galaktozidaze.

4.1.3. Optimizacija uslova gajenja

Imajući u vidu da su za gajenje bakterija iz roda *Lactobacillus* povoljniji statični uslovi zbog mikroaerofilnih uslova rasta ovog roda, usled negativnog efekta aeracije medijuma do koje dolazi mešanjem, preliminarni eksperimenti su podrazumevali gajenje mikroorganizma u stacionarnim uslovima u termostatu na 37 °C, temperaturi optimalnoj za njegov rast. Međutim, često optimalni uslovi za proizvodnju mikrobne biomase ne odgovaraju optimalnim uslovima za produkciju različitih ćelijskih produkata, u ovom slučaju enzima β -galaktozidaze. Stoga, u cilju utvrđivanja optimalnih uslova za maksimalnu proizvodnju enzima β -galaktozidaze pomoću *L. acidophilus*, u narednim eksperimentima, ispitan je uticaj mešanja kao važnog procesnog parametra na produkovanu aktivnost β -galaktozidaze.



Slika 4.2. Aktivnost β -galaktozidaze (IU/ml) produkovana pri različitim brzinama mešanja u toku fermentacije. Proizvodnja β -galaktozidaze iz *L. acidophilus* u tečnom medijumu (MRSL bujon), 37 °C pri dodatku 2% inokuluma.

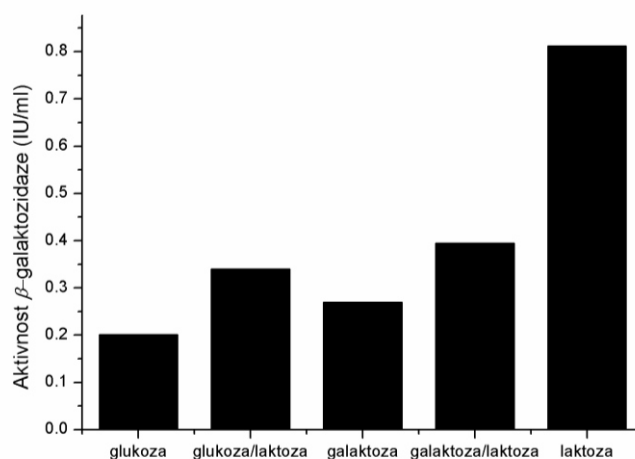
Neočekivano, imajući u vidu mikroaerofilnu prirodu mikroorganizma bolji prinos enzima bio je kod kultura gajenih na termostatiranoj tresilici nego u stacionarnim uslovima. Sa aspekta proizvodnje ovo je veoma značajan podatak koji će omogućiti pojednostavljenje procesa proizvodnje enzima. Međutim, iako mešanje igra

značajnu ulogu, jer omogućava bolje snabdevanje mikroorganizama kiseonikom i hranljivim materijama, u našem slučaju brzina mešanja pokazala se kao nesignifikantan faktor. Kulture gajene pri brzinama mešanja u opsegu 50-200 rpm produkovale su gotovo identične vrednosti aktivnosti enzima (0,8-0,85 IU/ml).

4.1.4. Optimizacija sastava podloge

U studijama koje su obuhvatile veliki broj različitih mikroorganizama prijavljen je značajan uticaj izvora ugljenika na prinos β -galaktozidaze. Međutim, zaključeno je da je uloga izvora ugljenika u ovoj biosintezi može znatno da varira u zavisnosti od vrste, pa čak i soja korišćenih mikroorganizama ^{31, 113, 125}.

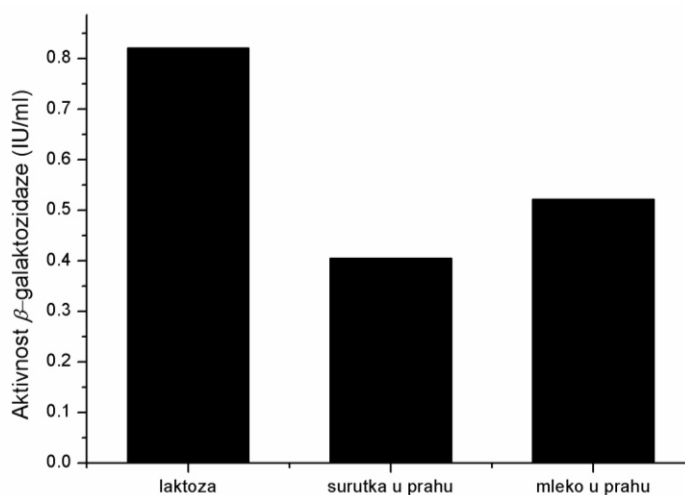
Literaturni podaci o uticaju izvora ugljenika na rast i produkciju enzima *L. acidophilus* su prilično oskudni. ¹³⁴ Imajući ovo u vidu, u ovoj disertaciji su testirani različiti ugljeni hidrati (glukoza, galaktoza, laktoza i njihove smeše) u cilju izbora najboljeg izvora ugljenika, sa aspekta produkovane aktivnosti β -galaktozidaze.



Slika 4.3. Uticaj različitih izvora ugljenika na produkovanu aktivnost β -galaktozidaze

Fermentacione podloge korišćene u ovom eksperimentu predstavljaju modifikovani MRS bujon gde je glukoza zamenjena odgovarajućim šećerom (galaktoza, laktoza) ili pak smešom šećera iste koncentracije (2%). Rezultati prikazani na Slici 4.3 nesumnjivo ukazuju na to da laktoza značajno doprinosi povećanju produkovane aktivnosti β -galaktozidaze, jer su sva tri medijuma koja sadrže laktozu pokazala izraženiju enzimsku aktivnost. Pokazalo se da je najviša

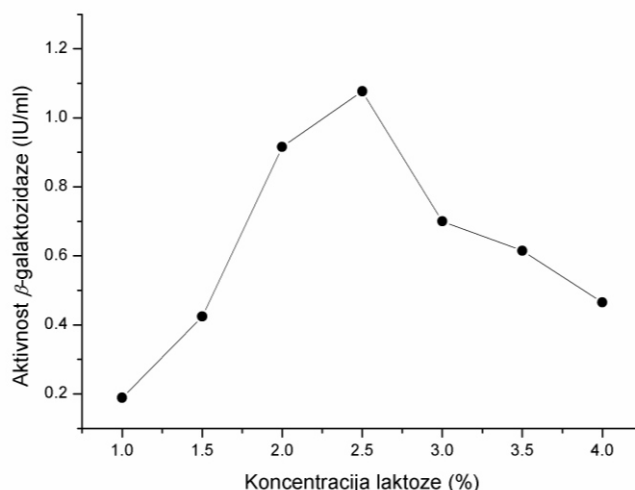
aktivnost β -galaktozidaze (0,819 IU/ml) produkovana u slučaju korišćenja laktoze kao jedinog izvora ugljenika, dok su kulture gajene na smešama laktoze sa glukozom i galaktozom rezultovale umerenom aktivnošću β -galaktozidaze 0,385 IU/ml i 0,401 IU/ml, redom. Ovi rezultati su u skladu sa dosada objavljenim rezultatima u literaturi za različite sojeve bakterija mlečne kiseline.^{113, 125, 127} Hsu i saradnici su detektovali najveću aktivnost β -galaktozidaze upravo na podlogama koje sadrže laktozu kao jedini izvor ugljenika, zatim galaktozu, a najniže aktivnosti produkovane su na glukozu kao jedinom izvoru ugljenika.¹²⁵ Naime, opšte je poznata činjenica da bakterije u toku propagacije prvenstveno troše jednostavnije šećere prisutne u podlozi, što očigledno ne dovodi do značajne indukcije proizvodnje β -galaktozidaze. Sa druge strane, pri višim koncentracijama laktoze dolazi do indukcije, samim tim i do povećane sinteze β -galaktozidaze. Nakon dostizanja određenog stepena produkcije enzima, aktivnost produkovanog enzima počinje da se postepeno smanjuje, što se može objasniti postojanjem kataboličke represije u čemu glavnu ulogu ima glukoza, koja nastaje i akumulira se unutar ćelije usled trošenja, odnosno hidrolize laktoze¹³³.



Slika 4.4. Uticaj izvora laktoze na produkovanu aktivnost β -galaktozidaze

U eksperimentima kada smo laktozu u modifikovanom MRSL bujonu zamenili odgovarajućim koncentracijama mleka u prahu i slatke surutke u prahu (da se dobije 2% laktoze u podlozi), dobili smo niže rezultate aktivnosti (Slika 4.4), što je verovatno posledica otežanog izdvajanja, a potom i razaranja ćelija usled prisustva proteina iz mleka i surutke.

Osim prirode izvora ugljenika u fermentacionom medijumu, pokazalo se da je sa aspekta prinosa β -galaktozidaze podjednako važna i koncentracija izvora ugljenika.^{133, 134} Zbog toga, izvršili smo fermentaciju u modifikovanom MRSL bujonu sa različitim početnim koncentracijama laktoze (1–4%). Fermentacija je kao i u prethodnim eksperimentima vršena 2 dana, na vazdušnoj tresilici sa mešanjem (150 rpm) na 37 °C. Produkovana aktivnost β -galaktozidaze postepeno se povećavala sa rastom početnih koncentracija laktoze do 2,5% (Slika 4.5).



Slika 4.5. Uticaj koncentracije laktoze u podlozi na produkovanu aktivnost enzima

Dalji rast sadržaja laktoze doveo je do smanjenja aktivnosti β -galaktozidaze, što ukazuje na činjenicu da je zajedno sa povećanjem sadržaja laktoze, došlo i do povećanja koncentracije njenih produkata razgradnje koji, kako je navedeno i ranije, dovode do represije proizvodnje β -galaktozidaze. Sličan fenomen primetili su Murad i saradnici, u eksperimentu koji je podrazumevao gajenje *L. reuteri* i *S. termophilus*.¹³³ Njihovi rezultati su pokazali da aktivnost enzima povećava sa povećanjem koncentracije laktoze (do 6%), dostižući 2,54 IU/ml i 2,59 IU/ml, redom. Daljim povećanjem koncentracije laktoze do 10% došlo je do drastičnog smanjenja produkcije enzima u slučaju *L. reuteri*, dok je u slučaju *S. termophilus* došlo do neznatnog povećanja proizvodnje enzima (3,01 IU/ml).¹³³ Ovi rezultati ujedno pokazuju i da je *L. acidophilus* korišćen u ovoj doktorskoj disertaciji osetljiviji na represivno delovanje glukoze, jer se maksimalna proizvodnja postiže pri znatno nižim početnim koncentracijama laktoze.

Ovi rezultati sugerišu da postoji jasan obrazac, bez obzira na vrstu mikroorganizma koji se koristi za proizvodnju β -galaktozidaze, da β -galaktozidaza predstavlja inducibilan enzim čiji prinos aktivnost predstavlja kompromis između laktozne indukcije i intracelularne represije glukozom.

4.1.5. Optimizacija uslova fermentacije primenom centralnog kompozitnog rotabilnog eksperimentalnog plana i metode odzivnih površina

U prehodnim fazama ove doktorske disertacije primenjena je konvencionalna metoda optimizovanja uslova proizvodnje β -galaktozidaze variranjem jednog po jednog parametra fermentacije pri fiksiranim vrednostima ostalih parametara. U cilju detaljnije optimizacije procesa i dobijanja uvida u interakcije između parametara, u nastavku rada koristili smo centralni kompozitni rotabilni eksperimentalni plan i metodu odzivnih površina (RSM).

Eksperimentalni dizajn i RSM predstavljaju važan alat koji se danas široko koristi u definisanju optimalnih uslova procesa, jer pokazuje brojne prednosti u odnosu na konvencionalne metode, pošto je u stanju da utvrdi, ne samo efekte različitih faktora na proizvodnju, već u isto vreme i njihove međusobne interakcije. U ovoj studiji RSM se koristi za određivanje optimalne vrednosti relevantnih faktora fermentacije (temperature, koncentracije inokuluma i koncentracije laktoze) u pogledu proizvodnje maksimalne aktivnosti, kao i specifične aktivnosti β -galaktozidaze, uzimajući u obzir pojedinačne i kombinovane efekte ovih parametara.

Eksperimentalni plan se sastoji od 20 nasumično izvedenih eksperimenata (Tabela 4.3) u cilju izbegavanja sistemske greške eksperimenta, a tokom izrade eksperimenta, praćene su dve izlazne vrednosti: aktivnost β -galaktozidaze (IU/ml) i specifična aktivnost β -galaktozidaze (IU/mg proteina).

Tabela 4.3. Kodirane i stvarne vrednosti faktora u eksperimentalnom planu

Eksp.	Temperatura (°C)	Koncentracija inokuluma (%)	Koncentracija laktoze (%)	Aktivnost (IU/ml)	Specifična aktivnost (IU/mg prot)
1	-1(30)	-1(4,5)	-1(2,5)	2,892	2,419
2	1(40)	-1(4,5)	-1(2,5)	1,882	0,827
3	-1(30)	1(9,5)	-1(2,5)	1,561	1,350
4	1(40)	1(9,5)	-1(2,5)	2,295	1,116
5	-1(30)	-1(4,5)	1(5,5)	1,974	1,233
6	1(40)	-1(4,5)	1(5,5)	1,469	0,985
7	-1(30)	1(9,5)	1(5,5)	1,606	0,906
8	1(40)	1(9,5)	1(5,5)	1,239	0,584
9	-1,682(26,6)	0 (7)	0 (4)	2,341	1,224
10	1,682(43,4)	0 (7)	0 (4)	0,837	0,352
11	0(35)	-1,682(2,8)	0 (4)	2,662	1,396
12	0(35)	1,682(11,2)	0 (4)	2,387	1,247
13	0(35)	0 (7)	-1,682 (1,48)	2,570	1,322
14	0(35)	0 (7)	1,682 (6,52)	1,515	0,761
15	0(35)	0 (7)	0 (4)	1,974	1,205
16	0(35)	0 (7)	0 (4)	2,111	1,111
17	0(35)	0 (7)	0 (4)	2,295	1,069
18	0(35)	0 (7)	0 (4)	2,092	1,419
19	0(35)	0 (7)	0 (4)	1,882	0,97
20	0(35)	0 (7)	0 (4)	2,360	1,350

4.1.5.1. Uticaj parametara fermentacija na aktivnost β -galaktozidaze

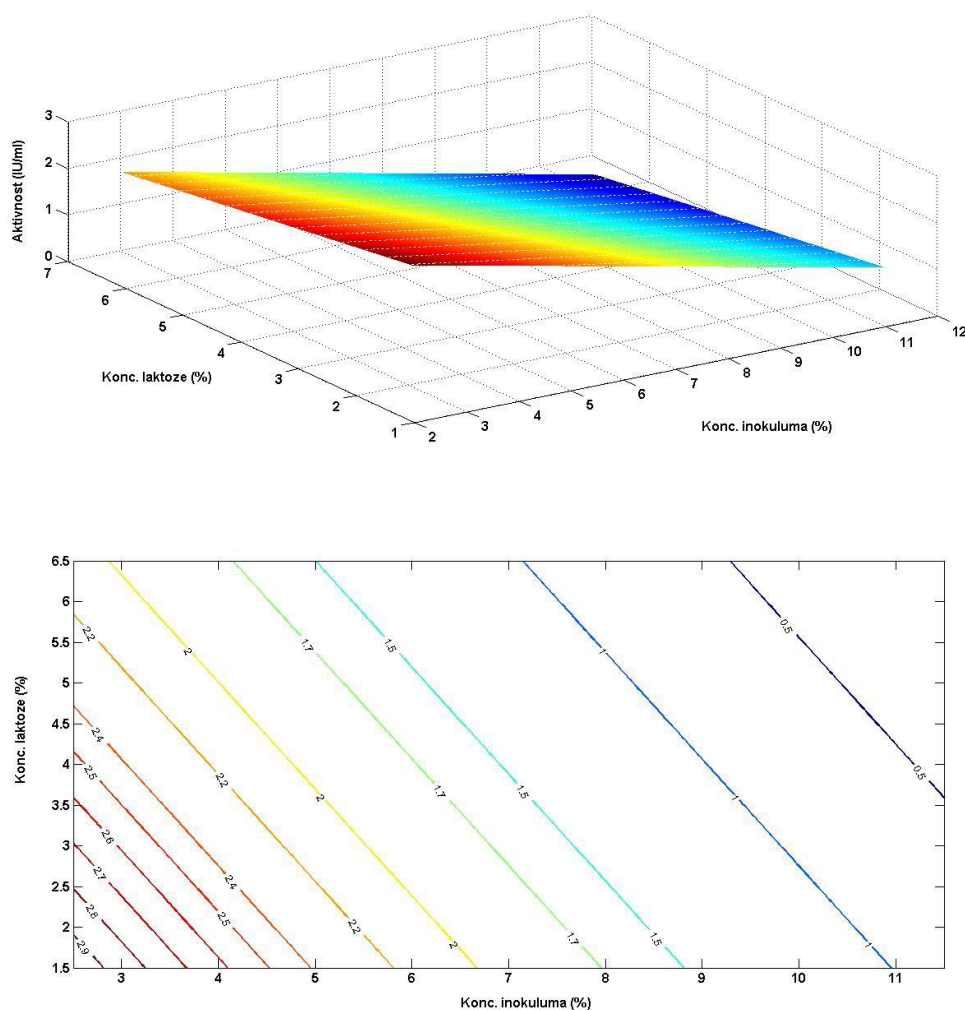
Najveća aktivnost (2,890 IU/ml) je postignuta u eksperimentu 1 pri koncentraciji inokuluma od 2,80%, na temperaturi 26,6 °C, a pri koncentraciji laktoze 1,48%, dok je najmanja aktivnost (0,837 IU/ml) postignuta u eksperimentu br. 10 pri koncentraciji inokuluma 7%, na temperaturi 43,4 °C, a pri koncentraciji laktoze 4%.

Adekvatnost regresionog modela je procenjena primenom Fišerovog testa. Izračunata vrednost ovog parametra za ovaj eksperiment iznosi $F_r=2,12$, dok teorijska vrednost Fišerovog testa za nivo značajnosti 5% iznosi $F_t=4,58$. Pošto je izračunata vrednost manja od teorijske, može se zaključiti da je model adekvatan.

Signifikantnost parametara modela je potom ispitana Studentovim testom, a izračunate vrednosti su upoređene sa tabličnim vrednostima Studentovog testa. Nakon statističke analize ustanovljeno je da su signifikantni koeficijenti regresije: β_0 , β_1 , β_2 , β_3 , β_{11} i β_{12} , odnosno dobijen je regresioni model sledećeg oblika:

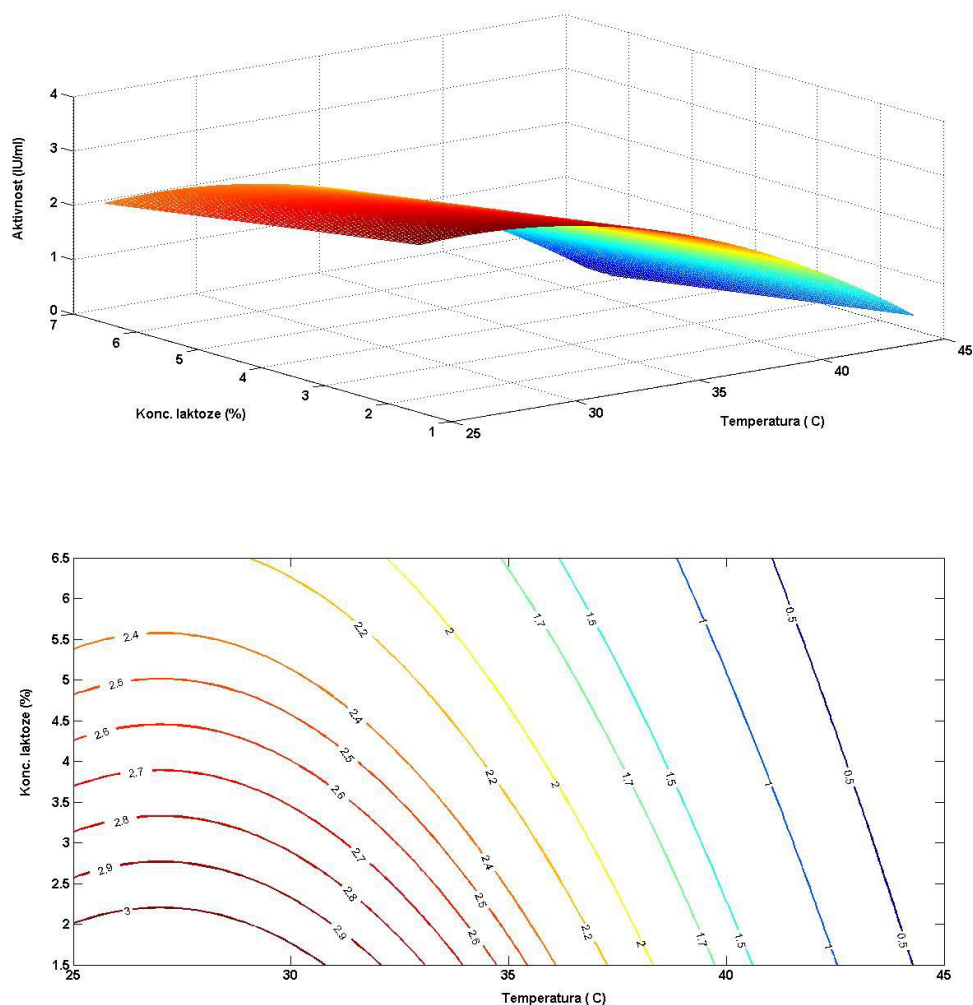
$$Y(IU/ml) = 1,870 - 0,244X_1 - 0,124X_2 - 0,267X_3 - 0,220X_1^2 + 0,230X_1X_2 \quad (4.1.)$$

Kao što se iz jednačine može videti, rezultati Studentovog testa pokazali su da svi linearni regresioni koeficijenti signifikantni, ali i da je signifikantan i kvadratni regresioni koeficijenti β_{11} . Vrednost koeficijenta β_{12} ukazuje na postojanje pozitivne interakcije između koncentracije inokuluma i temperature.



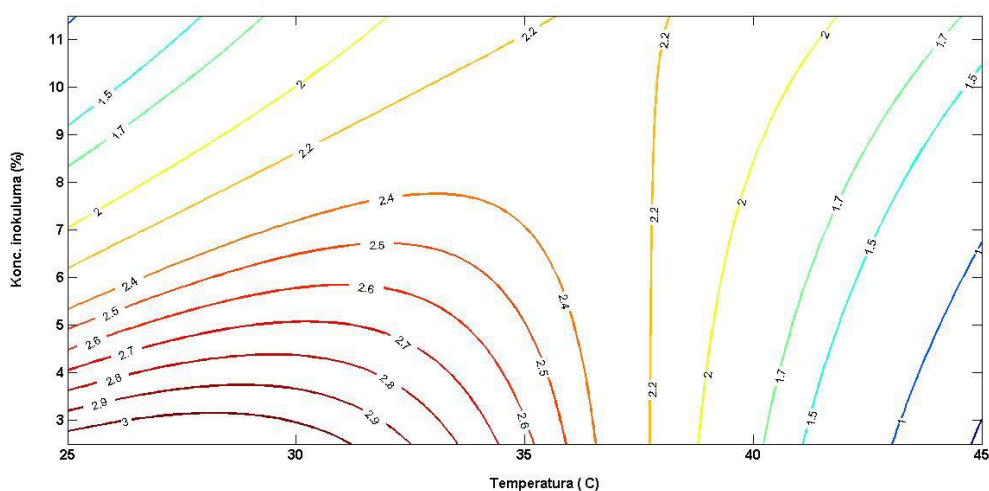
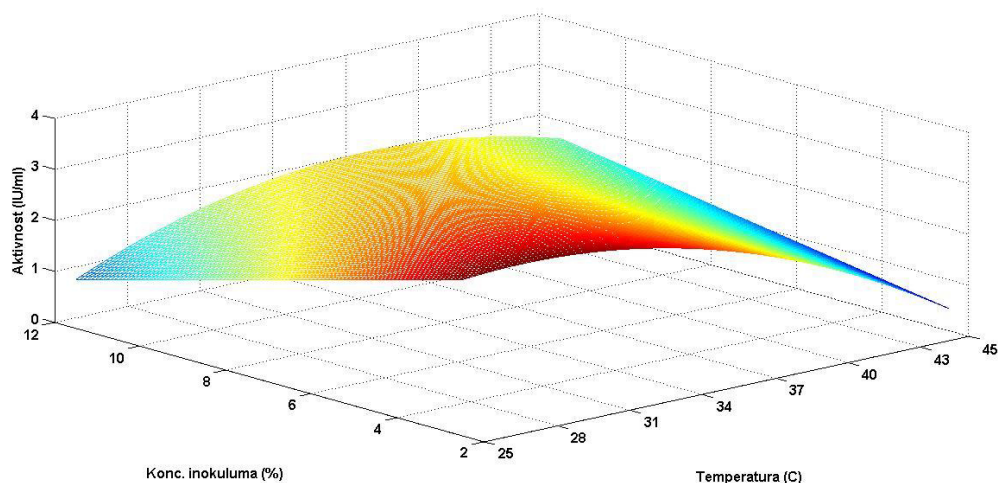
Slika 4.6. Uticaj koncentracije laktoze i koncentracije inokuluma na ukupnu produkovanu aktivnost β -galaktozidaze ($X_1=0$)

Uticaji parova faktora na prinos aktivnosti enzima su ilustrovani dijagramima odzivnih površina i konturnim dijagramima. Koeficijent β_{11} uz kvadratni član ima negativnu vrednost (-0,220) što znači da se uticaj temperature može opisati kvadratnom funkcijom sa maksimumom. Ovo se može uočiti na slikama 4.7 i 4.8.



Slika 4.7. Uticaj temperature i koncentracije laktoze na ukupnu produkovanu aktivnost β -galaktozidaze ($X_2=-2$)

S druge strane, koncentracija inokuluma i koncentracija laktoze imaju samo negativne linearne koeficijente pa prinos enzimske aktivnosti linearno opada sa povećanjem ova dva eksperimentalna faktora. Interesantno je i da postoji i pozitivna interakcija između dva faktora: temperature i koncentracije inokuluma.



Slika 4.8. Uticaj temperature i koncentracije inokuluma na ukupnu produkovanu aktivnost β -galaktozidaze ($X_3=0$)

Na grafiku 49. se iz tog razloga može uočiti pomeranje temperaturnog optimuma. Pri najnižim vrednostima koncentracije inokuluma temperaturni optimum je na 28 °C, dok se povećanjem koncentracije inokuluma temperaturni optimum pomera ka značajno višim vrednostima.

Kada se sumiraju ovi rezultati može se izvesti zaključak da su u posmatranom opsegu optimalni uslovi za postizanje visoke produkovane aktivnosti β -galaktozidaze: koncentracija inokuluma 2,8%, koncentracija laktoze 1,48% i temperatura 28 °C.

4.1.5.2. Uticaj parametara fermentacija na specifičnu aktivnost β -galaktozidaze

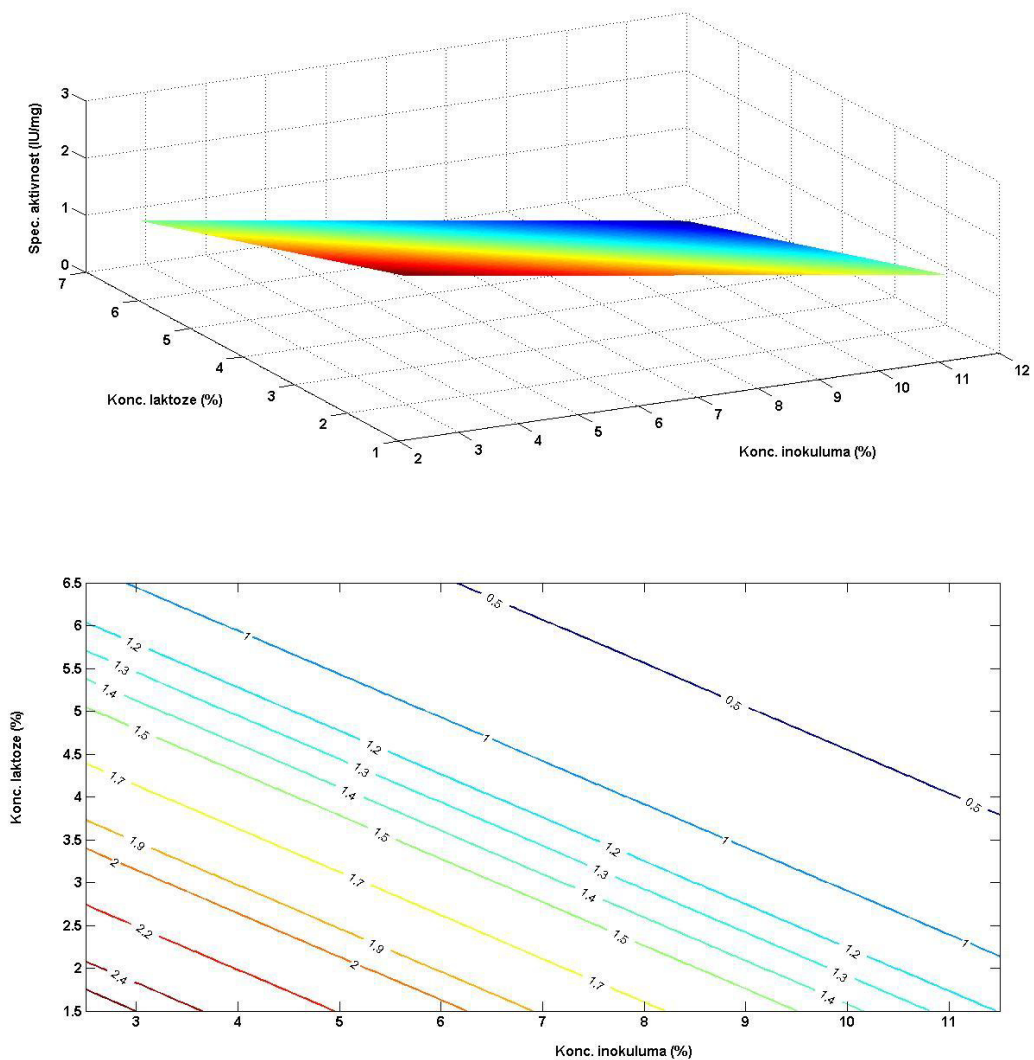
Najveća specifična aktivnost (2,419 IU/mg proteina) takođe je postignuta u eksperimentu 1. pri koncentraciji inokuluma od 2,80%, na temperaturi 26,6 °C, a pri koncentraciji laktoze 1,48%, dok je najmanja aktivnost (0,352 IU/mg proteina) postignuta u eksperimentu 10 pri koncentraciji inokuluma 7%, na temperaturi 43,4 °C, a pri koncentraciji laktoze 4%.

Izračunata vrednost Fišerovog testa za ovaj eksperiment iznosi 1,76, što je takođe manje od teorijske vrednosti Fišerovog testa za dati nivo značajnosti (4,58). Shodno tome, može se zaključiti da je i ovaj model adekvatan. Signifikantnost parametara modela, kao u i prethodnom delu, ispitana je Studentovim testom, a izračunate vrednosti su upoređene sa tabličnim vrednostima. Nakon što je određeno da su signifikantni koeficijenti regresije: $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_{11}, \beta_{12}$ i β_{13} , dobijen je regresioni model sledećeg oblika:

$$Y(\text{IU/mg proteina}) = 0,993 - 0,237 \cdot X_1 - 0,110 \cdot X_2 - 0,185 \cdot X_3 - 0,085 \cdot X_1^2 + 0,137 \cdot X_1 \cdot X_2 + 0,135 \cdot X_1 \cdot X_3 \quad (4.2.)$$

Rezultati Studentovog testa pokazuju da su svi linearni regresioni koeficijenti signifikantni i da je pri tom signifikantan i kvadratni regresioni koeficijenti β_{11} . Vrednosti koeficijenata β_{12} i β_{13} ukazuju na postojanje pozitivne interakcije između koncentracije inokuluma i temperature, i koncentracije laktoze i temperature, respektivno.

Uticaji parova faktora na produkovanju specifičnu aktivnost enzima ilustrovani trodimenzionalnim dijagramima odzivnih površina (slike 4.9-4.11). Koeficijent β_{11} uz kvadratni član ima negativnu vrednost (-0,085) što znači da se uticaj temperature može opisati kvadratnom funkcijom sa maksimumom. Ovo se može uočiti na slikama 4.10 i 4.11.

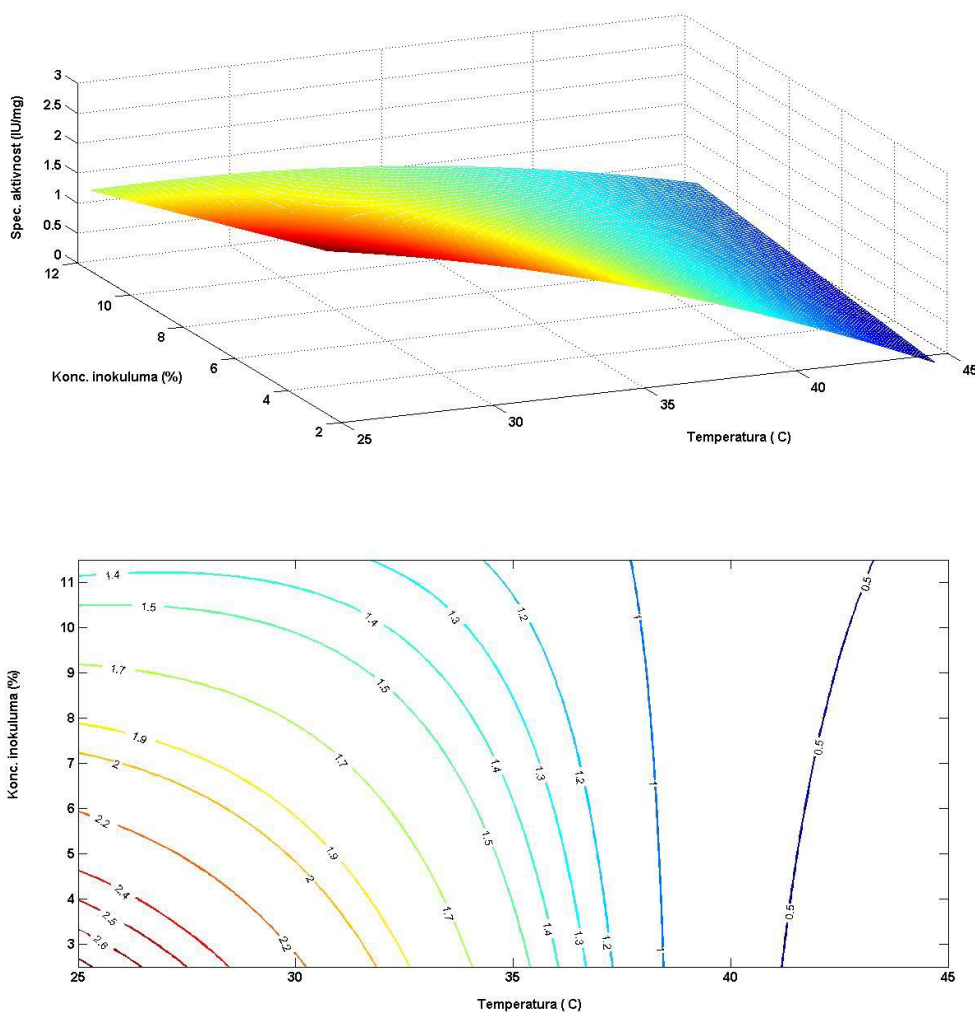


Slika 4.9. Uticaj koncentracije laktoze i koncentracije inokuluma na specifičnu aktivnost β -galaktozidaze ($X_1=0$)

S druge strane, koncentracija inokuluma i koncentracija laktoze imaju samo negativne linearne koeficijente, pa prinos specifične enzimske aktivnosti linearno opada sa povećanjem ova dva eksperimentalna faktora.

Kada je reč o interakciji između različitih faktora, postoji pozitivna interakcija između: temperature i koncentracije inokuluma, kao i temperature i koncentracije laktoze. Na slici 4.10 se iz tog razloga može uočiti pomeranje temperaturnog optimuma. Pri najnižim vrednostima koncentracije inokuluma temperaturni optimum je na najnižoj temperaturi u posmatranom intervalu (25 °C), dok se

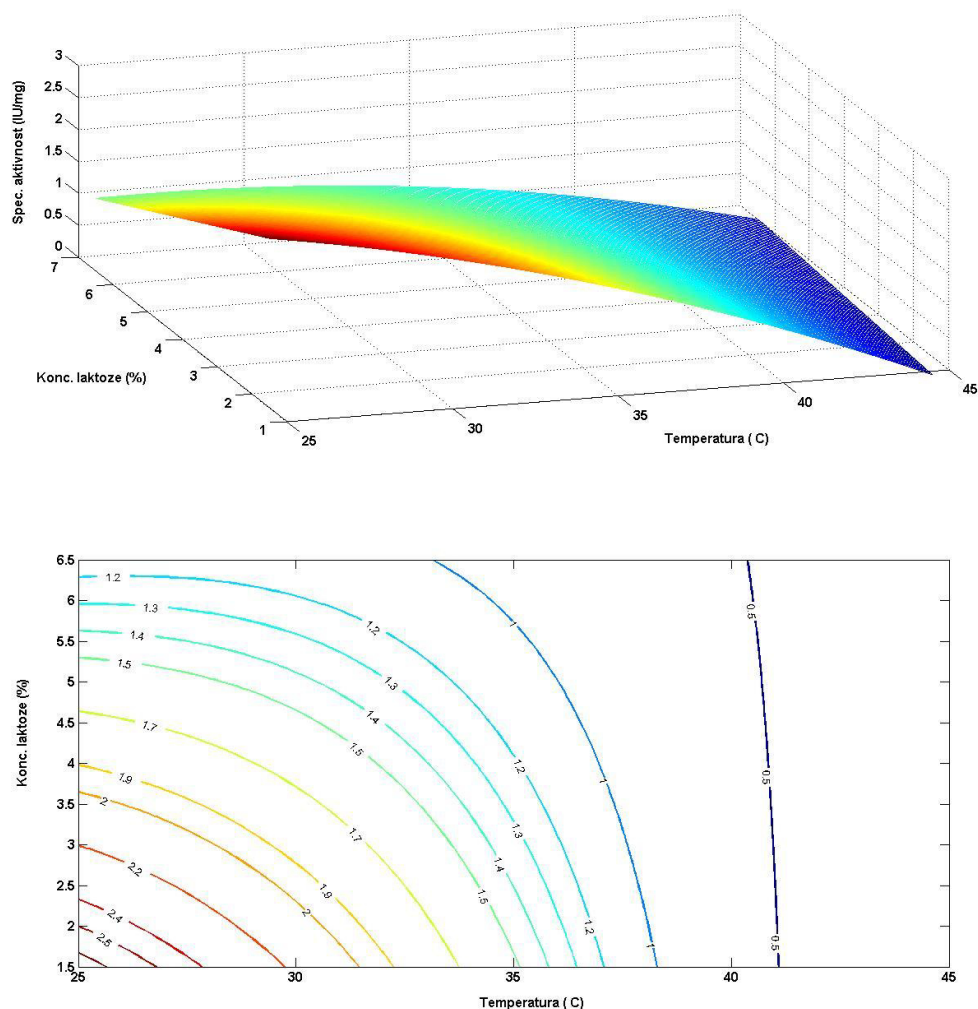
povećanjem koncentracije inokuluma temperaturni optimum pomera ka značajno višim vrednostima (37 °C).



Slika 4.10. Uticaj temperature i koncentracije inokuluma na specifičnu aktivnost β -galaktozidaze ($X_3=0$).

Slično, na slici 4.11 se može uočiti da je pri najnižim vrednostima koncentracije laktoze temperaturni optimum na 25 °C, a da se sa povećanjem koncentracije laktoze pomera ka višim vrednostima (oko 35 °C).

Kada se sumiraju ovi rezultati može se izvesti zaključak da su u posmatranom opsegu optimalni uslovi za postizanje visoke intracelularne specifične aktivnosti β -galaktozidaze, kao i u prethodnom slučaju koncentracija inokuluma 2,8%, koncentracija laktoze 1,48%, a pogoduje nešto niža temperatura od 25 °C.



Slika 4.11. Uticaj temperature i koncentracije laktoze na specifičnu aktivnost β -galaktozidaze ($X_2=0$)

Očigledno su optimalne vrednosti ispitivanih faktora su vrlo slične sa aspekta obe izlazne veličine. Ispitivanje uticaja faktora na specifičnu aktivnost je pokazalo da rast temperature pokazuje puno intenzivnije smanjenje prinosa, nego kada je ispitivan uticaj na ukupnu produkovanu aktivnost, verovatno zato što se na višim temperaturama produkuju i ekstrahuju bolje ostali intracelularni proteini *L. acidophilus*, pa nadalje treba izbegavati temperature kultivacije više od 28 °C. U cilju ocene adekvatnosti modela, izveden je dodatan eksperiment pod optimalnim vrednostima ispitivanih parametara: temperatura (28 °C), koncentracija inokuluma (2,8%) i koncentracija laktoze (1,48%). Ukupna proizvedena aktivnost β -galaktozidaze u ovom eksperimentu iznosila je 3,12 IU/ml, što predstavlja

odstupanje rezultata manje od 5% od predviđenih vrednosti, pa se stoga može zaključiti da model obezbeđuje dobro predviđanje.

4.1.6. Ekstrakcija intracelularne aktivnosti

Budući da su rezultati preliminarnih eksperimenata pokazali da se značajna aktivnost β -galaktozidaze može isključivo izolovati iz unutrašnjosti ćelija *L. acidophilus*, u sledećoj seriji eksperimenata fokus je bio na odabiru adekvatne metode i optimizaciji procesa izolovanja enzima. Ovom segmentu rada posvećena je naročita pažnja, pa je izvedena opsežna studija koji obuhvata širok izbor metoda koje su poređene sa aspekta efikasnosti, odnosno prinosa aktivnosti dobijenog enzima, ali i smanjenja različitih primesa u dobijenim enzimskim preparatima. Metode obuhvaćene ovom studijom, u najširem smislu, možemo podeliti na mehaničke, nemehaničke (fizičke, hemijske, enzimske) i kombinovane metode.

4.1.6.1. Hemijska ekstrakcija β -galaktozidaze

Ćelijski zid mikroorganizama može biti permeabilizovan velikim brojem različitih hemijskih jedinjenja (antibioticima, helirajućim sredstvima, haotropnim sredstvima, deterdžentima, organskim rastvaračima, hidroksidima i hipohloritima),^{141, 142} koje se međusobno razlikuju po selektivnosti i efikasnosti prema različitim vrstama. Korišćenje organskih rastvarača je široko primenjeno u permeabilizaciji kvasca i nekih bakterijskih ćelija za izolovanje β -galaktozidaze^{154, 163, 167, 305-307}. Ipak, izveštaji o uspešnoj permeabilizaciji Gram pozitivnih bakterija su veoma oskudni, imajući u vidu izuzetan otpor permeabilizaciji koji pruža debeo sloj peptidoglukana.^{167, 306, 307} U ovom radu isprobani su različiti organski rastvarači: toluen, etanol, aceton, kao i hloroform u kombinaciji sa natrijum-dodecilsulfatom (SDS). Primenjeni rastvarači, njihove koncentracije, kao i dužina trajanja i uslovi permeabilizacije odabrani su na osnovu podataka iz relevantne literature.^{167, 306} U prvom eksperimentu ispitan je toluen (2% v/v), kao najčešće korišćeno sredstvo za permeabilizaciju ćelija. Toluena dovodi do rastvaranja fosfolipidnih membrana i kao takav pokazao se kao jako efikasno sredstvo za permeabilizaciju kvasaca, ali i pojedinih bakterija. Međutim, aktivnost enzima

nakon tretmana toluenom nije detektovana ni u ćelijskom ekstraktu, ni u suspenziji ćelija. Potom, ispitana je permeabilizacija ćelija etanolom i acetonom (40% v/v). Iako su ovi organski rastvarači dali izuzetno dobre rezultate u radu sa *L. plantarum*³⁰⁶, kao i sa *S. termophilus*,¹⁶⁷ u našem radu aktivnost nije detektovana. Na samom kraju ovog eksperimenta ispitano je i delovanje hloroforma u kombinaciji sa nejonskim deterdžentom SDS-om, čija je funkcija bila da potpomogne ekstrakciju enzima denaturišući proteine membrane i omogućavajući time lakši transport molekula kroz membranu.³⁰⁷ Kao ni u prethodnim slučajevima, ova metoda nije dala očekivane rezultate, pe aktivnost nije detektovana ni unutar ćelija ni u ćelijskom ekstraktu.

4.1.6.2. Enzimska ekstrakcija β -galaktozidaze

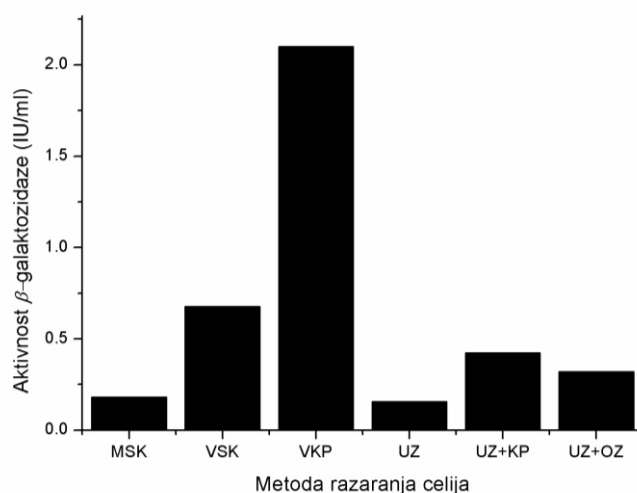
Enzimski liza ćelija predstavlja specifičnu i blagu metodu za razaranje ćelija, pa je kao takva jako primenljiva na laboratorijskom nivou. U našoj studiji primenili smo komercijalni lizozim iz ljuske jajeta, koji je ujedno i načerće korišćeni enzim za lizu ćelija, a čija je učinkovitost najizraženija upravo kod Gram pozitivnih bakterija. Ovaj enzim razlaže β -1,4 veze između N-acetil-muraminske kiseline i N-acetil-D-glukozamina prisutne u peptidoglukanskom sloju, usled čega dolazi do degradacije peptidoglukanske sturkure, čime se povećava propustljivost ćelijskog zida i omogućava ekstrakcija intracelularnog sadržaja, u našem slučaju enzima β -galaktozidaze. Primenom ove metode izolovana aktivnost β -galaktozidaze iznosila je 0,608 IU/ml, dok je specifična aktivnost bila 0,122 IU/mg proteina.

4.1.6.3. Mehaničke metode ekstrakcije β -galaktozidaze

Za razliku od prethodnih, mehaničke metode za razaranje ćelije, obuhvataju skup nespecifičnih metoda čiji je opšti princip izlaganje ćelija visokom stresu koji može biti posledica kavitacije, trenja, sudaranja ili pak njihove kombinacije.¹⁴² U našem radu koristili smo dva principa: razaranje upotrebom abrazivnih sredstava i ultrazvučno razaranje.

U toku ispitivanja ćelijskog razaranja upotrebom abrazivnih sredstava koristili smo dve vrste abrazivnih sredstava: kvarcni pesak (150 μm) i staklene kuglice (30 μm). Kvarcni pesak se pokazao kao znatno efektivnije sredstvo (2,1 IU/ml) u odnosu na staklene kuglice (0,678 IU/ml). Takođe, različiti tipovi mehaničkih sila su primenjeni u cilju ispitivanja uticaja jačine trenja između abraziva i suspenzije ćelija. Naime, oko 4 puta veća aktivnost β -galaktozidaze dobijena je putem vorteksiranja ćelijske suspenzije sa abrazivnim sredstvima, nego mlevenjem u avanu, pod identičnim uslovima. Kombinovanjem korišćenja abraziva sa metodom ultrazvučne dezintegracije, oslobođena aktivnost β -galaktozidaze iznosila je 0,322 IU/ml.

Mehaničke i kombinovane metode koje nisu uključivale upotrebu abraziva bile su, međutim, manje efikasne. Tako je upotrebom ultrazvučne dezintegracije dobijena aktivnost 0,157 IU/ml, a kombinacijom metode uzastopnog zamrzavanja i odmrzavanja i ultrazvučne dezintegracije dobijena je aktivnost od 0,245 IU/ml.



*Slika 4.12. Uticaj različitih mehaničkih metoda na oslobađanje intracelularne β -galaktozidaze iz *L. acidophilus*: MSK-mlevenje u avanu sa staklenim kuglicama, VSK-vorteksiranje sa staklenim kuglicama, VKP- vorteksiranje sa kvarcnim peskom, UZ- razaranje u ultrazvučnom kupatilu, UZ+KP- razaranje u ultrazvučnom kupatilu u prisustvu kvarcnog peska, UZ+OZ- metoda uzastopnog odmrzavanja i zamrzavanja u ultrazvučnom kupatilu.*

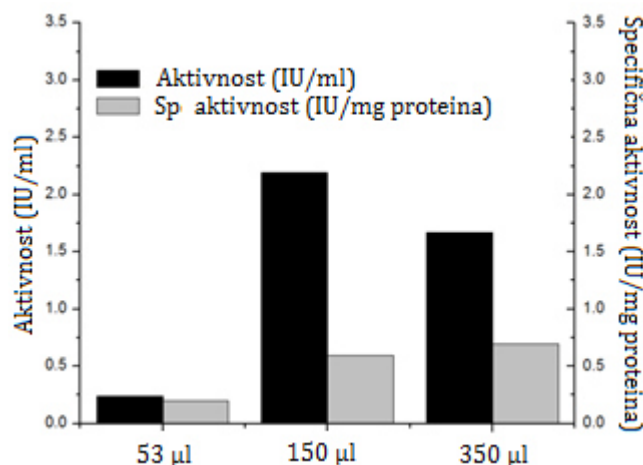
Imajući u vidu dobijene rezultate, može se zaključiti da su značajno veći prinosi aktivnosti dobijeni korišćenjem mehaničkih metoda, što je u skladu sa rezultatima brojnih studija koje ukazuju superiornost mehaničkih metoda kada je izolovanje

intracelularnih enzima iz bakterija mlečne kiseline u pitanju ^{142, 150}. Naime, osnovni uslov za efikasno izolovanje intracelularnih enzima je da metode treba da budu dovoljno robusne da se integritet ćelijskog zida naruši i samim tim omogući neometano oslobađanje intracelularnih enzima, ali u isto vreme dovoljno blage da se što više sačuva aktivnost enzima ¹²⁷. U skladu sa ovim zahtevima, moguće je objasniti relativno slabe rezultate postignute ultrasonikacionim metodama. Naime, moguće je da je došlo do nepotpunog razaranja ćelijskog zida, što dalje ne omogućava slobodan prolaz enzima, kao i inaktivacijom enzima usled prevelikog zagrevanja suspenzije i potencijalnog nastanka slobodnih radikala. Slični rezultate objavili su Buri i saradnici, koji su ispitivali efikasnost metoda razaranja *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* u cilju dobijanja β -galaktozidaze. U njihovom radu, mlevenje kuglicama i primena homogenizatora visokog pritiska dale su uporedive rezultate, dok je ultrazvučna metoda bila najmanje efikasna. Isto tako, Dagbagli i Goksungur našli su da je ultrazvučna metoda mnogo manje efikasna od metode mlevenja staklenim kuglicama ¹²⁷. Treba istaći da je ovakav rezultat vrlo pogodan sa aspekta *scale-up*-a procesa proizvodnje ovog enzima pošto su ultrazvučne metode teško izvodljive na industrijskom nivou, dok je mlevenje ćelija pomoću abrazivnih sredstava u mlinovima sa odbojnicima široko prihvaćena metoda razaranja ćelija na industrijskom nivou, koja je generalno poznata kao efikasnija za razaranje Gram pozitivnih bakterija od homogenizatora.¹⁴¹

Pošto je razaranje ćelija vorteksiranjem sa kvarcnim peskom dala najbolje rezultate u preliminarnom eksperimentu, pri uslovima odabranim na osnovu literaturnih podataka, u nastavku rada izvršena je dodatna optimizacija parametara procesa, imajući u vidu da na proces razaranja utiču brojni faktori kao što su: brzina mešanja, količina abrazivnog sredstva, veličina abrazivnog sredstva, vreme razaranja. ³⁰⁸

U prvom setu eksperimenata ispitan je uticaj veličine abrazivnih čestica na prinos aktivnosti, jer je izbor veličine čestica od izuzetne važnosti za efikasnost procesa razaranja. ³⁰⁹ Pri izboru veličine čestica, najvažniju ulogu imaju vrsta mikroorganizama i pozicija enzima unutar ćelije. Za razaranje bakterijskih ćelija obično se koriste čestice prečnika 100-150 μ m na laboratorijskom nivou, međutim

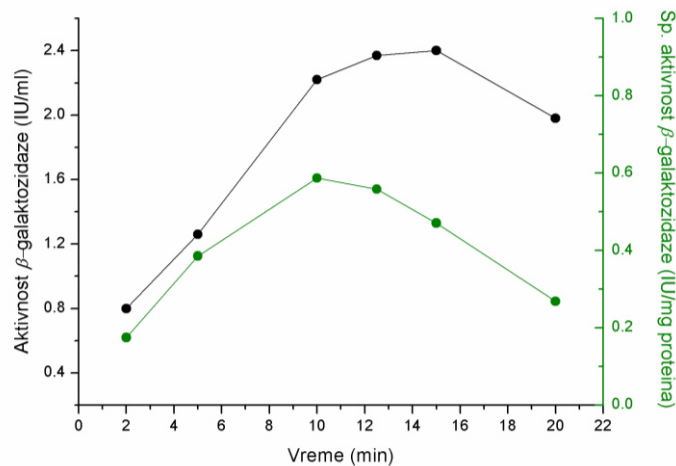
u industrijskim uslovima, u cilju olakšanja procesa separacije mogu se koristiti i čestice 400-600 μm .¹⁴² Generalno, brže i efikasnije razaranje se postiže upotrebom čestica manjeg prečnika, ali to često dovodi do prekomernog zagrevanja smeše što iziskuje hlađenje u toku rada.



Slika 4.13. Uticaj veličine čestica kvarcnog peska na produkovanu aktivnost (IU/ml) i specifičnu aktivnost (IU/mg proteina)

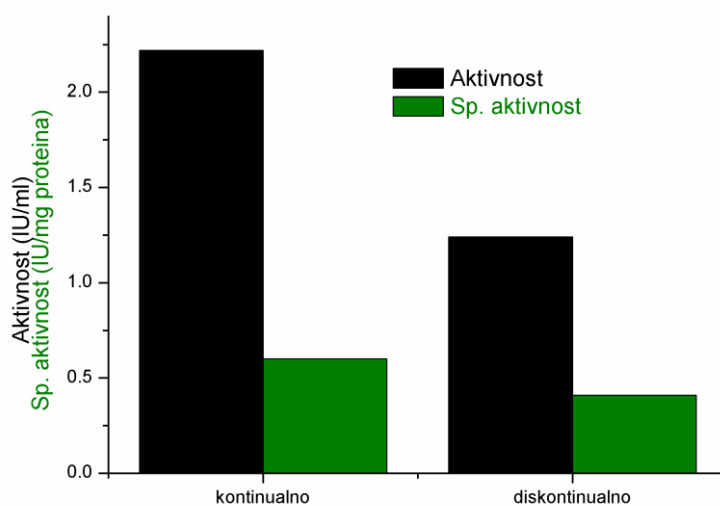
U ovom eksperimentu korišćene su čestice kvarcnog peska prečnika 53 μm , 150 μm i 350 μm , a eksperimenti su izvedeni pod jednakim ostalim uslovima. Kao rezultat ovih eksperimenata merene su dve veličine: aktivnost β -galaktozidaze (IU/ml) i specifična aktivnost (IU/mg proteina), kao pokazatelj specifičnosti razaranja. Kao što se sa slike 4.13 može videti, sa aspekta oslobođene aktivnosti, najefikasnije razaranje postignuto je sa česticama kvarcnog peska od 150 μm (2,25 IU/ml), dok je sa aspekta oslobođene specifične aktivnosti neznatno efikasnija metoda sa česticama od 300 μm (0,695 IU/mg proteina). Međutim, kako razlike u oslobođenoj specifičnoj aktivnosti zanemarljive, odličili smo se za dalju upotrebu čestica prečnika 150 μm , jer je oslobođena aktivnost β -galaktozidaze znatno veća.

Preliminarni eksperimenti razaranja ćelija su podrazumevali vorteksiranje ćelijske suspenzije u prisustvu kvarcnog peska kao abrazivnog sredstva u trajanju od 10 minuta. Međutim, poznato je da efektivnost razaranja u mnogome zavisi od vremena trajanja (kontinualni proces) ili broja ciklusa (šaržni proces) u procesu razaranja. Stoga, varirali smo vreme trajanja vorteksiranja u intervalu 2-20 min, sa ciljem određivanja optimalne dužine procesa razaranja.



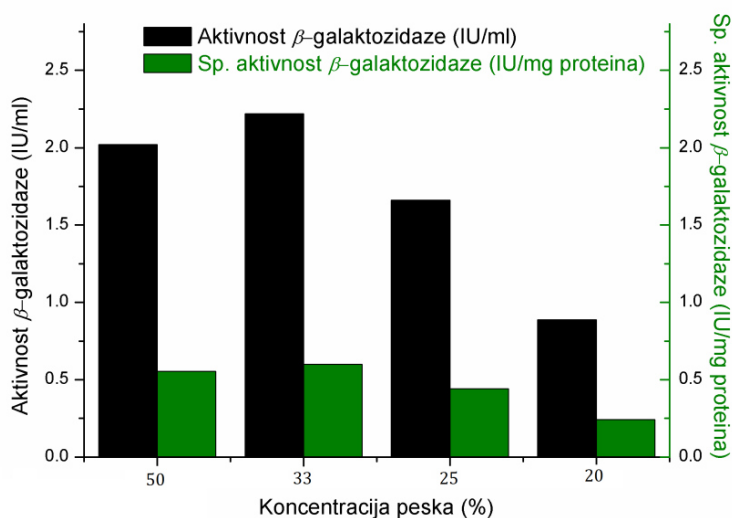
Slika 4.14. Uticaj dužine trajanja procesa razaranja ćelija na oslobođenu aktivnost (IU/ml) i specifičnu aktivnost (IU/mg proteina)

Kako bismo ocenili efikasnost razaranja, pratili smo, kao i u prethodnim eksperimentima oslobođenu aktivnost i specifičnu aktivnost β -galaktozidaze. U toku prvih 10 minuta primećen je nagli rast oslobođene aktivnosti, kao i specifične aktivnosti enzima. Nakon daljeg povećanja trajanja razaranja aktivnost neznatno raste do 15 minuta, nakon čega sledi nagli pad, dok se kod specifične aktivnosti pad javlja već nakon 10 minuta razaranja. Shodno ovim rezultatima, usvojena je dužina trajanja procesa vorteksiranja od 10 minuta.



Slika 4.15. Uticaj načina izvođenja procesa razaranja ćelija na oslobođenu aktivnost (IU/ml) i specifičnu aktivnost enzima (IU/mg enzima)

Primenjeni metod podrazumevao je kontinualan proces razaranja ćelija, pa je u sledećem koraku optimizacije ispitan i diskontinualan proces koji je podrazumevao 10 ciklusa (1 minut) razaranja, sa hlađenjem u ledenom kupatilu između svakog ciklusa. Kako u toku procesa razaranja dolazi do oslobađanja velike količine toplote, što može dovesti do inaktivacije enzima, proces hlađenja bi trebalo da doprinese očuvanju aktivnosti enzima. Međutim, u slučaju ispitanog diskontinualnog procesa oslobođena aktivnost je bila značajno manja (skoro upola), dok je specifična aktivnost bila neznatno manja. Ovakvi rezultati ukazuju na to da u kontinualnom procesu nije došlo do značajnog oslobađanja toplote što bi moglo da utiče negativno na aktivnost enzima, već je taj uticaj izražen tek nakon tretmana dužih od 15 min (Slika 4.15).



Slika 4.16. Uticaj odnosa kvarcnog peska i suspenzije ćelija na na oslobođenu aktivnost (IU/ml) i specifičnu aktivnost (IU/mg proteina)

Tokom procesa razaranja efikasnost razaranja raste sa povećanjem koncentracije čestica abrazivnog sredstva zahvaljujući izraženijoj interakciji između čestica. Ovo, međutim, utiče i na povećanje oslobođene toplote, što dalje nepovoljno utiče na aktivnost oslobođenog enzima, jer dolazi do termalne denaturacije enzima. U našem eksperimentu je utvrđeno da je optimalna koncentracija kvarcnog peska (150 μ m) 33% (w/v) kvarcnog peska u smeši.

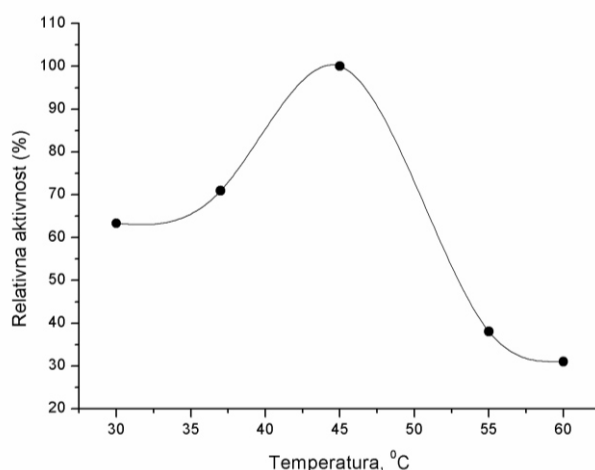
Shodno dobijenim rezultatima u nastavku eksperimentalnog rada primenjeni su usvojeni optimalni uslovi: razaranje se vrši vorteksiranjem 10 minuta u prisustvu 33% kvarcnog peska (150 μm).

4.1.7. Karakterizacija β -galaktozidaze iz *L. acidophilus*

Jedan od osnovnih zahteva pri odabiru enzima za primenu u određenim reakcijama jeste utvrđivanje karakteristika enzima, poput pH i temperaturnog optimuma, kao i stabilnosti za date parametre sredine. Na osnovu poznavanja ovih podataka moguće je izvršiti pravilan odabir enzima, kao i optimizaciju željenog procesa. Kao što je već rečeno, karakteristike β -galaktozidaza mogu varirati u širokim intervalima u zavisnosti od porekla.

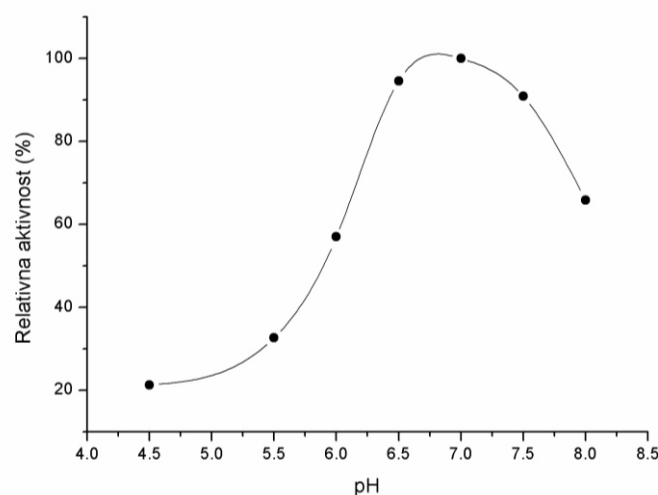
4.1.7.1. Temperaturni i pH optimum enzima

Temperatura ima izražen uticaj na brzinu enzimskih reakcija. Naime, utiče na brzinu razlaganja enzim-supstrat kompleksa na slobodan enzim i proizvode reakcija, tj. na konstantu brzine reakcije. Potom, utiče na afinitet enzima prema supstratu, odnosno na specifičnost enzima, ali i na stepen disocijacije svih komponenata u reakcionoj smeši. Sa druge strane, 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.⁵⁵



Slika 4.17. Zavisnost aktivnosti enzima od temperature

Imajući ovo u vidu, kriva temperaturnog profila enzima predstavlja kompleksnu sumarnu krivu koja opisuje efekte temperature na veliki broj različitih faktora. Na slici 4.17 prikazan je temperaturni profil dobijene β -galaktozidaze iz *L. acidophilus*. Sa slike se jasno vidi da je optimalna temperatura ovog enzima 45 °C. Ovakav rezultat je u skladu sa literaturnim podacima o optimalnoj temperaturi β -galaktozidaza iz bakterija mlečne kiseline (40-55 °C).³ Ngujen (Nguyen) i saradnici su odredili da optimalna temperatura β -galaktozidaze iz *L. acidophilus* R22 iznosi 55 °C za reakcije hidrolize laktoze i *o*-NPG.²⁹ S druge strane, rezultati koje su objavili Ismail i saradnici su pokazali da je temperaturni optimum oko 40 °C¹³⁴.



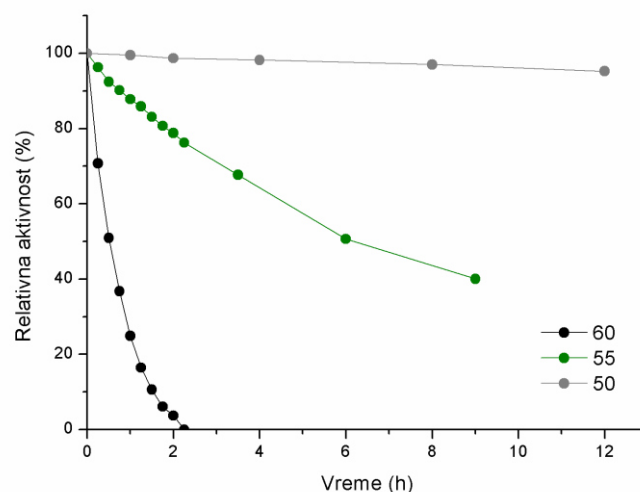
Slika 4.18. Zavisnost aktivnosti enzima od pH

Uticaj pH na aktivnost enzima takođe odražava složeni karakter budući da pH utiče na stanje jonizacije svih učesnika u reakciji (enzima, supstrata, enzim-supstrat kompleksa, aktivatora, inhibitora), a samim tim uticaj na afinitet enzima prema supstratu i na brzinu reakcije. Takođe, u pojedinim reakcijama joni vodonika/hidroksilni joni neposredno učestvuju u enzimskoj reakciji, čime se utiče i na ravnotežni sastav reakcione smeše. 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.

Kada je reč o pH profilu enzima, kao i kod temperature, karakteristike enzima prilično variraju zavisnosti od njihovih izvora. Generalno, β -galaktozidaze mogu biti podeljene u dve grupe na osnovu njihovih pH profila: kisele β -galaktozidaze (najčešće vode poreklo iz plesni) i neutralne β -galaktozidaze (vode poreklo iz kvasaca i bakterija).^{3, 131} Kao što se očekivalo, dobijenu β -galaktozidaza iz *L. acidophilus* je jako aktivna u širokom intervalu pH 6,5-7,5 (aktivnost preko 90% maksimalne aktivnosti), sa optimalnom vrednošću na pH 6,8 (Slika 4.18). Samim tim, ova β -galaktozidaza može se svrstati u grupu neutralnih β -galaktozidaza, što čini ovaj enzim naročito primenljivim za hidrolizu i transgalaktozilaciju laktoze iz mleka i slatke surutke.

4.1.7.2. Temperaturna i pH stabilnost

Pored podataka o vrednostima temperaturnog i pH optimuma, nezavisno od vrste enzimskog procesa, važan kriterijum pri izboru enzima predstavlja i termička i pH stabilnost enzima.



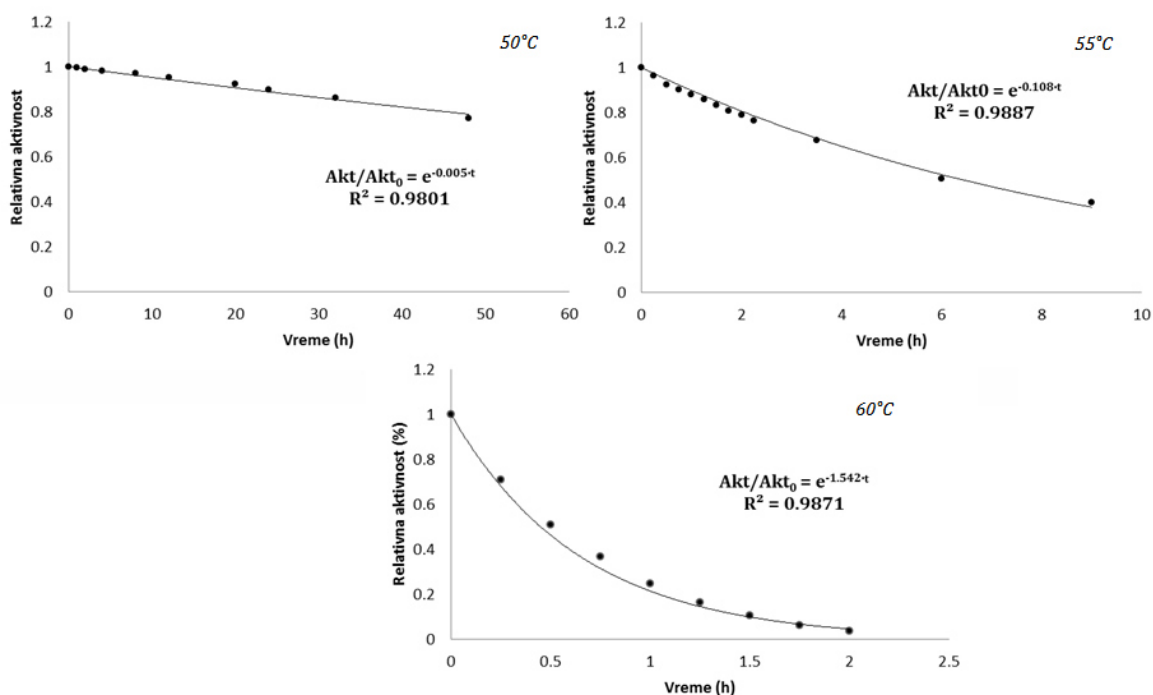
Slika 4.19. Temperaturna stabilnost β -galaktozidaze iz *L. acidophilus*: Zadržana aktivnost u funkciji od vremena za različite temperature: 60 °C (crna), 55 °C (zelena), 50 °C (siva).

Aktivnost je praćena pri pH 7.

Naročito je važna termička stabilnost, uzimajući u obzir da se optimalna temperatura, pri kojoj enzim ima najveću aktivnost, kao i specifičnost, najčešće ne poklapa sa temperaturom pri kojoj je on najstabilniji. Iz dobijenih podataka uočljiv je nagli pad stabilnosti sa porastom temperature u intervalu 50-60 °C. Kao što se sa

grafika vidi, najveću stabilnost (u ispitanom opsegu) enzim pokazuje na temperaturi od 50 °C, gde je i nakon 12 sati aktivnost gotovo nepromenjena. S druge strane, enzim se drastično brže inaktivirao na temperaturi od 60 °C, gde već nakon 2 časa dolazi do potpunog gubitka aktivnosti.

Poznavanje kinetičkog modela inaktivacije enzima je od velikog značaja pri razvoju enzimskog postupka u bioreaktoru jer se ostali uslovi odvijanja enzimske reakcije (protok, temperatura) mogu u kasnijem delu reakcije prilagoditi smanjenju aktivnosti radi potpunog iskorišćenja katalitičke moći enzima. Inaktivacija se obično odigrava u skladu sa kinetikom prvog reda.



Slika 4.20. Kinetički modeli termičke inaktivacije enzima: (a) 50 °C, (b) 55 °C, (c) 60 °C

Odstupanja se javljaju samo kada se tokom inaktivacije enzim transformiše u drugačiju konformaciju koja se dalje inaktivira drugačijom brzinom, što se manifestuje kao višestepena inaktivacija u skladu sa kinetikom prvog reda. Ovakvi slučajevi, međutim, retki su kod slobodnih enzima.

Na slici 4.19 može se primetiti da se inaktivacija β -galaktozidaze iz *L. acidophilus* odigrava u jednom stupnju. Fitovanje eksponencijalnim modelom inaktivacije je dalo dobro slaganje na sve tri ispitivane temperature. Kinetički modeli su prikazani

na slici 4.20, a vrednosti kinetičkih konstanti, poluživota enzima i koeficijenta korelacije su prikazani u tabeli 4.5. Kao što se iz tabele može videti, vremena poluživota dobijenog enzima na 50°C, 55°C i 60 °C su 138,6 h, 6,42 h i 0,45 h, redom. Ovi rezultati su veoma značajni jer pokazuju da dobijeni enzim na optimalnoj temperaturi može biti izuzetno dugo aktivan, za razliku od ranije izolovanih β -galaktozidaza iz *L. acidophilus* koje je vreme poluživota na 45 °C iznosilo 24 h.

Tabela 4.4. Vrednosti konstante inaktivacije enzima (k_d), poluživota enzima ($t_{1/2}$) i odgovarajućih koeficijenata korelacije za različite temperature

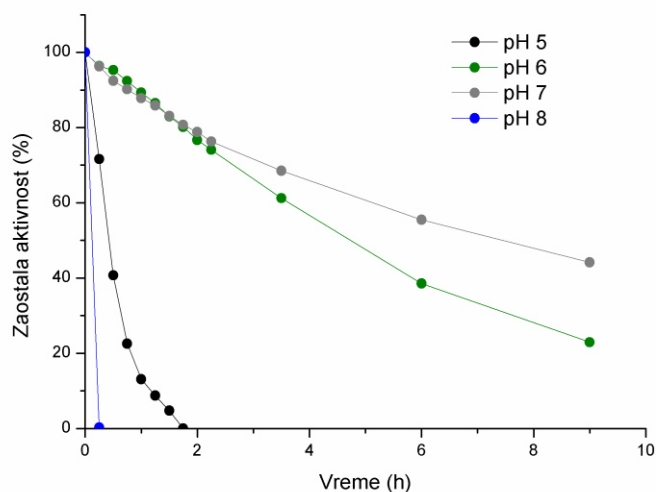
	k_d (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	R ²
50 °C	0,005	138,6	0,9801
55 °C	0,108	6,42	0,9887
60 °C	1,542	0,45	0,9872

Kada se dobijene vrednosti uporede sa literaturnim vrednostima za enzime dobijene pomoću drugih bakterija mlečne kiseline, može se izvući zaključak da se radi o enzimu koji se sporije inaktivira na povišenim temperaturama (55 i 60°C).^{27, 306, 310} Naime, β -galaktozidaza iz *L. bulgaricus* na 37 °C ima vreme poluživota 146 h, ali se pri višim temperaturama 50 °C i 60 °C inaktivira za znatno kraće vreme (vremena poluživota su 0,75 i 0,045 h, redom) pod identičnim uslovima³¹⁰. Slična situacija je i sa β -galaktozidazom iz *L. reuteri*, koja se bez dodavanja stabilizatora inaktivira nakon inkubacije od 2 h na 50 °C.²⁷

Ovaj podatak o stabilnosti enzima na višim temperaturama od izuzetne je važnosti sa aspekta potencijalne primene, prvenstveno u kontroli kotaminacije, ali i favorizovanju reakcije transgalaktozilacije, imajući u vidu da se pri višim temperaturama povećava rastvorljivost laktoze, što dalje pozitivno utiče na prinos galakto-oligosaharida.

Kada je o pH stabilnosti reč, β -galaktozidaza iz *L. acidophilus* pokazuje najbolju stabilnost na pH 7 (nakon osam sati na 55 °C relativna aktivnost je i dalje iznad 50%), što predstavlja i njegovu optimalnu pH vrednost sa aspekta aktivnosti. Umerenu zadržanu aktivnost, ovaj enzim pokazuje na pH 6, međutim, kako se udaljavamo od ove vrednosti stabilnost opada. Na pH 8 enzim se inaktivirao u

potpunosti već nakon 15 minuta, dok se na pH 5 enzim inaktivira za manje od 2 sata.



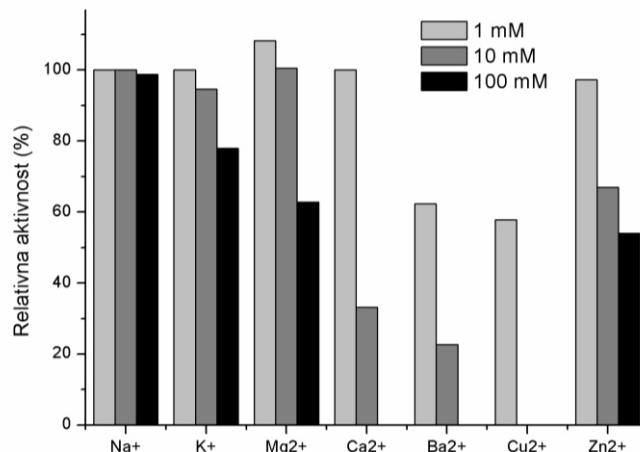
Slika 4.21. pH stabilnost β -galaktozidaze iz *L. acidophilus*: Zaostala aktivnost u funkciji od vremena za različite pH vrednosti: pH 5 (crna), pH 6 (zelena), pH 7 (siva). Aktivnost je praćena na 55 °C.

4.1.7.3. Stabilnost β -galaktozidaze iz *L. acidophilus* u prisustvu različitih jona

Joni metala imaju važnu ulogu u biološkoj funkciji enzima. Oni deluju kao akceptori ili donori elektrona, i dovode do aktivacije ili inhibicije aktivnosti enzima tokom reakcije. Uticaj jona metala praćen je dodavanjem hlorida jona metala (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) u različitim koncentracijama (1 mM, 10 mM i 100 mM).

Kao što se sa slike 4.22 može videti Ca^{2+} , Ba^{2+} i Cu^{2+} imaju izražen inhibitorni efekat na aktivnost β -galaktozidaze iz *L. acidophilus*, naročito Cu^{2+} koji dovodi do potpune inaktivacije enzima već pri koncentraciji od 10 mM, dok se kod ostalih sa povećanjem koncentracije povećava i inhibitorni efekat. Sa druge strane, Mg^{2+} pri niskim koncentracijama dovodi do neznatne aktivacije enzima. Ovakvo ponašanje nije neuobičajeno, imajući u vidu da je jon Mg^{2+} identifikovan unutar aktivnog centra enzima gde dolazi do vezivanja supstrata, analoga supstrata i inhibitora.³¹¹ U radu Ngujen i saradnika posebno su istaknuti joni Mg^{2+} i Mn^{2+} kao aktivatori enzima, čiji uticaj raste sa porastom koncentracije, što u našem radu nije bio slučaj.²⁹ Takođe, bitno je istaći da joni Na^+ nemaju izražen uticaj na aktivnost β -galaktozidaze čak ni pri visokim koncentracijama. Ovaj podatak jako je značajan sa

aspekta potencijalne primene u transgalaktozilacionim reakcijama, gde će biti ispitano dodavanje soli NaCl u cilju smanjenja aktivnosti vode, i samim tim favorizovanjem reakcije transgalaktozilacije u odnosu na reakciju hidrolize.



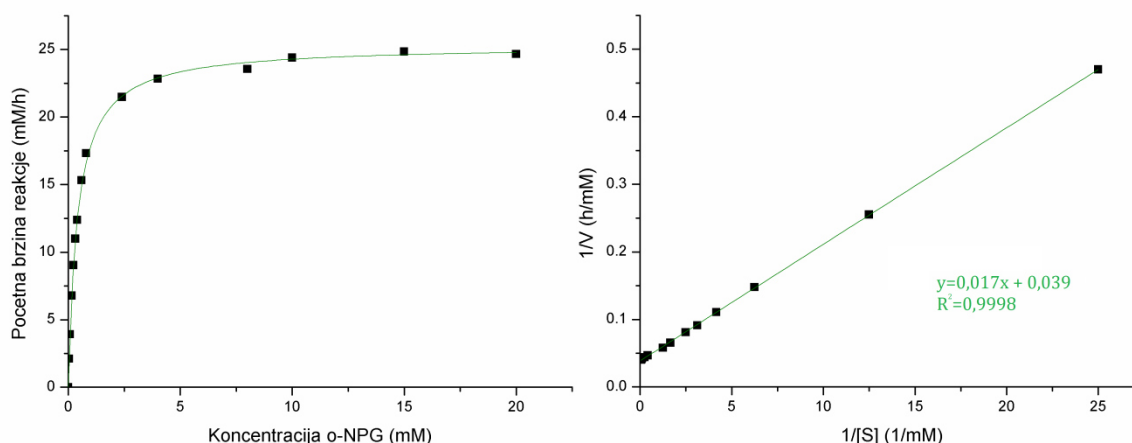
Slika 4.22. Relativna aktivnost enzima nakon inkubacije enzima sa različitim jonima metala

Iako postoji mnoštvo podataka o uticaju različitih jona na aktivnost β -galaktozidaze, tačni mehanizmi inhibicije i aktivacije jonima metala do danas nisu detaljnije objašnjeni.

4.1.7.4. Određivanje kinetičkih parametara

Enzimska kinetika proučava efekat različitih faktora (koncentracije enzima, supstrata, pH, temperature i dr.) na brzinu enzimske reakcije. Osnovni cilj ovakve analize je definisanje zakona brzine reakcije na osnovu koga se može odrediti vreme odigravanja reakcije i prinos pod definisanim uslovima, što omogućava projektovanje enzimskih reaktora i optimizaciju enzimskih procesa. U prvom eksperimentu ispitana je reakcija hidrolize *o*-NPG. Na slici 4.23 prikazana je zavisnost početne brzine reakcije hidrolize od početne koncentracije *o*-NPG, pri čemu je opseg ispitivanih koncentracija 0,1-20 mM bio određen ograničenom rastvorljivošću supstrata. Iz oblika krive koja opisuje ovu zavisnost (početna brzina-koncentracija supstrata) može se videti da reakcija prati klasičnu Mihaelis-Mentenovu kinetiku. Kako bi se odredile vrednosti kinetičkih parametara, u nastavku je konstruisan i Lajnriver-Burkov dijagram (Slika 4.23b). Iz odsečka na y-osi ($1/V_m$) ovog dijagrama može se odrediti vrednost maksimalne brzine V_{max} ,

dok se iz nagiba (K_m/V_{max}) izračunava vrednost Mihaelis-Mentenove konstante, K_m (Jednačina 8.). Brojčane vrednosti ovih parametara za reakciju hidrolize *o*-NPG za β -galaktozidazu iz *L. acidophilus* su 25,64 mM/h i 0,44 mM, redom.

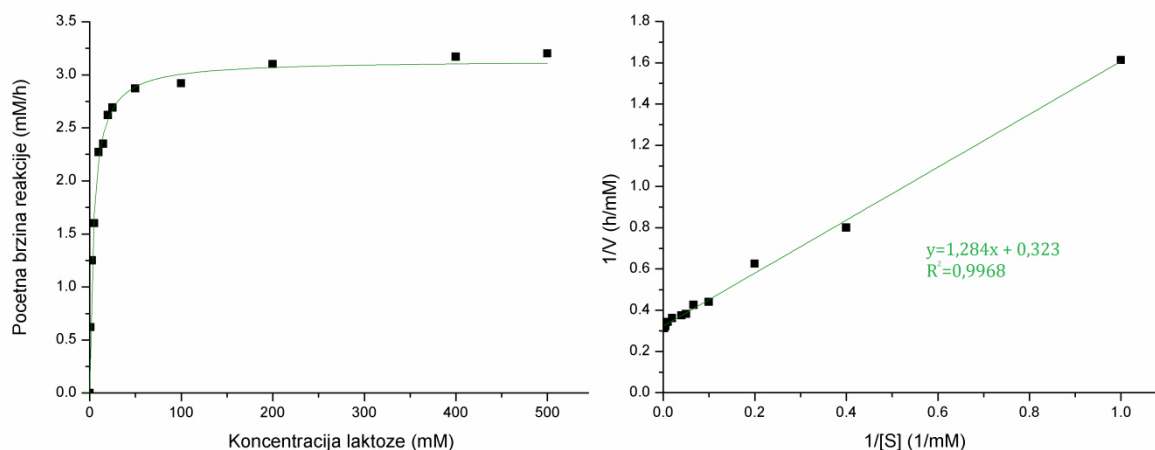


Slika 4.23. Određivanje kinetičkih konstanti za reakciju hidrolize *o*-NPG fitovanjem eksperimentalnih rezultata Mihaelis-Mentenovom jednačinom (a), primenom sekundarnog Lajnriver-Burkovog dijagrama (b)

U narednom eksperimentu određene su vrednosti kinetičkih parametara i za reakciju hidrolize laktoze, na identičan način, a rezultati su prikazani na slici 4.24. U slučaju hidrolize laktoze vrednosti kinetičkih parametara K_m i V_m iznose 3,97 mM i 3,10 mM/h, redom. Slične rezultate za β -galaktozidazu iz *L. acidophilus* prijavili su Ngryen i saradnici, koji su odredili da je vrednost K_m *L. acidophilus* $0,73 \pm 0,07$ mM za *o*-NPG, dok je vrednosti K_m za laktozu $4,04 \pm 0,26$ (mM).²⁹

Na osnovu ovakvih parametara se može zaključiti da dobijena galaktozidaza ima veći afinitet prema *o*-NPG u poređenju sa laktozom. Međutim, bitno je istaći da su vrednosti K_m za laktozu dobijenog enzima znatno niže u poređenju sa drugim bakterijama mlečne kiseline, čije se vrednosti K_m za laktozu kreću u opsegu 10-40 mM,^{24, 27, 31, 108, 310} ili pak drugih komercijalno dostupnih preparata kao što su *A. oryzae* (36-180 mM), *K. fragilis* (15-52 mM) i *K. lactis* (35 mM).³¹² Ovakvi rezultati upućuju na zaključak da dobijeni enzim može imati značajnu primenu u reakciji hidrolize laktoze, u cilju postizanja niskih koncentracija laktoze, što je često nemoguće postići primenom postojećih komercijalnih preparata.^{14, 29} Takođe, u

oba slučaja, može se primetiti da ne dolazi do inhibicije supstratom u višku, što je čest slučaj kod β -galaktozidaza dobijenih pomoću bakterija mlečne kiseline.^{27, 29}

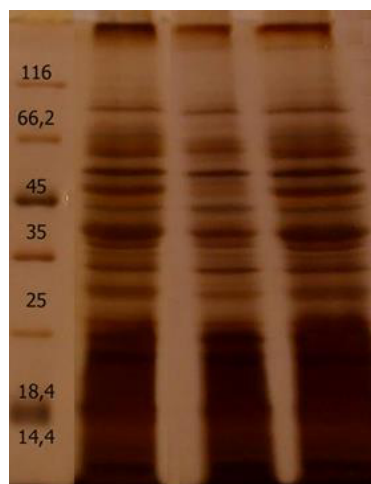


Slika 4.24. Određivanje kinetičkih konstanti za reakciju hidrolize laktoze fitovanjem eksperimentalnih rezultata Mihaelis-Mentenovom jednačinom (a), primenom sekundarnog Lajnviver-Burkovog dijagrama (b)

4.1.7.5. Određivanje molekulske mase enzima

Kao što je ranije istaknuto, β -galaktozidaza iz *L. acidophilus* predstavlja enzim koji se zahvaljujući svom poreklu (*L. acidophilus* ima GRAS status), može neometano koristiti u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji bez primene komplikovanih metoda prečišćavanja, koje dodatno poskupljuju proces produkcije enzima. Stoga, nakon pronalaženja optimalnih uslova za maksimalnu produkciju β -galaktozidaze pokušali smo da prečistimo dobijeni enzim isključivo u cilju njegove karakterizacije, odnosno određivanja veličine molekula enzima. U tu svrhu primenjeno je nekoliko uobičajenih metoda za prečišćavanje enzima: frakciono taloženje amonijum-sulfatom, taloženje etanolom i acetonom, trofazno raslojavanje pomoću *t*-butanola i amonijum sulfata. Međutim, ove metode nisu omogućile valjano prečišćavanje enzima, već su dovele do njegove inaktivacije. Stoga, u nastavku rada primenjene su dve hromatografske metode: jonoizmenjivačka i gel-filtraciona metoda korišćenjem odgovarajućih komercijalnih nosača (DEAE sefaroza i Sefadeks G-150, redom).

U prvom eksperimentu primenjena je jonoizmenjivačka hromatografija. Kako bi bili određeni optimalni uslovi za prečišćavanje, sirovi enzim se nakon podešavanja jonske jačine i pH (dijaliziranjem u 0,1M odgovarajućem puferu pH 3-8), nanošen na DEAE sefarozu, prethodno ekvilibrisanu u odgovarajućem puferu.



Slika 4.25. Elektroforeza prečišćavanja β -galaktozidaze jonoizmenjivačkom hromatografijom na DEAE sefarozi: traka 1- protein markeri, traka 2- sirovi uzorak, traka 3- frakcija koja nije vezana za kolonu, traka 4- desorbovana frakcija sa kolone (prečišćen enzim)

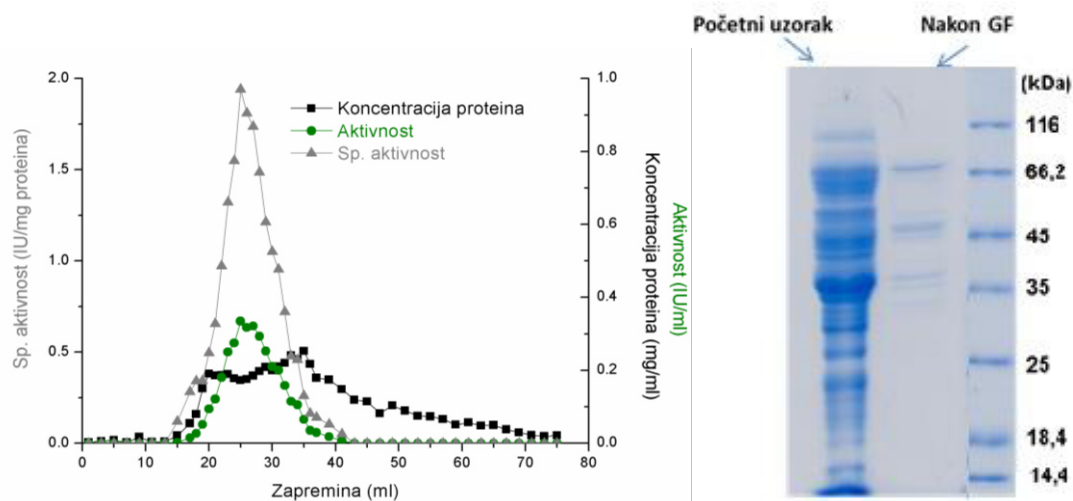
Ispitivanjem pada aktivnosti i proteina u supernatantima, određeno je da se enzim u potpunosti vezao za nosač u 0,1 M natrijum-acetatnom puferu pH 4,5. U narednom koraku enzim je ispran sa nosača upotrebom 1 M rastvora NaCl. Rezultati eluiranih proteina i aktivnosti prikazani su u tabeli 4.6, a elektroforegrami na slici 4.25.

Tabela 4.5. Različite metode prečišćavanje enzima

Faza prečišćavanja	Aktivnost (IU)	Proteini (mg)	Sp.aktivnost (IU/mg prot)	Faktor prečišćavanja	Prinos (%)
sirovi enzim	9,561	8,775	1,09	1	100
jonoizmenjivačka hromatografija	8,850	3,612	2,45	2,25	92,56
gel filtracija	3,455	1,78	1,94	1,78	36,14

U drugom eksperimentu isprobano je prečišćavanje β -galaktozidaze gel filtracijom koristeći Sefadeks G-150. Nakon nanošenja uzorka proces eluiranja izvršen je 0,1 M natrijum fosfatnim puferom (pH 6,8) pri minimalnom protoku 0,1 ml/min u cilju

što boljeg razdvajanja proteina. U sakupljenim frakcijama određena je aktivnost enzima, kao i koncentracija proteina, a dobijeni rezultati prikazani su na slici 4.26a.



Slika 4.26. Tok gel filtracije (a), elektroforegram frakcije 25 (b)

Kao što se sa slike 4.26 jasno uočava, maksimalna specifična aktivnost enzima se postiže u frakciji 25, čiji je elektroforegram prikazan na slici 4.26b. Kao što se sa elektroforegrama može videti, dobijen je prečišćen preparat na kome se jasno mogu uočiti karakteristične trake za β -galaktozidazu LacML tipa iz *L. acidophilus*. Naime, poznato je da LacML β -galaktozidaze iz bakterija mlečne kiseline predstavljaju dimere (35 kDa i 72 kDa), ukupne molarne mase 105 kDa.²⁹ Ovi rezultati dobijeni su elektroforezom u nekoliko navrata za različite β -galaktozidaze iz bakterija mlečne kiseline^{27, 29, 80, 313-315}, ali takođe su dobijeni i računski na osnovu poznatih aminokiselinskih sekvenci.^{29, 316} Imajući u vidu rezultate predstavljene u ovom poglavlju disertacije, jasno je da je dobijen i detaljno okarakterisan izuzetno aktivan i stabilan enzimski preparat koji je spreman za upotrebu u reakcijama hidrolize laktoze iz mleka i slatke surutke, ali i reakcijama sinteze potencijalno značajnih fiziološki aktivnih jedinjenja – galaktozida. U nastavku ove doktorske disertacije, međutim, posebna pažnja biće posvećena ispitivanju i optimizaciji njegove transgalaktozilacione sposobnosti. Imajući u vidu da se radi o enzimu izolovanom iz jednog od najpoznatijih i najznačajnijih probiotika, u značajnom broju prisutnih u mikrobioti čoveka, postoji osnovano verovanje da se dobijeni galakto-oligosaharidi i galaktozidi-aglikona imati izuzetan prebiotski potencijal.

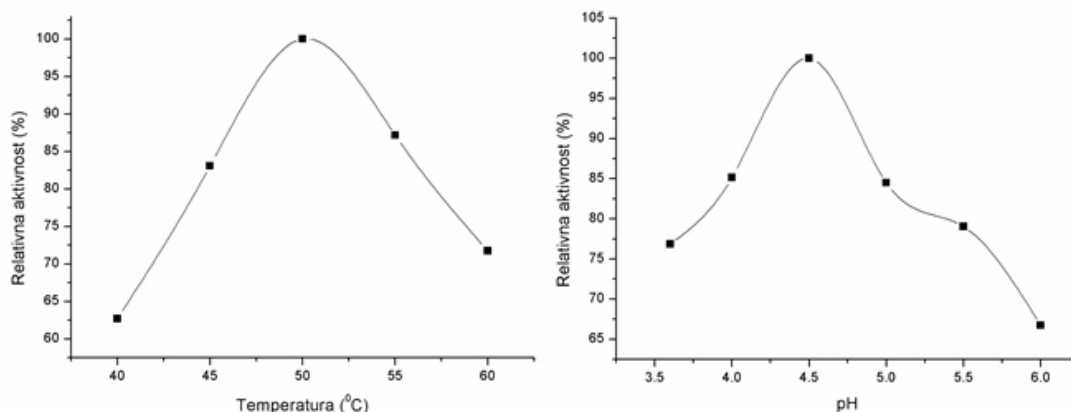
4.2. Karakterizacija β -galaktozidaze iz *A. oryzae*

U okviru preliminarnih eksperimenata proučavanja sinteze galakto-oligosaharida korišćen je komercijalni preparat β -galaktozidaza iz plesni *A. oryzae*. Ovaj preparat odabran je sa aspekta dostupnosti, niske cene, visoke specifične aktivnosti i što je najznačajnije visoke transgalaktozilacione moći.^{77, 317} Zahvaljujući svom GRAS statusu postao je predmet brojnih istraživanja koji se bave imobilizacijom i primenom β -galaktozidaza, a što je još bitnije ovaj enzim našao je primenu i u industrijskoj proizvodnji galakto-oligosaharida.^{256, 268} Od nedavno je poznata i struktura ovog enzima⁵⁶, što je dodatno doprinelo njegovoj atraktivnosti.

U prvoj fazi eksperimentalnog rada sa ovim enzimom, biće izvršena njegova karakterizacija. Iako se radi o komercijalnom preparatu, vrednosti pojedinih parametara mogu značajno varirati u zavisnosti od uslova izvođenja eksperimenata, pa je neophodno izvršiti njegovu detaljnu karakterizaciju. Kako je već poznato da se ovaj enzim dobar producent galakto-oligosaharida, u narednom setu eksperimenata (poglavlje 4.3) biće izvršena optimizacija sinteze galakto-oligosaharida, njegova imobilizacija i primena u različitim reaktorskim konfiguracijama. Ova saznanja, biće osnov za dalju optimizaciju proizvodnje galakto-oligosaharida i drugih galaktozida pomoću β -galaktozidaze iz *L. acidophilus*, ali sa druge strane primer za poređenje, obzirom da su podaci vezani za sintezu galakto-oligosaharida pomoću β -galaktozidaze iz *L. acidophilus* retki.

4.2.1. Temperaturni i pH optimum enzima

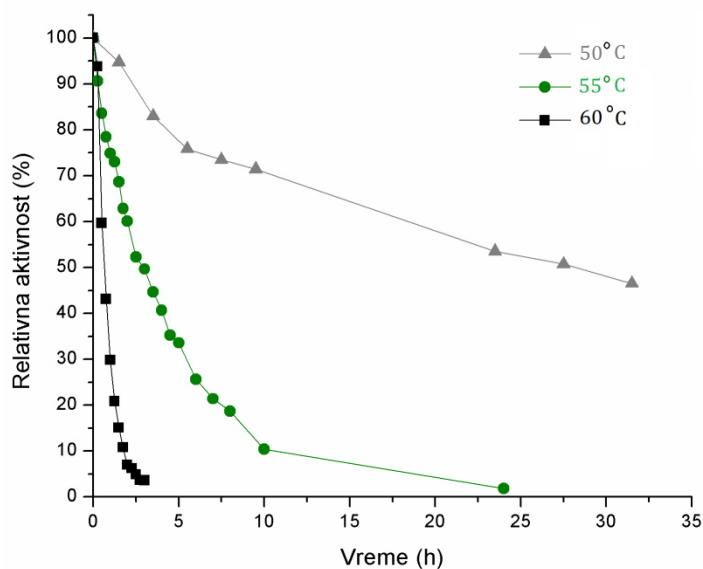
U prvom eksperimentu ispitani su temperaturni i pH optimumi enzima. Kao što se sa slike 4.27 može videti optimalna temperatura je 50 °C. Sa druge strane, pH optimum ovog enzima je 4,5, što ga svrstava u grupu kiselih β -galaktozidaza i čini ga optimalnim izborom za hidrolizu laktoze iz surutke, za razliku od enzima dobijenog pomoću *L. acidophilus*. Ovakvi rezultati su u skladu sa literaturnim podacima.



Slika 4.27. Zavisnost aktivnosti enzima od temperature (a) i pH (b)

4.2.2. Temperaturna i pH stabilnost

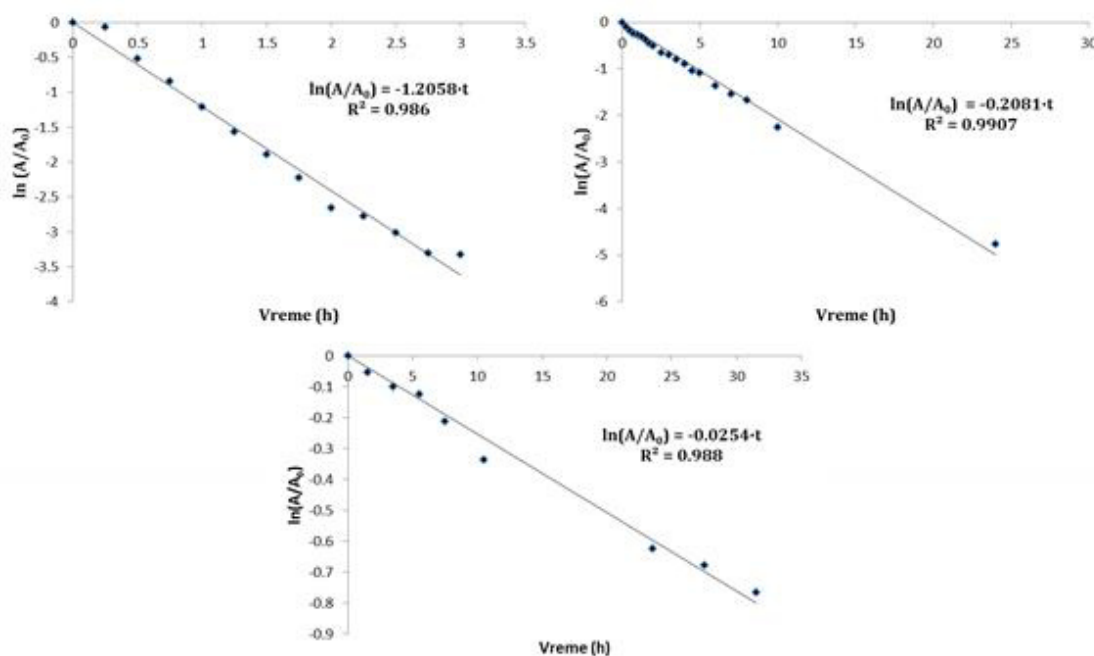
Kao i u slučaju β -galaktozidaze iz *L. acidophilus*, u narednom eksperimentu ispitane su temperaturna i pH stabilnosti, kako bi mogli da pretpstavimo ponašanje u realnim eksperimentalnim okolnostima. U cilju jednostavnijeg poređenja stabilnosti komercijalnog enzima sa dobijenim enzimom iz *L. acidophilus* izabrani isti opsezi vrednosti parametara. Inaktivacija enzima iz *A. oryzae* takođe se odigrava u jednom stupnju, pa je fitovanje eksponencijalnim modelom inaktivacije dalo dobro slaganje na sve tri ispitivane temperature.



Slika 4.28. Temperaturna stabilnost β -galaktozidaze iz *A. oryzae*: Zadržana aktivnost u funkciji od vremena za različite temperature: 60 °C (crna), 55 °C (zelena), 50 °C (siva).

Aktivnost je praćena pri pH 4,5

Kinetički modeli toplotne inaktivacije prikazani su na slici 4.29, a vrednosti kinetičkih konstanti, vremena polu-života enzima i koeficijenta korelacije su prikazani u tabeli 4.6. Kao što se sa grafika vidi, uočljiv je nagli pad stabilnosti sa porastom temperature. Najveću stabilnost enzim pokazuje na temperaturi od 50 °C, gde i nakon 30 sati još uvek pokazuje aktivnost iznad 60%. S druge strane, enzim se drastično brže inaktivirao na temperaturi od 60 °C, gde već nakon dva časa aktivnost pada ispod 10%.



Slika 4.29. Kinetički modeli termičke inaktivacije enzima: (a) 50 °C, (b) 55 °C, (c) 60 °C

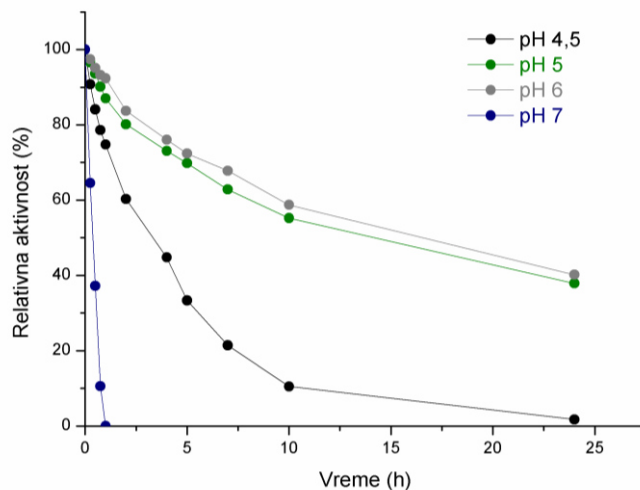
Kada uporedimo rezultate temperaturne stabilnosti komercijalnog preparata sa enzimom dobijenim iz *L. acidophilus*, imajući u vidu višu vrednost temperaturnog optimuma, bilo je očekivano da će i stabilnost biti bolja na ispitivanim temperaturama. Međutim, to nije bio slučaj na nižim ispitivanim temperaturama. Naime, vreme polu-života enzima na 50 °C iznosi 26,7 h, što je oko 5 puta manje od vremena polu-života β -galaktozidaze iz *L. acidophilus*. Iako je na temperaturi od 55 °C razlika bila manje izražena, vreme polu-života β -galaktozidaze iz *L. acidophilus* i dalje je bilo dva puta duže. Tek na temperaturi od 60 °C, enzim iz *A. oryzae* pokazao je neznatno višu stabilnost. Ovakvi rezultati mogu biti posledica činjenice da

dobijeni enzim predstavlja sirovi ćelijski ekstrakt, što se u brojnim slučajevima pokazalo da poseduje veću temperaturnu stabilnost od prečišćenih preparata ³¹⁸.

Tabela 4.6. Vrednosti konstante inaktivacije enzima (k_d), poluživota enzima ($t_{1/2}$) i odgovarajućih koeficijenata korelacije za različite temperature

	k_d (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	R^2
50 °C	0,025	26,70	0,9880
55 °C	0,224	3,10	0,9907
60 °C	1,207	0,58	0,9860

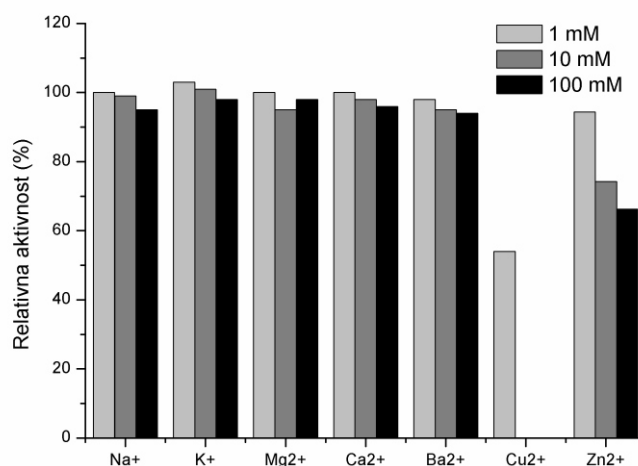
Sa druge strane, kada je reć o pH stabilnosti komercijalnog preparata, pokazalo se da optimalna vrednost pH, sa aspekta aktivnosti enzima, ne odgovara optimalnoj pH vrednosti za korišćenje enzima, sa aspekta stabilnosti. Naime, pri pH vrednosti od 4,5 enzim je najaktivniji, ali je značajno manje stabilan nego pri pH 5 i pH 6. Međutim, pri pH vrednostima iznad 6, dolazi do njegove inaktivacije za manje od sat vremena (Slika 4.30).



Slika 4.30. pH stabilnost β -galaktozidaze iz *A. oryzae*: Zaostala aktivnost u funkciji od vremena za različite pH vrednosti: pH 5 (crna), pH 6 (zelena), pH 7 (siva). Aktivnost je praćena na 55 °C.

4.2.3. Stabilnost enzima u prisustvu različitih jona

Kad je u pitanju stabilnost enzima u prisustvu jona metala, β -galaktozidaza iz *A. oryzae* pokazala je značajnu stabilnost u poređenju sa β -galaktozidazom iz *L. acidophilus*. Naime, na aktivnost enzima nakon inkubacije, u celom ispitivanom opsegu, većina ispitanih jona nije imala značajan uticaj. Primetna je jedino inaktivacija u prisustvu jona Cu^{2+} , gde se već pri najnižoj koncentraciji (1mM) aktivnost redukuje na 50% početne vrednosti aktivnosti.



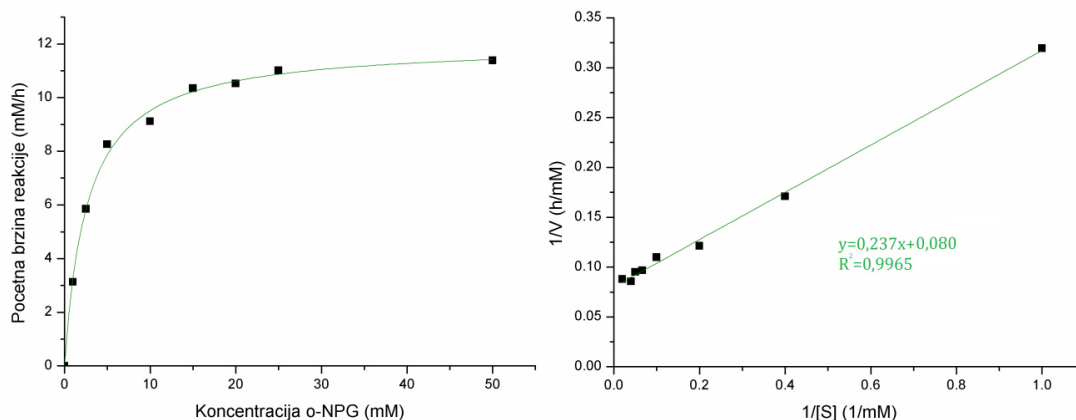
Slika 4.31. Relativna aktivnost enzima nakon inkubacije enzima sa različitim jonima metala

Daljim povećanjem koncentracije ovih jona dolazi do potpune inaktivacije enzima. Dobijeni rezultati su uporedivi sa rezultatima ranijih studija koji su se bavili karakterizacijom *A. oryzae*.^{36, 319} Pored inaktivacije jonima Cu^{2+} , u ovim radovima, izdvojeni su još i joni Ag^+ i Hg^+ kao izraziti inhibitori aktivnosti β -galaktozidaza iz *A. oryzae*.

4.2.4. Određivanje kinetičkih parametara

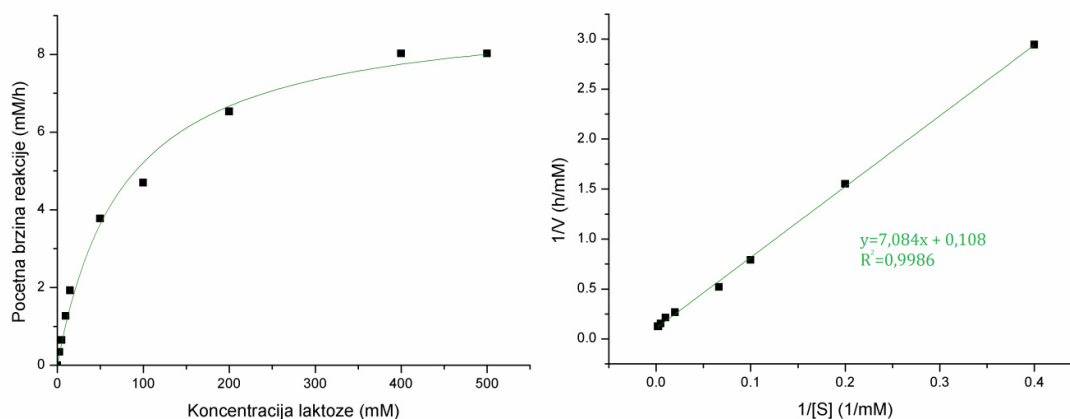
Podaci o vrednostima kinetičkih konstanti za β -galaktozidazu iz *A. oryzae* u literaturi, znatno variraju u zavisnosti od izvora. Naime, vrednosti K_m i V_m za reakciju hidrolize o-NPG se kreću u opsegu 1,6-2,6 mM,^{232, 320, 321} a za reakciju hidrolize laktoze 36-180 mM³¹².

U eksperimentu izvedenom u okviru ove disertacije, u cilju određivanja kinetičkih parametara varirana je početna koncentracija *o*-NPG u opsegu 1-50 mM, kao i laktoze 0,1-500 mM, pri prethodno određenim optimalnim uslovima za aktivnost enzima i pri koncentraciji enzima 1 mg/ml.



Slika 4.32. Određivanje kinetičkih konstanti za reakciju hidrolize *o*-NPG fitovanjem eksperimentalnih rezultata Mihaelis-Mentenovom jednačinom (a), primenom sekundarnog Lajnviver-Burkovog dijagrama (b)

Rezultati su pokazali dobro slaganje sa Mihaelis-Mentenovom jednačinom, pa su vrednosti K_m i V_m za obe reakcije izračunate pomoću Lajnviver-Burkovih dijagrama.



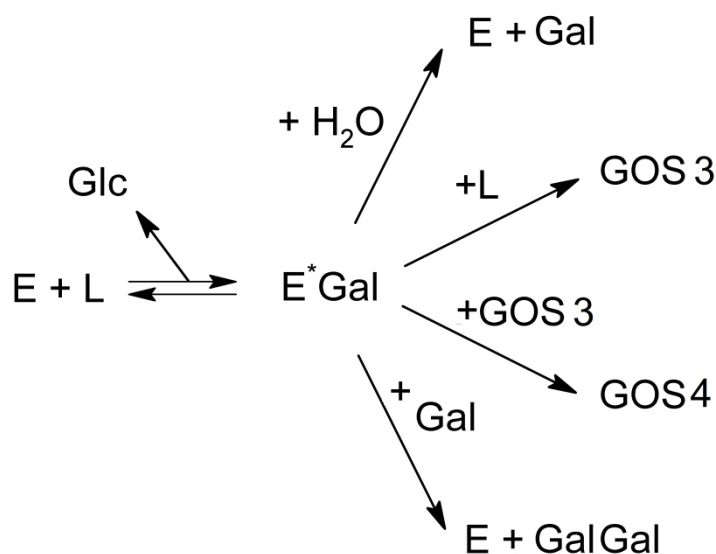
Slika 4.33. Određivanje kinetičkih konstanti za reakciju hidrolize laktoze fitovanjem eksperimentalnih rezultata Mihaelis-Mentenovom jednačinom (a), primenom sekundarnog Lajnviver-Burkovog dijagrama (b)

Izračunate vrednosti K_m i V_m za reakciju hidrolize *o*-NPG su 2,96 mM i 12,5 mM/h, redom. Sa druge strane, vrednosti parametara K_m i V_m za reakciju hidrolize laktoze su 65,59 mM i 9,26 mM/h. Kao što se može primetiti, ovi rezultati pokazuju dobro slaganje sa literaturnim podacima. Uočljiva je značajna razlika u vrednostima K_m , što nesumnjivo ukazuje na veći afinitet enzima prema *o*-NPG, nego prema laktozi. Takođe, kada ove vrednosti uporedimo sa vrednostima dobijenim za enzim iz *L. acidophilus*, može se videti da su vrednosti K_m za obe reakcije znatno viši, što ukazuje na veliki potencijal enzima iz *L. acidophilus* jer pokazuje visok afinitet prema ovim supstratima.

Nakon karakterizacije enzima i određivanja kinetičkih parametara za reakcije hidrolize, u nastavku eksperimentalnog rada ispitaćemo transgalaktozilacionu sposobnost enzima.

4.3. Enzimska sinteza galakto-oligosaharida

Kao što je već naglašeno, β -galaktozidaza se tradicionalno koristi kao enzim za hidrolizu laktoze, ali se poslednjih godina sve više pažnje obraća na njenu transgalaktozilacionu aktivnost, koja omogućava proizvodnju niza jedinjenja sa funkcionalnom aktivnošću, od kojih su najpoznatiji galakto-oligosaharidi. Ove reakcije se odigravaju istovremeno, naime, prva faza je zajednička i ona predstavlja formiranje enzim-galaktozil kompleksa, koji potom može predati galaktozu molekulu vode, u slučaju hidrolize, odnosno nekoj drugoj slobodnoj hidroksilnoj grupi (laktozi ili nižem galakto-oligosaharidu) u slučaju sinteze galakto-oligosaharida (Slika 4.34).



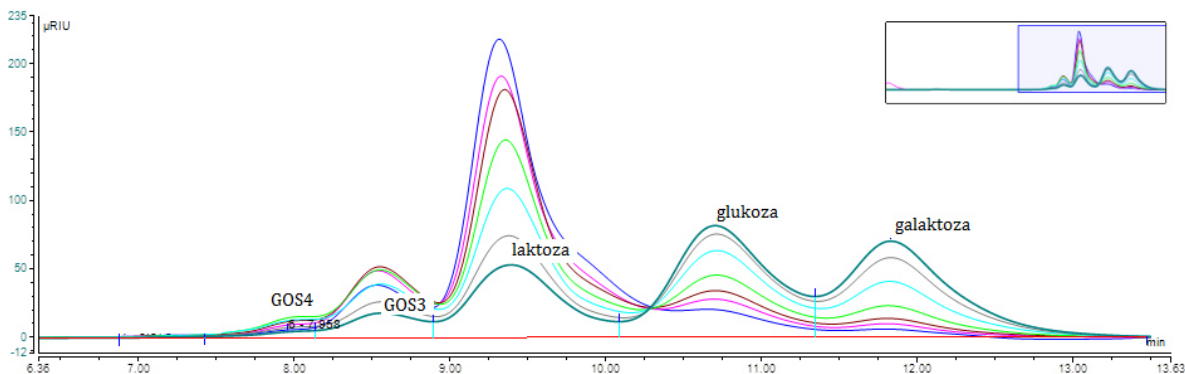
Slika 4.34. Mehanizam sinteze galakto-oligosaharida pomoću β -galaktozidaze

Stoga, da bi transgalaktozilaciona aktivnost β -galaktozidaze dominirala nad hidrolitičkom aktivnošću u reakciji sa laktozom, potrebno je izvršiti detaljnu optimizaciju reakcionih parametara u cilju favorizovanja reakcije transgalaktozilacije. Pregledom literature kao najznačajniji izdvojeni su, i biće ispitani sledeći reakcioni parametri: temperatura, pH, količina enzima, početna koncentracija laktoze, kao i vreme trajanja reakcije.

4.3.1. Sinteza galaktooligosaharida pomoću β -galaktozidaze iz *A. oryzae*

4.3.1.1. Određivanje sastava dobijenih galakto-oligosaharida

Proizvodi reakcije u ovom poglavlju razdvojeni su i detektovani korišćenjem hromatografije visokih performansi (HPLC) opremljenom kolonom za šećere HyperRez Ca²⁺ koja omogućava njihovo razdvajanje (Slika 4.35).



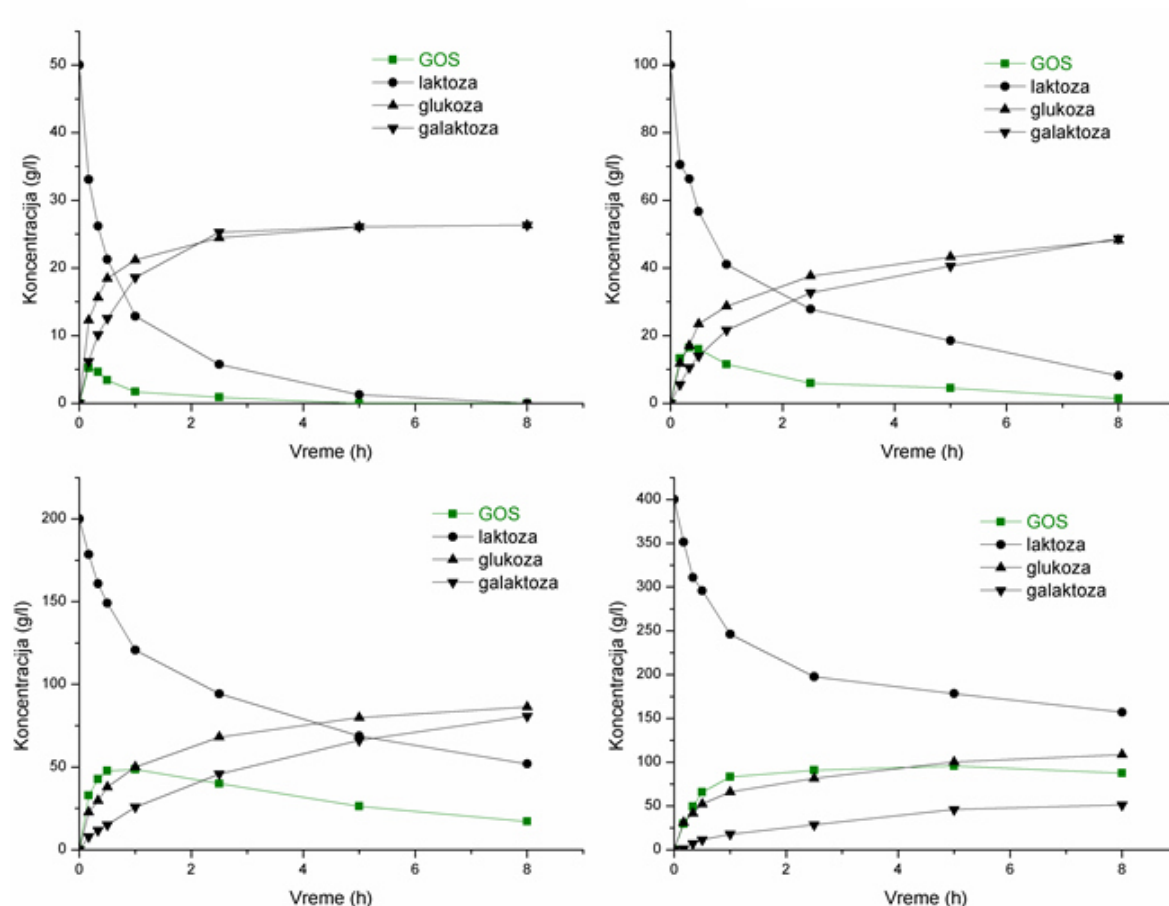
Slika 4.35. Karakterističan hromatogram sinteze galakto-oligosaharida katalizovane β -galaktozidazom

Na ovaj način detektovani i kvantifikovani su galakto-oligosaharidi različitog stepena polimerizacije, ali ne i pojedinačni strukturni izomeri koji su potencijalno prisutni u reakcionoj smeši. Prvi put karakterizaciju dobijenih galakto-oligosaharida izvršio je Toba sa saradnicima.³²² Od tada dosta je radova je bilo posvećeno ovoj temi.³²³

4.3.1.2. Tok reakcije sinteze galakto-oligosaharida

Prethodno je definisano da reakcija sinteze galakto-oligosaharida predstavlja izuzetno kompleksan skup međusobno zavisnih paralelnih reakcija. Stoga, u cilju boljeg sagledavanja toka ove reakcije prikazani su profili svih učesnika u reakciji. Kao što se sa slike 4.26 može videti, koncentracija galakto-oligosaharida naglo raste u prvim fazama reakcije, pri svim prikazanim koncentracijama. Za to vreme primetan je i značajan pad koncentracije laktoze, koja se troši na sintezu galakto-oligosaharida, ali i manjim delom na hidrolizu, što se vidi iz profila koncentracije dobijenih proizvoda hidrolize (glukoze i galaktoze).

U ovoj fazi očigledno preovladava reakcija transgalaktozilacije. Međutim, kako reakcija napreduje, odnosno kako je koncentracija prisutne laktoze manja, samim tim manje dostupna kao akceptor glukozil-jedinica, tako sinteza galakto-oligosaharida usporava, dok sa druge strane dolazi do konstantnog prirasta produkata hidrolize.

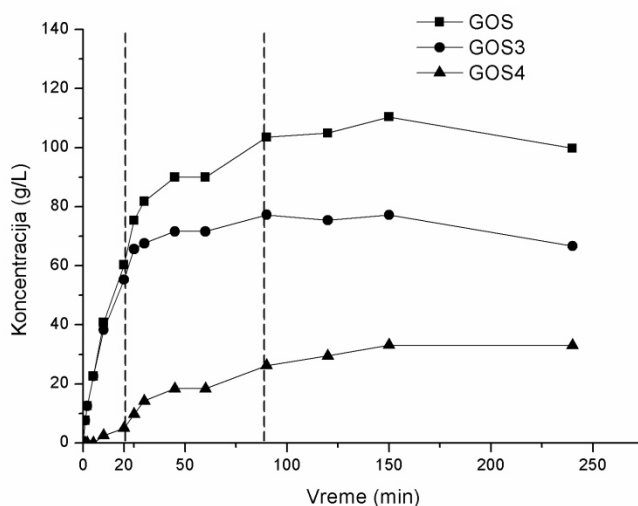


*Slika 4.36 Tok reakcije sinteze galakto-oligosaharida. Reakcija je izvedena pri koncentraciji laktoze od 50 g/l (a), 100 g/l (b), 200 g/l (c) 400 g/l (d) u 0,1M natrijum acetatnom puferu (pH 4,5) i koncentraciji enzima 1 mg/ml β -galaktozidaze iz *A. oryzae* na temperaturi 50 °C.*

Razlike između koncentracije glukoze i galaktoze su posledica sinteze galakto-oligosaharida, jer se molekuli galaktoze inkorporiraju u molekule galakto-oligosaharida, pa se stoga može videti da je ova razlika izraženija u ranijim fazama reakcije. Ovde treba istaći da galakto-oligosaharida ne predstavljaju krajnji proizvod reakcije, i da oni podložni reakciji hidrolize i upravo iz tog razloga vreme

predstavlja jedan od ključnih faktora u reakciji sinteze galakto-oligosaharida ¹⁸⁵. U skladu sa tim, na kraju posmatranog perioda reakcije prevladava reakcija hidrolize, pa koncentracija galakto-oligosaharida opada, dok koncentracije glukoze i galaktoze nastavljaju da rastu. Njihove vrednosti počinju da se približavaju i na kraju se izjednačavaju, što se najbolje može videti na slici 4.36a.

Uticaj vremena na sintezu galakto-oligosaharida još se bolje može objasniti na primeru sinteze galakto-oligosaharida različitog stepena polimerizacije (Slika 4.37). Naime, pod galakto-oligosaharidima se podrazumeva kompleksna smeša galakto-oligosaharida različite dužine (najčešće 2-8 monosaharidnih jedinica), tipa veza i razgranatosti lanca. Analizom uzoraka utvrđeno je da su našem slučaju u ovoj smeši prisutni trisaharidi (GOS3) i tetrasaharidi (GOS4), dok je sinteza disaharida (različitih od laktoze) i viših galakto-oligosaharida gotovo zanemarljiva.



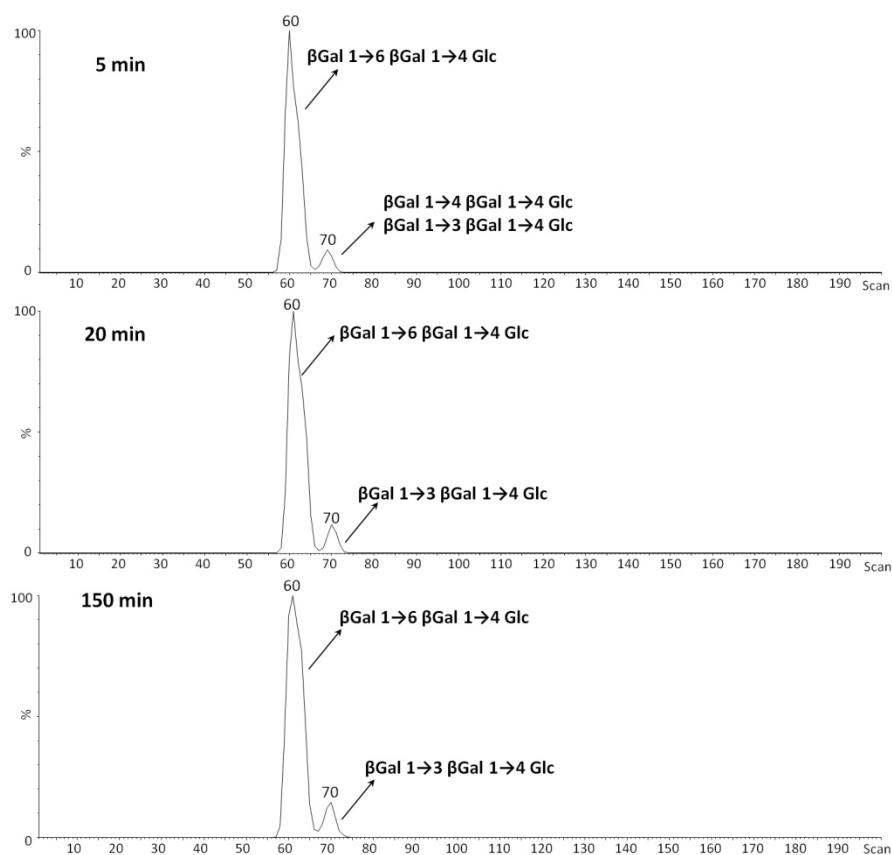
Slika 4.37. Tok reakcije sinteze galakto-oligosaharida različite dužine lanca. Reakcija je izvedena pri koncentraciji laktoze od 400 g/l u 0,1M natrijum acetatnom puferu (pH 4,5) i koncentraciji enzima 1 mg/ml β -galaktozidaze iz *A. oryzae* na temperaturi 50 °C.

Sa slike 4.37 se jasno može videti da se tok sinteze galakto-oligosaharida može podeliti u tri faze. Prva faza bi obuhvatala prvih 20 minuta reakcije tokom kojih se galakto-oligosaharidi sastoje samo od trisaharida (GOS3), dok je sinteza tetrasaharida (GOS4) zanemarljiva. Ovo ima smisla imajući u vidu da su upravo trisaharidi supstrat neophodan za sintezu tetrasaharida. U drugoj fazi, koja obuhvata period 20-90 minuta, počinje intenzivna sinteza GOS4, dok se

koncentracija GOS3 umereno povećava. Naime, sinteza GOS3 je i u ovoj fazi izražena, ali u manjoj meri, imajući u vidu da se jedan deo GOS3 ujedno troši na sintezu GOS4. Ukoliko pogledamo profil ukupnih galakto-oligosaharida, intenzivan rast ukazuje na činjenicu da u ovom periodu nastaju novi molekuli galakto-oligosaharida. Upravo prestanak rasta koncentracije ukupnih galakto-oligosaharida predstavlja nagoveštaj nastupanja nove faze. Tokom ove treće faze sinteza GOS3 postaje zanemarljiva dok se sinteza GOS4 još uvek odvija, što rezultira stagnacijom u rastu koncentracije ukupnih galakto-oligosaharida.

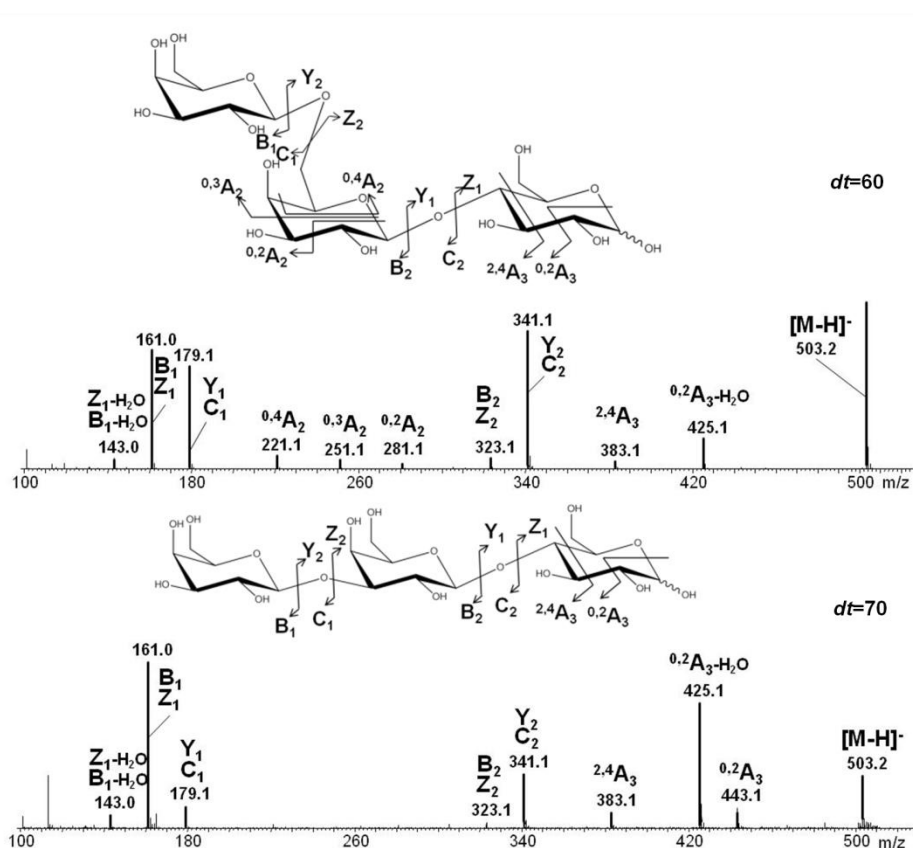
4.3.1.3. Određivanje strukture dobijenih galakto-oligosaharida

Budući da je uočeno da na efikasnost galakto-oligosaharida utiču ne samo stepen polimerizacije već i određena struktura, odnosno prisustvo određenih tipova veza, fokus istraživanja danas prebačen je na optimizaciju sinteze ciljanih proizvoda.



Slika 4.38. Jonski mobilogrami za GOS3

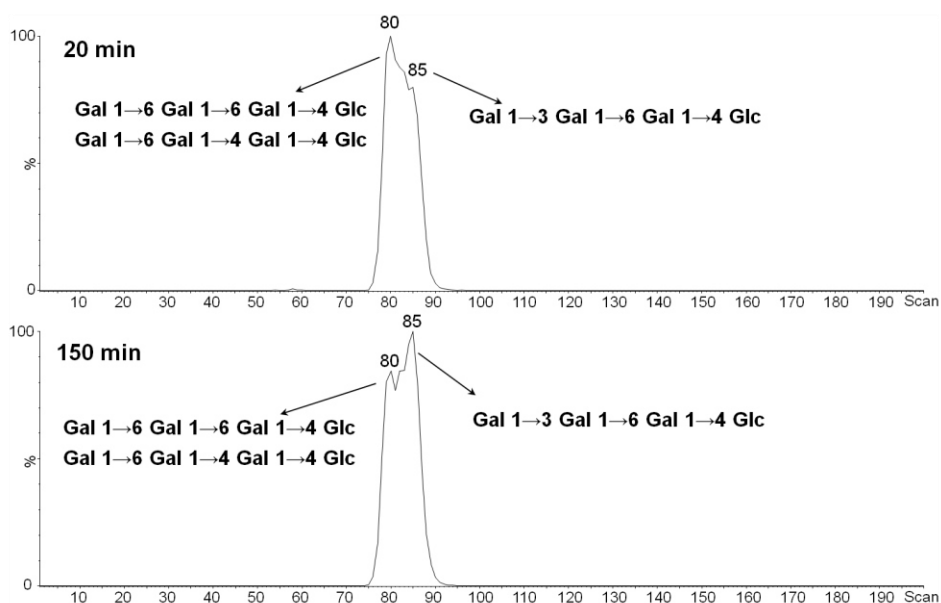
Stoga, neophodno je razviti jednostavnu i brzu metodu koja omogućava analiziranje kompletnih reakcionih smeša u jednom koraku, bez potrebe za prethodnim hromatografskim izolovanjem pojedinih proizvoda reakcije. U ovoj disertaciji, stoga, razvijena je metoda detekcije proizvoda pomoću spektrometrije jonske pokretljivosti kuplovane sa masenom spektrometrijskim pristupom (IMS-MS/MS). Zahvaljujući jednostavnosti metode, pored detekcije strukturnih izomera galakto-oligosaharida, pokušali smo da utvrdimo da li postoje razlike u strukturi dobijenih galakto-oligosaharida u različitim fazama reakcije transgalaktozilacije.



Slika 4.39. MS/MS spektri pojedinačnih strukturnih izomera GOS3

Na slici 4.39. su prikazana tri jonska mobilograma za trisaharide nastala u tri različita vremena u toku reakcije (5, 20 i 150 min). Na ovim mobilogramima jasno se vidi postojanje tri izomera GOS3, i to: β -Gal(1 \rightarrow 6)- β -Gal(1 \rightarrow 4)-Glc, β -Gal(1 \rightarrow 3)- β -Gal(1 \rightarrow 4)-Glc i β -Gal(1 \rightarrow 4)- β -Gal(1 \rightarrow 4)-Glc. MS/MS spektri ovih pikova, pomoću kojih je i razjašnjena struktura izomera, prikazani su na slici 4.40. Nomenklatura fragmentacija je protumačena na osnovu prethodno objavljenih studija Domona

(Domon) i Kostela (Costello) za glukokonjugate, a identifikacija veza je određena na bazi fragmentacionih pravila opisanih u ranijim radovima.^{324, 325} Očigledno je da je β -Gal(1→6)- β -Gal(1→4)-Glc izomer najprisutniji strukturni izomer među GOS3 u svakom od tri posmatrana trenutka. Sa druge strane, β -Gal(1→4)- β -Gal(1→4)-Glc je detektovan na samom početku reakcije, dok se kasnije u potpunosti konvertuje do β -Gal(1→3)- β -Gal(1→4)-Glc. Ovaj fenomen se može objasniti na dva načina: da je β (1→4) veza više sklona hidrolizi od ostalih veza, ili pak da je β -Gal(1→4)- β -Gal izomer naročito pogodan kao supstrat za prihvatanje nove galaktozil-jedinice tokom reakcije transgalaktozilacije.

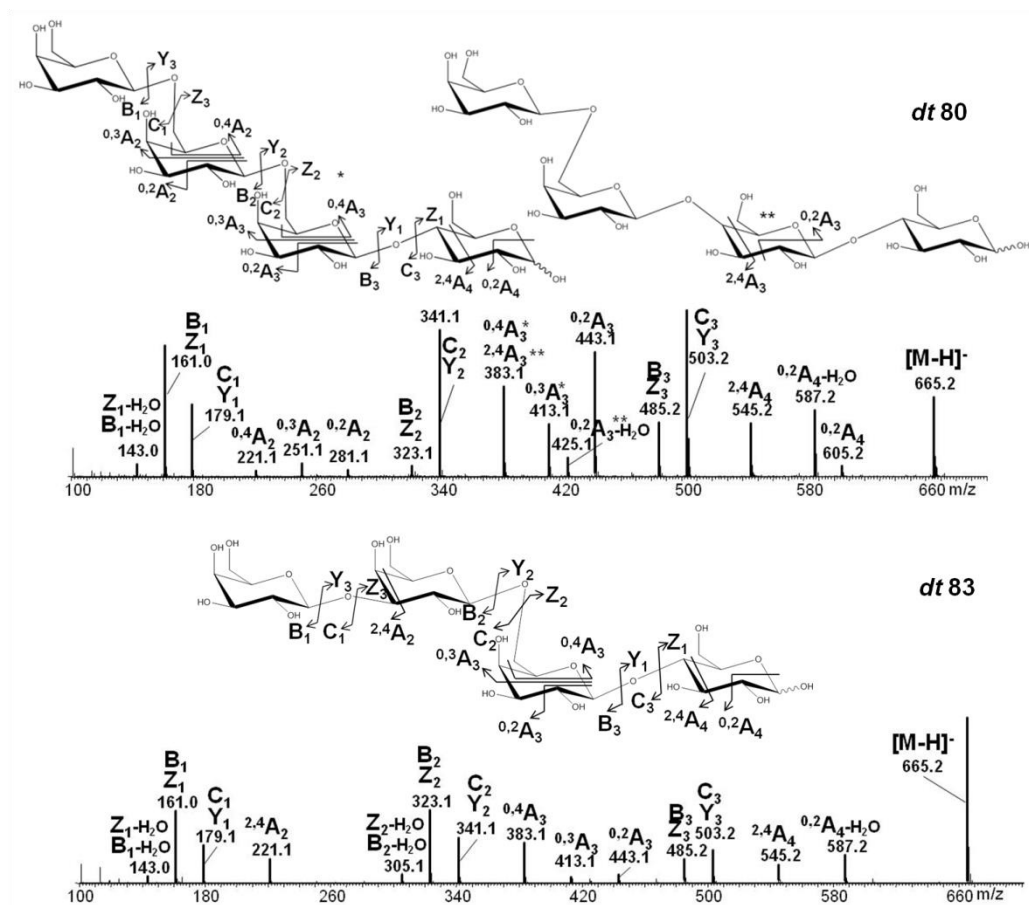


Slika 4.40. Jonski mobilogrami za GOS4

U svakom slučaju, već nakon nekoliko minuta dolazi do uspostavljanja konstantnog odnosa između izomera koji se zadržava tokom celog toka reakcije, sa neznatnim pomeranjem u stranu stvaranja β -(1→3) veza.

Pri detekciji strukturnih izomera GOS4 u istim reakcionim vremenima vodili smo se istim pravilima za određivanje prisutnih veza. Iako su nakon 5 min detektovane neznatne količine GOS4, to je bilo nedovoljno za jasnu diferencijaciju prisutnih veza, a MS/MS spektri su pokazali da se najverovatnije radi o četiri izomera u kojima su prisutne β (1→6), β (1→3), β (1→4) veze.

U uzorcima nakon 20 i 150 min, međutim, nije bilo problema i MS/MS spektrima je pokazano postojanje: β -Gal(1 \rightarrow 6)- β -Gal(1 \rightarrow 6)- β -Gal(1 \rightarrow 4)-Glc ($dt=80$), β -Gal(1 \rightarrow 6)- β -Gal(1 \rightarrow 4)- β -Gal(1 \rightarrow 4)-Glc ($dt=80$), β -Gal(1 \rightarrow 3)- β -Gal(1 \rightarrow 6)- β -Gal(1 \rightarrow 4)-Glc ($dt=85$).



Slika 4.41. MS/MS spektri strukturnih izomera GOS4

Na osnovu ovako dobijenih rezultata, može se izvesti nekoliko veoma važnih zaključaka. Prvo, bitno je istaći da su najviše prisutni izomeri kod kojih je poslednja galaktoza vezana β -(1 \rightarrow 6) vezom, dok su izomeri kod kojih je poslednja galaktoza vezana β -(1 \rightarrow 3) vezom nešto ređi. Takođe, postojanjem najmanjeg pika β -Gal(1 \rightarrow 6)- β -Gal(1 \rightarrow 4)- β -Gal(1 \rightarrow 4)-Glc objašnjen je izostanak tranzitnog molekula β -Gal(1 \rightarrow 4)- β -Gal(1 \rightarrow 4)-Glc sa jonskih mobilograma GOS3 nakon 20 i 150 minuta. U slučaju GOS3 odnos različitih izomera nije se menjao sa vremenom, međutim, kod GOS4 dolazi do inverzije u pogledu zastupljenosti izomera tokom vremena (Slika 4.40). Tako da sa vremenom dolazi do pomeranja ravnoteže u smeru

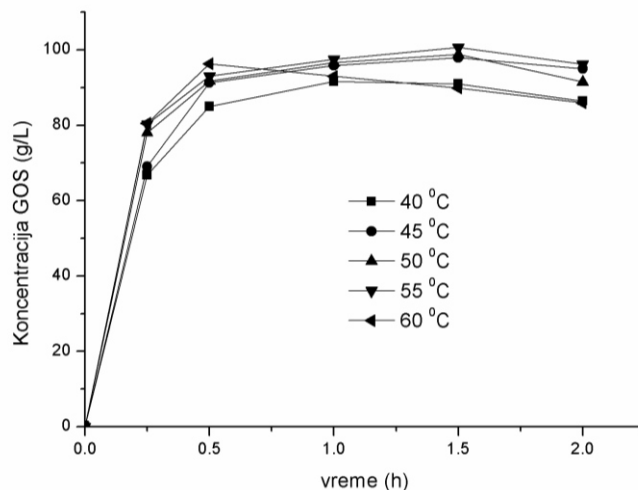
stvaranja β -(1→3) veza. Ovaj fenomen najverovatnije možemo pripisati i većoj sklonosti β -galaktozidaze iz *A. oryzae* ka hidrolizi β -(1→6) veza. Konačno, poređenjem izomera GOS3 i GOS4 može se uočiti da se drugi po prisutnosti izomer GOS3 β -Gal(1→3)- β -Gal(1→4)-Glc ne javlja kao akceptor galaktozil ostatka u sintezi GOS4, što navodi na razmišljanje da se dalja reakcija polimerizacije zaustavlja stvaranjem β -(1→3) veza. Ovaj zaključak dodatno je potkrepljen i slabim prinosom GOS5, imajući u vidu da je β -(1→3) veza dominantna na redukujućem kraju galakto-oligosaharida. Dobijeni rezultati nisu važni isključivo sa aspekta objašnjenja postojanja različitih strukturnih izomera, već je po prvi put primećeno da se udeo pojedinih veza menja sa vremenom, što će u budućnosti omogućiti dobijanje ciljanih izomera, željenih funkcionalnih svojstava, adekvatnom kontrolom reakcionih uslova.

4.3.1.4. Uticaj temperature na sintezu galakto-oligosaharida

Imajući u vidu literaturne podatke, temperatura odigravanja reakcije se može smatrati potencijalno značajnim faktorom koji utiče na prinos galakto-oligosaharida. Sa jedne strane, radom na povišenim temperaturama omogućen je rad sa koncentrovanim rastvorima laktoze, što je od izuzetnog značaja imajući u vidu slabu rastvorljivost laktoze (18 i 37 g laktoze na 20 i 60 °C, redom)^{82, 326}. Rad sa koncentrovanim rastvorima dalje utiče na favorizovanje sinteze galakto-oligosaharida^{177, 191, 327}. Sa druge strane, nekoliko studija pokazalo je da se povećanjem temperature može favorizovati reakcija transgalaktozilacije, jer je uticaj temperature na brzinu reakcije sinteze izraženiji nego na brzinu reakcije hidrolize.^{119, 195}

U cilju utvrđivanja uticaja temperature na sintezu galakto-oligosaharida, u našem reakcionom sistemu, pri fiksiranim ostalim parametrima izabranim na osnovu pregleda literature i prethodnih saznanja o enzimu (koncentracija laktoze 400 g/l, 0,1 M natrijum-acetatni pufer i koncentracija enzima β -galaktozidaze iz *A. oryzae* 1mg/ml) ispitan je prinos galakto-oligosaharida (g/l) u funkciji vremena za temperature u opsegu 40-60 °C (slika 4.42).

Kao što se sa slike 4.42 može videti, uticaj temperature u ispitanom opsegu nije se pokazao kao značajan faktor. Naime, razlika u prinosima galakto-oligosaharida u intervalu temperatura 45-55 °C gotovo da nema (97,9-100,6 g/l), pa ćemo u nastavku rada ispitivanje uticaja preostalih reakcionih faktora nastaviti na 50 °C, temperaturi pri kojoj je ostvaren najviši prinos galakto-oligosaharida (100,6 g/l), a pri kojoj je enzim, kao što je utvrđeno u prethodnom poglavlju, izuzetno stabilan.



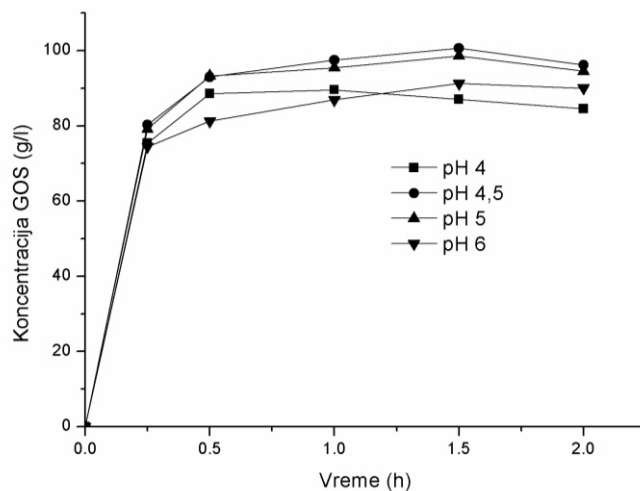
Slika 4.42. Uticaj temperature na sintezu galakto-oligosaharida. Reakcija je izvedena pri koncentraciji laktoze od 400 g/l u 0,1M natrijum acetatnom puferu (pH 4,5) i koncentraciji enzima 1 mg/ml β -galaktozidaze iz *A. oryzae*

Optimalne vrednosti temperature za sintezu galakto-oligosaharida pomoću β -galaktozidaze iz *A. oryzae* u literaturi su različite i najčeće se kreću u opsegu 40-50 °C, što je u skladu sa dobijenim rezultatima.²⁵⁹ Iwasaki i saradnici su čak došli do istog zaključka da je uticaj temperature izuzetno važan faktor kada poredimo transgalaktozilacione aktivnosti enzima različitog porekla, ali da je za pojedinačne enzime oblast temperatura za postizanje maksimalnih prinosa prilično široka.¹⁹⁶

4.3.1.5. Uticaj pH na sintezu galakto-oligosaharida

Reakcije transgalaktozilacije najčeće se odigravaju u vodenoj sredini, zbog slabe stabilnosti enzima u organskim rastvaračima³²⁸, iako je bilo nekoliko pokušaja sinteze galakto-oligosaharida u čistim organskim rastvaračima, kao i u dvofaznim sistemima^{219, 238, 329, 330}. Shodno tome, uticaj pH na reakciju transgalaktozilacije

može biti značajan i zavisi pre svega od prirode enzima. Postoje indicije da se sa promenom pH može uticati na povećanje selektivnosti enzima prema reakciji transgalaktozilacije^{14, 189}. Međutim, u literaturi je sve zastupljeniji podatak da su pH optimumi za reakcije sinteze i hidrolize približno isti.^{77, 196}



*Slika 4.43. Uticaj pH na sintezu galakto-oligosaharida. Reakcija je izvedena pri koncentraciji laktoze od 400 g/l i koncentraciji enzima 1 mg/ml β -galaktozidaze iz *A. oryzae* na 50 °C.*

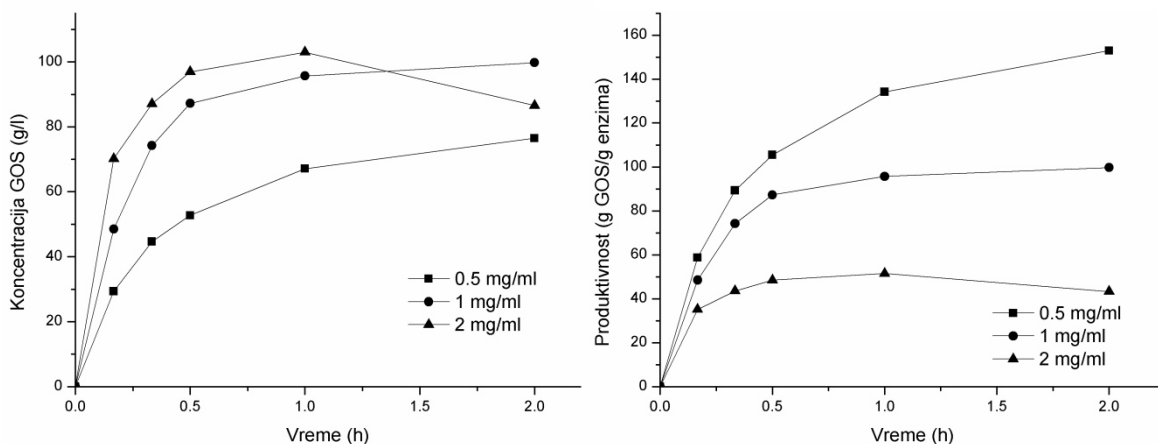
Da bismo ispitali uticaj pH na sintezu galakto-oligosaharida laktoza i enzim su rastvoreni u odgovarajućim puferima (pH 4-5 natrijum-acetatni i pH 6 natrijum-fosfatni pufer). Ostali reakcioni parametri bili su nepromenjeni: koncentracija laktoze 400 g/l, koncentracija enzima 1 g/l i temperatura 50 °C. Kao što se sa slike 84. može videti najbolji prinos galakto-oligosaharida dobijen je pri pH 4,5, što predstavlja optimalnu vrednost pH za ovaj enzim i sa aspekta hidrolize.

Ispitivanje uticaja preostalih reakcionih faktora je u nastavku ovog rada vršeno pri pH vrednosti od 4,5, pri kojoj enzim ima najbolju stabilnost, ali i pri kojoj je ostvaren najviši prinos galakto-oligosaharida.

4.3.1.6. Uticaj koncentracije enzima na sintezu galakto-oligosaharida

Koncentracija enzima koja katalizuje određenu reakciju značajno utiče na brzinu reakcije. Naime, opšte je prihvaćena činjenica da pod uslovima kinetički kontrolisane reakcije, koncentracija enzima nema uticaja na maksimalni prinos galakto-oligosaharida, osim u slučaju inaktivacije enzima, već ima uticaj na vreme

za koje se taj maksimum postiže. U cilju ispitivanja uticaja koncentracije enzima na sintezu galakto-oligosaharida varirali smo koncentraciju enzima u opsegu 0,5-2 mg/ml.



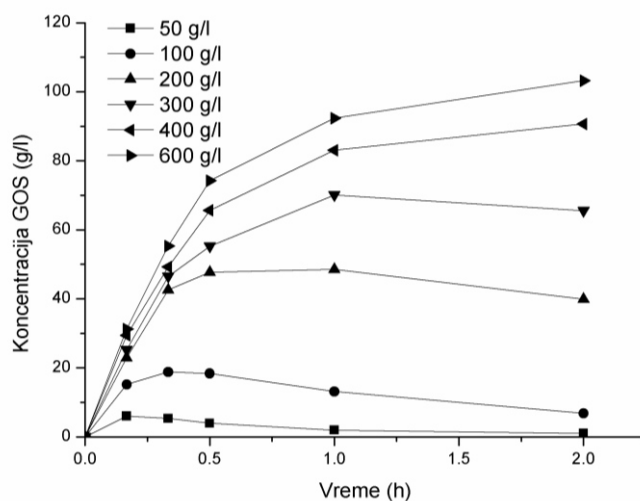
Slika 4.44. Uticaj pH na sintezu galakto-oligosaharida. Reakcija je izvedena pri koncentraciji laktoze od 400 g/l i koncentraciji enzima 1 mg/ml β -galaktozidaze iz *A. oryzae* na 50 °C

Sa slike 4.44 se može videti da sa porastom koncentracije enzima raste početna brzina reakcije u celom opsegu, međutim postignuti prinosi galakto-oligosaharida su nesrazmerni povećanju koncentracije enzima. Sa druge strane, kada pogledamo produktivnosti reakcije izražene kao koncentracija galakto-oligosaharida po masi enzima, vidimo da je trend suprotan, i da sa porastom koncentracije enzima opada produktivnost reakcije. Stoga imajući u vidu da cena enzima predstavlja najveću stavku u ukupnim troškovima enzimskih reakcija, neophodno je pri optimizaciji napraviti kompromis između suprotstavljenih zahteva. U našem slučaju pri koncentraciji enzima od 1 mg/ml, postiže se neznatno manji prinos galakto-oligosaharida nego u slučaju koncentracije 2 mg/ml, ali je zato produktivnost po masi enzima bila znatno viša. Stoga, u narednim eksperimentima biće korišćena koncentracija 1 mg/ml.

4.3.1.7. Uticaj početne koncentracije laktoze na sintezu galakto-oligosaharida

Poznato je da početna koncentracija supstrata predstavlja ključni faktor u optimizaciji procesa sinteze galakto-oligosaharida. Njen uticaj možemo sagledati sa dva aspekta. Naime, sa povećanjem koncentracije laktoze raste i koncentracija dostupnog supstrata za reakciju transgalaktozilacije, odnosno veća je verovatnoća

da će molekuli galaktoze biti preneti na molekule laktoze umesto na molekule vode. Sa druge strane, visoke koncentracije laktoze smanjuju aktivnost vode, čime se ujedno smanjuje i brzina reakcije hidrolize.¹⁴ Brojni radovi na ovu temu, pokazuju da je povećanje koncentracije laktoze praćeno porastom koncentracije galakto- oligosaharida, bez obzira o kom biokatalizatoru je reč.^{177, 191, 195, 327}



Slika 4.45. Uticaj početne koncentracije laktoze na sintezu galakto-oligosaharida. Reakcija je izvedena pri u 0,1M natrijum acetatnom puferu (pH 4,5) pri koncentraciji β -galaktozidaze iz *A. oryzae* 1 mg/ml na temperaturi 50 °C.

Kako bi se ispitaio uticaj koncentracije laktoze na prinos galakto-oligosaharida, koncentracija laktoze je varirana u opsegu 50-600 g/l. Ostali reakcioni parametri bili su konstantni (1 mg/ml enzima, temperatura 50 °C i pH 4,5). Kao što se vidi sa slike 4.45, porast početne koncentracije laktoze dovodi do porasta sinteze galakto-oligosaharida. Najveći prinos dobijen je korišćenjem rastvora laktoze koncentracije 600 g/l. Ovako koncentrovan rastvor nije moguće dobiti jednostavnim rastvaranjem laktoze u puferu, već je potrebno rastvor predgrejati (do temperature od 90 °C), a zatim ohladiti do optimalne temperature za reakciju sinteze galakto-oligosaharida. Budući da je cilj ove disertacije razvijanje enzimskih procesa u reaktorima, ovaj rastvor ne bi mogao da bude primenjen za sintezu galakto-oligosaharida u reaktorima sa fluidizovanim slojem, jer bi najverovatnije došlo do procesa kristalizacije laktoze u toku rada reaktora. Stoga, u cilju pojednostavljenja procesa, a i kasnijeg lakšeg poređenja, za rad je odabrana

koncentracija laktoze od 400 g/l, pri kojoj je dobijena značajna koncentracija galakto-oligosaharida (oko 100 g/l).

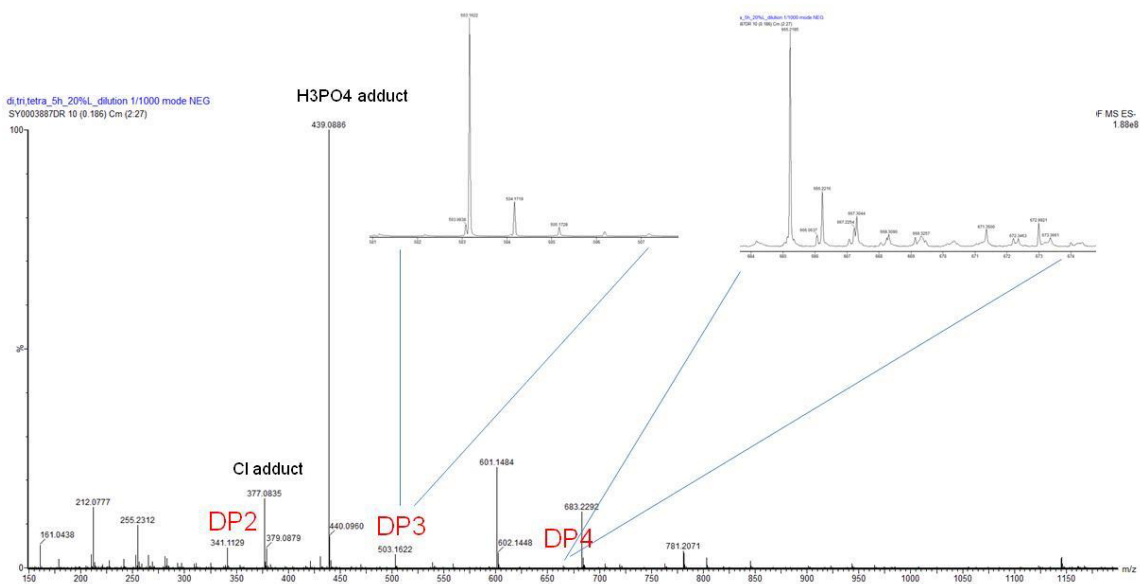
4.3.2. Sinteza galakto-oligosaharida pomoću β -galaktozidaze iz *L. acidophilus*

Kao što je prethodno opisano, pod određenim uslovima β -galaktozidaze iz različitih izvora mogu katalizovati reakciju sinteze galakto-oligosaharida. Međutim, nisu svi enzimi jednako efikasni u tom procesu^{14, 177, 331}. Do sada, najveća pažnja bila je poklonjena dostupnim komercijalnim preparatima β -galaktozidaza iz plesni i kvasaca. Međutim, poslednjih godina sve veća pažnja poklanja se β -galaktozidazama probiotskih kultura. Razlog za interesovanje leži u činjenici da različiti enzimi imaju sklonosti ka građenju specifičnih strukturnih izomera galakto-oligosaharida, o čemu je već bilo reči, pa se pretpostavlja da će na ovaj način dobijeni galakto-oligosaharidi imati izraženiji prebiotski potencijal. Postoji dosta radova sa različitim sojevima *Bifidobacterium*,^{7, 201, 332-335} pa čak i industrijski razvijena proizvodnja,³³⁶ dok je sinteza galakto-oligosaharida pomoću β -galaktozidaza sojeva *Lactobacillus* još uvek u povoju. Stoga, u narednim eksperimentima biće ispitana transgalaktozilaciona aktivnost β -galaktozidaze izolovane iz *L. acidophilus*.

4.3.2.1. Sastav galakto-oligosaharida dobijenih pomoću β -galaktozidaze iz *L. acidophilus*

Sastav galakto-oligosaharida (stepen polimerizacije, vrsta veza i razgranatost lanca), kao što je prethodno istaknuto umnogome zavisi od prirode enzima. To je upravo jedan od osnovnih razloga zbog kojih smo se i opredelili za *L. acidophilus* kao proizvodni mikroorganizam iz koga ćemo izolovati enzim. Naime, imajući u vidu da se radi o probiotskoj kulturi prisutnoj u crevnom traktu čoveka, cilj rada je bio sintetisati galakto-oligosaharide specifične strukture koji će biti favorizovani od strane dobrih bakterija mikrobiote creva. Stoga će u ovom poglavlju detaljno biti određene strukture dobijenih galakto-oligosaharida primenom različitih analitičkih metoda.

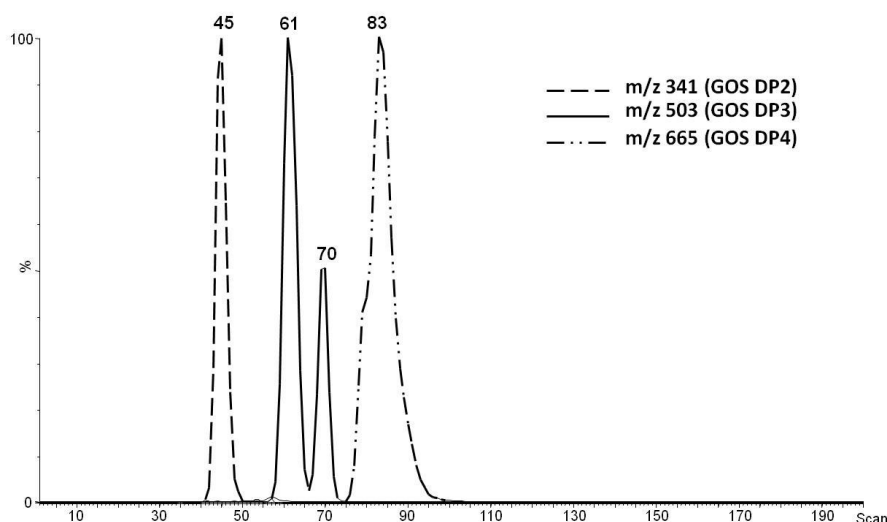
Na ESI-MS spektaru jasno se može videti da transgalaktozilacijom pomoću dobijenog enzima, slično kao i u slučaju komercijalnog enzima iz *A. oryzae*, ne nastaju galakto-oligosaharidi većeg stepena polimerizacije od tetrasaharida DP2 ([M-H]⁻, m/z 341), DP3 ([M-H]⁻, m/z 503) i DP4 ([M-H]⁻, m/z 665).



Slika 4.46. ESI-MS spektar galakto-oligosaharida sintetsanih pomoću β -galaktozidaze iz *A. oryzae* snimljen u negativnom režimu

Da bi se detaljnije odredila struktura pojedinačnih jedinjenja i izdvojili strukturni izomeri, uzorci su dalje podvrgnuti analiziranju već opisanom IMS-MS/MS metodom. Tom prilikom je utvrđeno da se u smeši jedinjenja pojavljuje samo jedan izomer disaharida ($dt=45$), dva izomera trisaharida ($dt=61$ i $dt=70$) i jedan izomer tetrasaharida ($dt=83$). Izdvojeni pikovi prikazani su na slici 4.46, a njihovi MS/MS spektri na slici 4.47. Kada se na ove spektre primene pravila nomenklature fragmentacija Domona i Kostela za glukokonjugate,³³⁷ a identifikacija veza isvrši na bazi fragmentacionih pravila opisanih u ranijim radovima^{324, 325} dolazimo do zaključka da prisutni disaharid u ispitanoj reakcionoj smeši ne predstavlja molekul laktoze, već jedinjenje kod koga je galaktoza vezana β -(1 \rightarrow 6) vezom za redukujući kraj druge heksoze (β -Gal(1 \rightarrow 6)-Hex). Ovo je značajna razlika u odnosu na galakto-oligosaharide dobijene u reakciji sa β -galaktozidazom iz *A. oryzae*, koji se uglavnom sastoje iz GOS3 i GOS4 i kod kojih ne dolazi do nastanka novih disaharida.

Međutim, ovakva jedinjenja prijavljena su i ranije u reakcijama sintetisanim pomoću β -galaktozidaza iz različitih bakterija mlečne kiseline.¹¹⁰⁻¹¹²

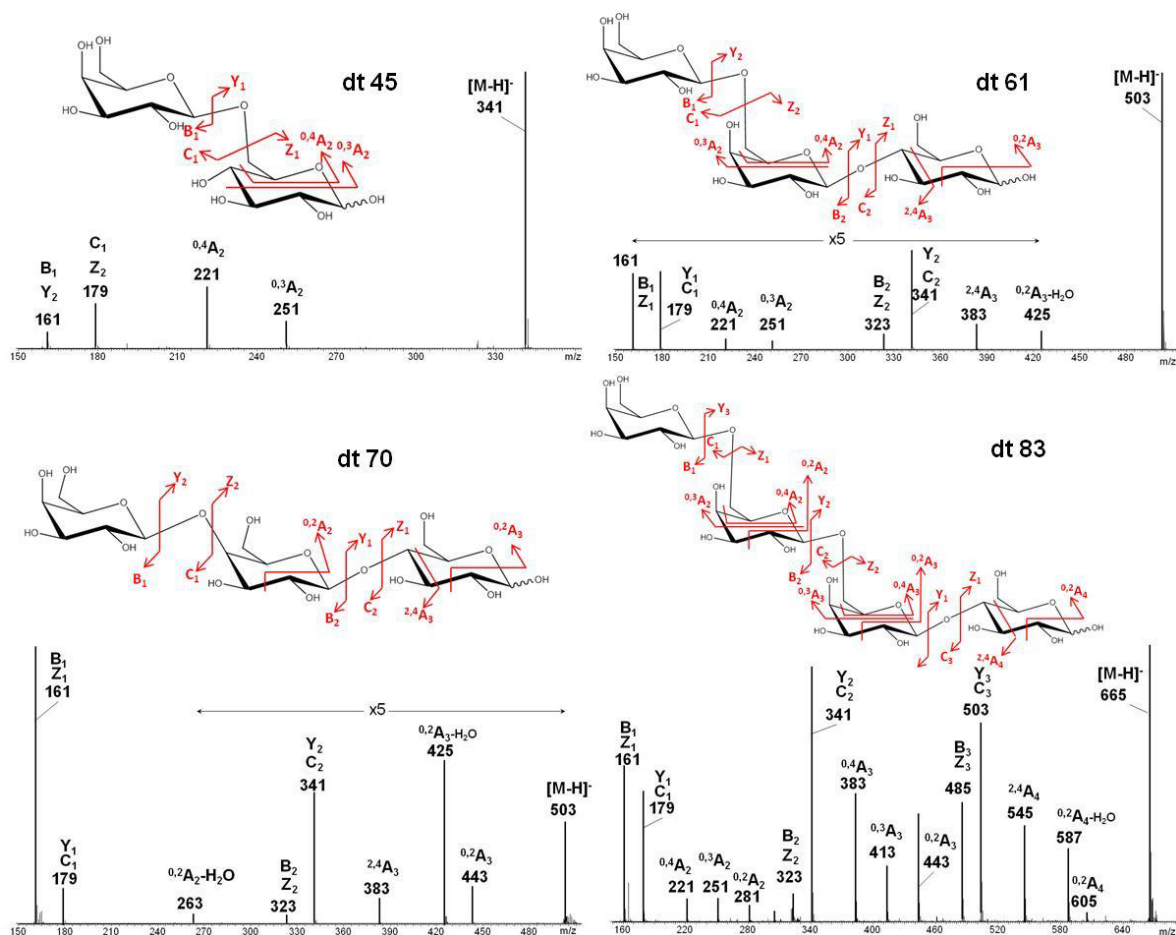


Slika 4.47. Preklopljeni jonski mobilogrami DP2, DP3 i DP4. Najdominantniji maseni izomeri svake vrste prikazani su sa intezitetom od 100%.

Naime, najzastupljeniji disaharid u smeši galakto-oligosaharida predstavlja alolaktoza (β -Gal(1 \rightarrow 6)-Glc). U radu Ikbala (Iqbal) i saradnika, alolaktoza predstavlja 29% ukupnih galakto-oligosaharida dobijenih pomoću β -galaktozidaze iz *L. plantarum*.²³ Ngujen i saradnici, međutim, utvrdili su postojanje više izomera disaharida (alolaktoza, β Gal 1 \rightarrow 6Gal i β Gal 1 \rightarrow 3Gal) u smeši ukupnih galakto-oligosaharida dobijenih pomoću β -galaktozidaza iz *L. reuteri*.²⁷ Udeo ovih disaharida u ukupnim galakto-oligosaharidima iznosio je čak 41,5 i 55,5% za β -galaktozidaze iz *L. reuteri* L103 i L461, redom. Sa druge strane, pomoću β -galaktozidaze iz *L. pentosus* var. *plantarum* identifikovani su samo galakto-oligosaharidi višeg stepena polimerizacije DP3-DP5.¹⁹⁶

Daljom analizom MS/MS spektara našeg uzorka, utvrđeno je da strukturni izomeri trisaharida koji odgovaraju pikovima na $dt=61$ i $dt=70$ predstavljaju β -Gal(1 \rightarrow 6)- β -Gal(1 \rightarrow 4)Hex i β -Gal(1 \rightarrow 4)- β -Gal(1 \rightarrow 4)Hex, redom. I konačno, utvrđeno je da je jedini prisutni tetrasaharid β -Gal(1 \rightarrow 6)- β -Gal(1 \rightarrow 6)- β -Gal(1 \rightarrow 4)-Hex. Imajući ovo u vidu jasno je da je laktoza, budući da nije identifikovana u našem uzorku, evidentno jednim delom potrošena u reakciji hidrolize, kako bi nastali molekuli

galaktoze koji će potom biti vezani na druge molekule, a drugim delom kao gradivna jedinica viših galakto-oligosaharida.

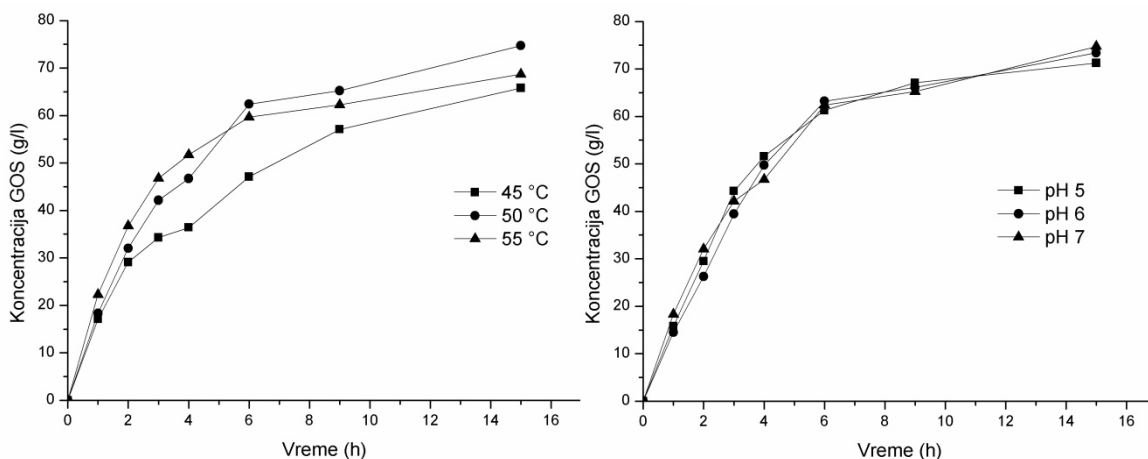


Slika 4.48.. MS/MS spektri GOS2, GOS3 i GOS4

Kao što se za slike 4.47 može videti zastupljeniji je izomer sa galaktozom vezanom β -(1→6) glukozidnom vezom za središnji molekul galaktoze, što verovatno ukazuje na veći afinitet dobijene β -galaktozidaze ka formiranju β -(1→6) veza. Ovakvi rezultati u skladu su sa saznanjima o drugim galaktozidazama iz bakterija mlečne kiseline.^{318, 338} One ne samo da imaju sklonost ka sintezi β -(1→6) veza, već galakto-oligosaharidi sa ovim vezama dokazano selektivno podstiču njihov rast u mešanim kulturama bakterija. Ovo je izuzetno važan podatak, imajući u vidu da je većina dostupnih proizvoda sadrži galakto-oligosaharide sa β -(1→4) vezama.

4.3.2.2. Optimizacija sinteze galakto-oligosaharida pomoću β -galaktozidaze iz *L. acidophilus*

U cilju određivanja optimalnih reakcionih uslova u prvom eksperimentu određen je uticaj temperature i pH na reakciju sinteze galakto-oligosaharida. U prvom eksperimentu temperatura je varirana u intervalu 45-55 °C, dok je u drugom eksperimentu varirana vrednost pH u intervalu pH 5-7.

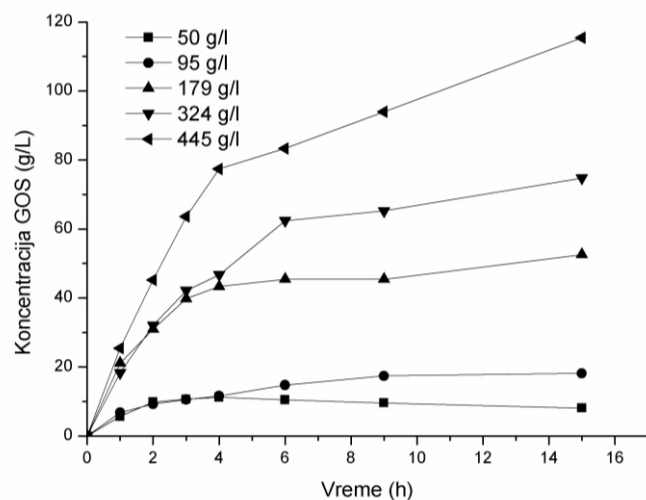


Slika 4.49. Uticaj temperature i pH na reakciju sinteze galakto-oligosaharida

Reakcionu smešu u oba slučaja činio je rastvor laktoze (koncentracije 400 g/l) u sirovom rastvoru enzima. Kao i u slučaju β -galaktozidaze iz *A. oryzae*, pokazalo se da su optimalni uslovi za sintezu galakto-oligosaharida podudarili sa optimalnim vredostima za hidrolitičku aktivnost ovog enzima. Naime, najviši prinos galakto-oligosaharida dobijen je pri optimalnoj temperatura iznosila je 45 °C. Kada je reč o optimalnoj pH vrednosti, imajući u vidu da u opsegu ispitivanih vrednosti pH nije bilo značajnih razlika u prinosu galakto-oligosaharida, dalji eksperimenti će se odvijati pri pH 7 (pH vrednost bezćelijskog ekstrakta), u cilju pojednostavljenja procesa.

Kao i u slučaju komercijalnog enzima evidentno je da sa porastom početne koncentracije laktoze dolazi do favorizovanja reakcije transgalaktozilacije i samim tim do porasta prinosa galakto-oligosaharida. Tako se najviša koncentracija galakto-oligosaharida (115,43 g/l) dobija pri početnoj koncentraciji laktoze od 445 g/l. Ovde je bitno napomenuti da je nemoguće bilo postići više početne

koncentracije laktoze, jer je laktoza rastvarana u tečnom enzimskom preparatu, pa je bilo neizvodljivo izvršiti predtretman izlaganja rastvora visokim temperaturama, kao u slučaju komercijalnog enzima.



Slika 4.50. Uticaj početne koncentracije laktoze na sintezu galakto-oligosaharida

Ukoliko uporedimo maksimalne prinose galakto-oligosaharida (g/l) može se primetiti da je β -galaktozidaza izolovana iz *L. acidophilus* potentniji producent galakto-oligosaharida od komercijalnog preparata iz *A. oryzae*.

4.4. Imobilizacija β -galaktozidaza

Jedan od ciljeva ove doktorske disertacije je bio da se doprinese široj primeni β -galaktozidaza razvijanjem novih metoda imobilizacije i dobijanjem efikasnih i jeftinih imobilisanih preparata, koji bi kasnije bili uspešno upotrebljeni u reakcijama transgalaktozilacije. U toku rada ispitana je mogućnost imobilizacije komercijalne β -galaktozidaze iz *A. oryzae*, kao i dobijene β -galaktozidaze izolovane iz *L. acidophilus* na više nosača primenom različitih tehnika. Primenjene su metode adsorpcije na komercijalne jonoizmenjivačke smole, potom kovalentnog vezivanja na komercijalne makroporozne nosače, nosače dobijene uvođenjem različitih funkcionalnih grupa (modifikacijom sa epihlorhidrinom, cijanuril hloridom, glutaraldehydom, etilendiaminom i glutaraldehydom, kao i cisteinom i glutaraldehydom) i na nanočestice silike modifikovane uvođenjem različitih funkcionalnih grupa (amino i hloridnih). Najveći deo istraživanja i detaljna optimizacija je izvedena sa β -galaktozidazom iz *A. oryzae*, a najvažnija iskustva iz ovog dela istraživanja su primenjena u sledećoj seriji eksperimenata sa ćelijskim ekstraktom *L. acidophilus*. Nakon optimizacije procesa imobilizacije, odabrani imobilisani enzimi ispitani su u reakciji sinteze galakto-oligosaharida.

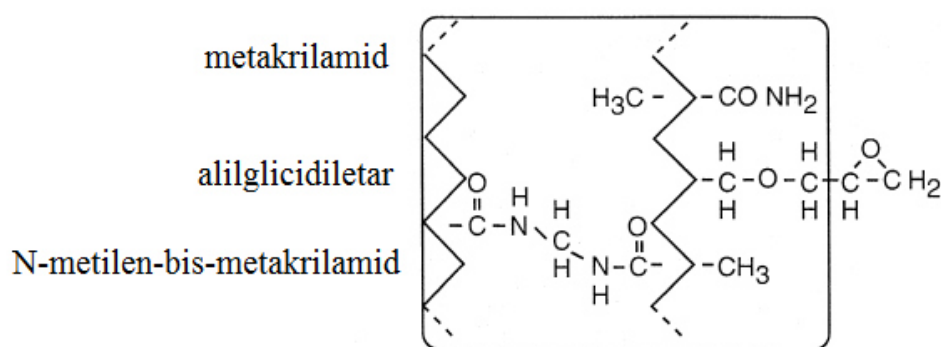
4.4.1. Imobilizacija β -galaktozidaze iz *A. oryzae*

4.4.1.1. Imobilizacija β -galaktozidaze na Eupergit

U prvoj fazi eksperimenata ispitana je imobilizacija na komercijalne nosače Eupergit® C i Eupergit® C 250L, kao i na nosače dobijene njihovom modifikacijom. Eupergit je makroporozni kopolimer metakrilamida, glicidilmetakrilata i alilglicidil etra, umrežen N,N'-metilen-bis(metakrilamidom), sa prosečnom veličinom makroporoznih čestica od 100-250 μm . Zahvaljujući svojoj strukturi, poseduje veliku hemijsku i mehaničku stabilnost. Takođe, ne podleže bubrenju i skupljanju u širokom opsegu pH vrednosti.³³⁹ Smatra se kompatibilnim sa većinom reaktorskih sistema. Na površini ovih nosača nalaze se epoksidne grupe, i to 600 $\mu\text{mol/g}$ nosača (Eupergit® C)³³⁹ i 200 $\mu\text{mol/g}$ nosača (Eupergit® C 250L).³⁴⁰ Upravo preko

ovih grupa nosač reaguje prvenstveno sa amino grupama, ali može reagovati i sa sulfhidrilnim i karboksilnim grupama na enzimu.

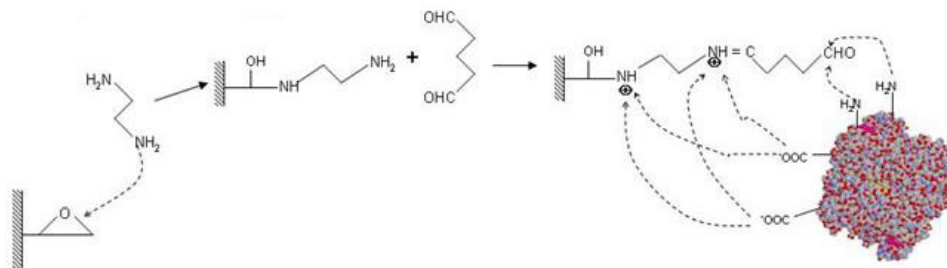
Eupergit je prethodno uspešno korišćen za imobilizaciju β -galaktozidaza iz *Kluyveromyces lactis*,³⁴¹ *K. marxianus*³⁴² i *Bacillus circulans*,^{188,343} međutim nema podataka o imobilizaciji β -galaktozidaza iz *A. oryzae* i *L. acidophilus* (o čemu će biti reči u drugom delu rada). Takođe, u ovim radovima nije ispitana mogućnost modifikacije ovih nosača u cilju postizanja aktivnijih i stabilnijih imobilisanih preparata.



Slika 4.51. Hemijska struktura Eupergit® C³³⁹

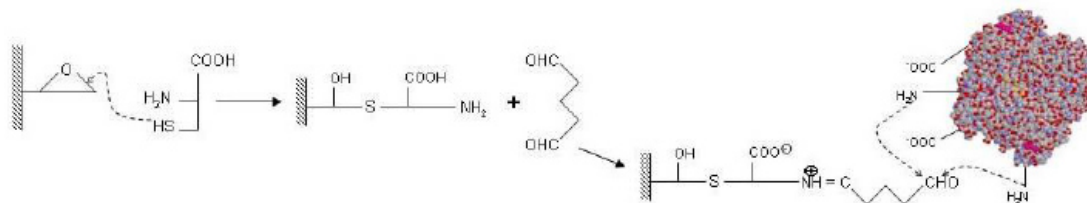
Eupergit je pogodan nosač i za uvođenje drugih funkcionalnih grupa daljim reakcijama sa reaktivnim oksiranskim grupama. U ovom setu eksperimenata ispitana je mogućnost uvođenja karbonilne grupe na površinu ovih nosača, prevashodno zbog visoke stabilnosti koju pokazuju enzimi kovalentno imobilisani na nosače sa karbonilnim grupama. Takođe, modifikacijom nosača dolazi do formiranja veće udaljenosti između enzima i površine nosača uvođenjem „nožice“, što dodatno doprinosi stvaranju aktivnijeg i stabilnijeg imobilisanog preparata.⁵⁵ Uvođenje karbonilne grupe u okviru ovog eksperimenta izvedeno je na dva načina: primenom metode hemijske modifikacije nosača pomoću etilendiamina i glutaraldehida, odnosno cisteina i glutaraldehida. Modifikacija ovih nosača podrazumeva primenu aktivacije nosača pre uvođenja karbonilnih grupa pomoću glutaraldehida. U slučaju EDA-GA modifikacije, aktivacija se odvija pomoću etilendiamina, čime se na „nožici“ formiraju dve sekundarne amino grupe koje omogućavaju imobilizaciju kovalentnim vezama, ali je neminovna i adsorpcija

enzima elektrostatskim interakcijama jer je površina nosača neto pozitivno naelektrisana zbog prisustva sekundarnih amino grupa (slika 4.52).



Slika 4.52. Šematski prikaz aktivacije nosača sa epoksidnim grupama etilendijaminom i glutaraldehidom i imobilizacije enzima na modifikovanom nosaču ³⁰²

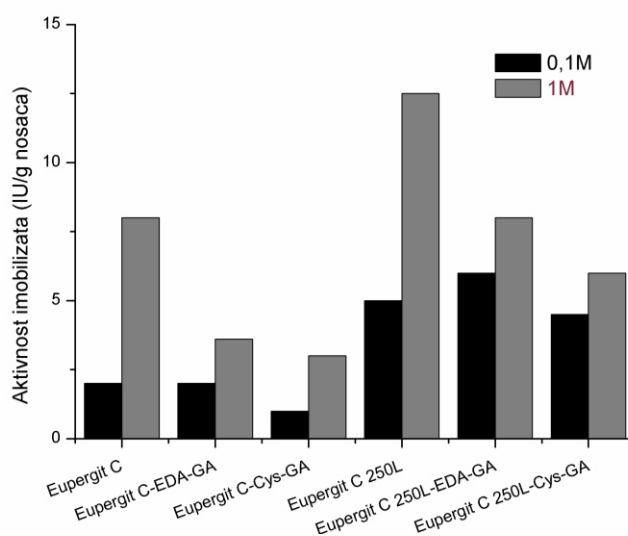
Sa druge strane, aktiviranjem nosača cisteinom (uspostavlja se veza između epoksidne i sulfhidrilne grupe cisteina) na površini ostaje slobodna amino grupa koja reaguje sa glutaraldehidom. Prednost ove metode je u tome što na nožici preostaju jedno pozitivno i jedno negativno naelektrisanje u neposrednoj blizini, čime se suzbija elektrostatsko privlačenje i omogućava isključivo kovalentno vezivanje enzima.



Slika 4.53. Šematski prikaz aktivacije nosača sa epoksidnim grupama cisteinom i glutaraldehidom i imobilizacije enzima na modifikovanom nosaču ³⁰²

Imobilizacija je izvedena pri uslovima prethodno optimizovanim na Katedri za biohemijско inženjerstvo i biotehnologiju: 1 ml rastvora enzima koncentracije 5 mg/ml u 0,1 M ili 1M natrijum-fosfatnom puferu (pH 7) inkubira se sa 20 mg odgovarajućeg nosača na roler šejkeru u toku 24 h na temperaturi od 25 °C. Rezultati dobijenih aktivnosti imobilisanih enzima su prikazani na slici 95. Bolji rezultati, poredeći i nemodifikovane i modifikovane nosače, postignuti su sa Eupergit C 250L nosačem, koji se odlikuje manjom koncentracijom oksiranskih grupa na površini nosača i većim prečnikom pora. ³⁴⁰

Činjenica da se pogodnijim za imobilizaciju pokazao Eupergit C 250L verovatno je posledica većeg prosečnog prečnika pora ovog nosača (100 nm) pošto je β -galaktozidaza iz *A. oryzae* prilično krupan molekul (14,6×14,6×15,3 nm)⁵⁶, pa prečnik pora od 10 nm na Eupergitu C ne omogućava potpuno iskorišćenje površine nosača.



Slika 4.54. Aktivnosti imobilisanog enzima na nemedifikovane i modifikovane komercijalne nosače Eupergit C i Eupergit C 250L

Takođe, kao opšti zaključak može se izvući da je imobilizacija uglavnom bila uspešnija ukoliko se izvodila u puferima veće jonske jačine, što je jako značajno, imajući u vidu da se pri tim uslovima imobilizacije favorizuje formiranje kovalentnih veza između enzima i nosača, što dalje povoljno utiče na stabilnost imobilisanog enzima.

Nedvosmisleno je pokazano, pošto je sličan trend primećen kod Eupergita C i Eupergita C 250 L, da je hemijska modifikacija površine nosača dovela do pada imobilisane enzimske aktivnosti. Pošto i karbonilna i oksiranska grupa najveću reaktivnost pokazuju prema amino grupama na površini enzima, verovatno se ova razlika može pripisati stabilizujućem dejstvu interakcija između enzima i grupa na površini nosača. Najveću aktivnost β -galaktozidaza je pokazala prilikom imobilizacije na nemedifikovane nosače Eupergit C i Eupergit C 250L, redom 8,02 IU/g nosača i 12,54 IU/g nosača. Zbog toga su u nastavku rada ova dva imobilisana enzima isprobana u reakciji sinteze galakto-oligosaharida.

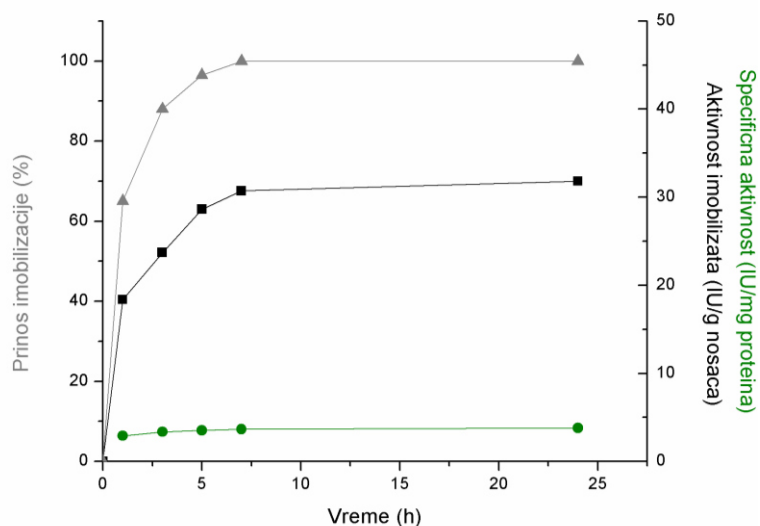
4.4.1.2. Imobilizacija na Purolite® A-109

Purolite® A-109 predstavlja makroporoznu polistirensku jonoizmenjivačku smolu sa slabo baznim funkcionalnim (amino) grupama čija je primarna funkcija uklanjanje organskih materija iz vodenih i organskih rastvora u farmaceutskoj, hemijskoj i prehrambenoj industriji. Shodno tome, možemo zaključiti da je netoksična i biokompatibilna, i da se kao takva može koristiti za imobilizaciju enzima koji će dalje biti korišćeni u sintezi funkcionalnih jedinjenja. Prisustvo slabo bazne primarne amino grupe obezbeđuje veliki kapacitet polimera za neke specifične anjone, ali i veliku sposobnost obnavljanja. Pored značajne hemijske i termičke stabilnosti, Purolite® A-109 se odlikuje i izuzetnim mehaničkim osobinama, kao što su otpornost prema usitnjavanju i osmotskom šoku. Sferičan oblik čestica sa prosečnim prečnikom oko 400 nm, sa aspekta hidrodinamike, čine ga idealnim za upotrebu u različitim reaktorskim sistemima.³⁴⁴

4.4.1.2.1 Adsorpcija enzima na Purolite® A-109

U prvom setu eksperimenata izvedenih u 0,1 M acetatnom puferu (pH 4,5) sa početnom koncentracijom enzima 5mg/ml, ispitana je kinetika adsorpcije na Purolite® A109, praćenjem aktivnosti imobilisanog enzima, prinosa imobilizacije, kao i specifične aktivnosti imobilisanog enzima u toku 24 h. Sa slike 96. može se videti nagli rast prinosa imobilizacije u ranoj fazi imobilizacije (skoro 90% od ponuđenih proteina se adsorbuje već nakon 3 sata), nakon čega dolazi do postepenog usporavanja, i konačno uspostavljanja ravnoteže nakon 7 h. Sličan trend uočava se i kod ostvarene aktivnosti imobilisanog enzima. Najviša aktivnost imobilisanog enzima (33,79 IU/g nosača) postignuta je nakon 7 h, što ukazuje na činjenicu da i u drugom, sporijem stupnju imobilizacije, dolazi do vezivanja enzima u aktivnoj konformaciji. Ovo je dodatno potvrđeno skoro konstantnom vrednoću specifične aktivnosti tokom celokupnog toka imobilizacije. Obzirom da vreme imobilizacije značajno utiče na ispitane faktore, u svim sledećim eksperimentima tokom optimizacije procesa imobilizacije, biće usvojeno vreme trajanja imobilizacije od 7h. U sledećem setu eksperimenata biće ispitani uticaji pH i jonske jačine puferских rastvora na proces imobilizacije. Imajući u vidu da se nosač

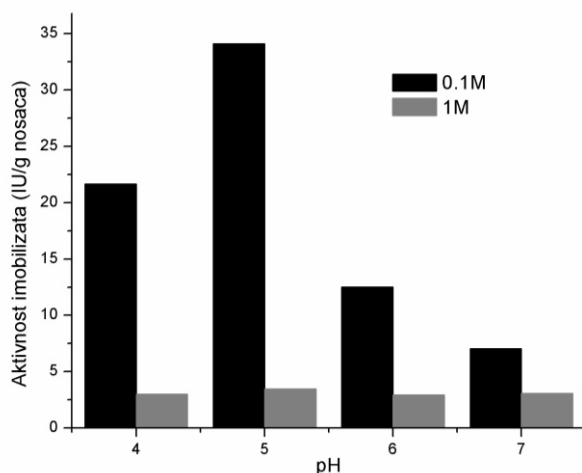
Purolite® A-109 sastoji od hidrofobnog skeleta sa primarnim amino grupama na površini, imobilizacija se može uspostaviti putem različitih mehanizama: formiranjem hidrofobnih interakcija, putem uspostavljanja jonskih i dipol-dipol interakcija i formiranjem vodoničnih veza.



Slika 4.55. Tok imobilizacije β -galaktozidaze: (■) aktivnost imobilisanog enzima (IU/g nosača), (▲) prinos imobilizacije (%) i (●) specifična aktivnost imobilisanog enzima (IU/mg proteina). Imobilizacija je izvođena u 0,1 M acetatnom puferu (pH 4,5) sa početnom koncentracijom enzima 5mg/ml.

Pre svega, može se primetiti (Slika 4.55) da su aktivnosti imobilisanog enzima, u slučaju kada je imobilizacija sprovedena u puferima više jonske jačine u celokupnom ispitanom opsegu (pH 4-7), znatno niže u odnosu na one dobijene pri imobilizaciji u puferima niskog molariteta. Stoga, može se pretpostaviti da do imobilizacije došlo uglavnom uspostavljanjem jonskih interakcija između pozitivno naelektrisanih primarnih amino grupa na nosaču i negativno naelektrisanih karboksilnih grupa na površini enzima, jer je stvaranje ovih interakcija favorizovano u uslovima niske jonske jačine. U cilju potvrde ove hipoteze, u nastavku rada izvršena je desorpcija imobilisanog enzima pomoću 1M rastvora CaCl_2 i 1% rastvora Triton X-100 (Slika 4.57). Kao što je i pretpostavljeno, desorpcijom pomoću rastvora visoke jonske jačine (CaCl_2) došlo je do spiranja 80% aktivnosti sa imobilisanog enzima, što je posledica narušenih elektrostatičkih interakcija, čime smo dokazali da se imobilizacija skoro isključivo odvija po ovom

mehanizmu. Nakon desorpcije surfaktantom (Triton X-100), aktivnost na imobilisanom enzimu je ostala gotovo nepromenjena (smanjena je za manje od 3%), čime smo dokazali da uprkos izraženoj hidrofobnoj prirodi nosača, nije došlo do hidrofobne adsorpcije enzima.

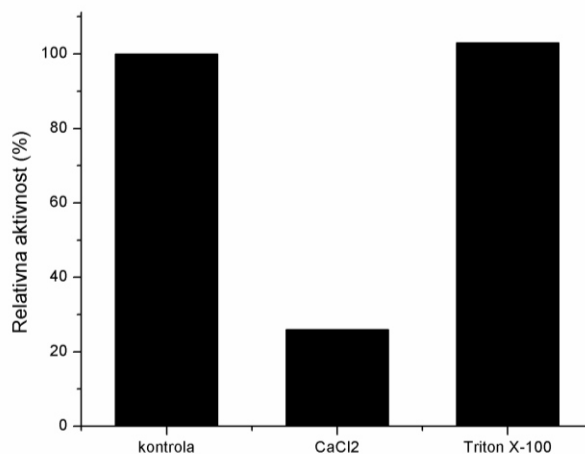


Slika 4.56. Uticaj jonske jačine i pH pufera u kome se izvodi imobilizacija na ostvarenu aktivnost imobilisanog enzima (IU/g nosača). Imobilizacija je izvedena sa početnom koncentracijom enzima 5 mg/ml u toku 7h.

U skladu sa ovim rezultatima, jasno je da će uticaj pH u slučaju izvođenja imobilizacije u puferima niske jonske jačine biti signifikantan (Slika 4.56), jer da bi došlo do interakcija sa pozitivno naelektrisanim funkcionalnim grupama na nosaču, enzim mora biti negativno naelektrisan, što se dešava kada je pH iznad izoelektrične tačke enzima. Stoga, prva pretpostavka je da enzim β -galaktozidaza iz *A. oryzae*, čija je izoelektrična tačka oko 4,6, interaguje sa pozitivno naelektrisanim primarnim amino grupama, ukoliko se imobilizacija izvodi u puferima čiji je pH iznad 4,6.³⁴⁵

Maksimalna dobijena aktivnost imobilisanog enzima u ovom eksperimentu (34,1 IU/g nosača) postiže se pri imobilizaciji na pH 5, nakon čega vezana aktivnost drastično opada. Ovakav rezultat u skladu je sa literaturnim podacima, koji prijavljuju da se maksimalna zadržana aktivnost jonskom adsorpcijom na različitim nosačima postiže u opsegu između pH 4 i pH 5, što je objašnjeno ne samo vezivanjem velikih količina enzima, već i vezivanjem enzima u aktivnim konformacijama.^{236, 239}

Dakle, jasno je da uticaj naelektrisanja enzima u celosti nije jedini faktor koji doprinosi efikasnosti imobilizacije, jer raspored naelektrisanih ostataka aminokiselina na površini enzima takođe doprinosi efikasnosti imobilizacije, diktirajući orijentaciju vezivanja enzima. Stoga, uticaj pH pufera na efikasnost procesa imobilizacije može se detaljnije objasniti sa aspekta rasporeda ostataka amino kiselina, relevantnih za adsorpciju, na površini enzima. (Slika 99.)

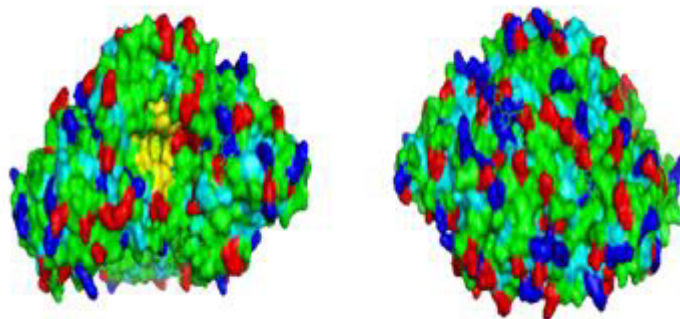


Slika 4.57. Desorpcija enzima izvedena u prisustvu 0,1M rastvora CaCl₂ i 1% Triton X-100

Pošto je površina nosača pozitivno naelektrisana u celokupnom ispitivanom opsegu pH, zbog postojanja primarnih amino grupa, može se pretpostaviti da efikasnost procesa imobilizacije zavisi od broja i rasporeda negativno naelektrisanih ostataka aminokiselina na površini enzima, ali i svojstva grupa prisutnih u njihovoj blizini, pri različitim pH vrednostima. Na osnovu prethodnih saznanja o pK vrednostima jonizujućih grupa u proteinima, može se pretpostaviti da će asparaginski i glutaminski ostaci biti naelektrisani u celom ispitivanom opsegu pH vrednosti.³⁴⁶⁻³⁵⁰ Prosečne pK vrednosti ovih ostataka su oko 4, međutim bitno je istaći da pK vrednosti pojedinačnih ostataka mogu varirati u širokom opsegu pK (1-9) u zavisnosti od efekata okoline. Na primer, pK vrednosti rastu u slučaju hidrofobne okoline, što se obično dešava kada su zaklonjene u unutrašnjosti proteina³⁴⁶. Sa druge strane, prisustvo pozitivno naelektrisanih grupa dovodi do smanjenja pK karboksilnih grupa.

Ukoliko ove podatke, koji ukazuju na diferencijaciju pK vrednosti kiselih aminokiselinskih ostataka, primenimo na analizu gustine pojedinih

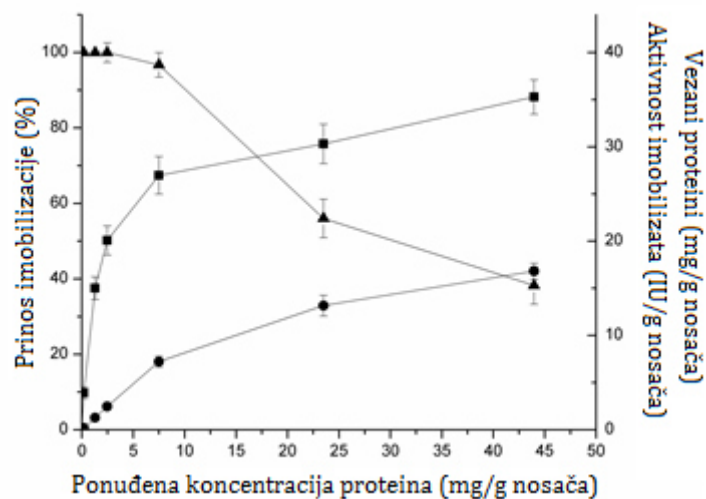
aminokiselinskih ostataka na površini β -galaktozidaze iz *A. oryzae* pomoću programa PyMol, možemo objasniti način vezivanja enzima za nosač pri različitim pH vrednostima.



*Slika 4.58. Raspored baznih (Lys i Arg), kiselih (Asp i Glu) i hidrofobnih (Phe, Tyr, Val, Leu i Ile) ostataka na površini β -galaktozidaze iz *A. oryzae*. Bazni ostaci su označeni plavom, kiseli crvenom, hidrofobni svetlo plavom, aktivni centar žutom. (a) frontalna projekcija, (b) projekcija dobijena rotacijom za 180°.*

Prvo, karboksilne grupe u regionu nasuprot aktivnom centru nalaze se na površini i okružene su brojnim amino grupama (Slika 4.58), što dalje implicira da su njihove pK vrednosti niže od četiri, odnosno da su one negativno naelektrisane u okviru celog ispitanog opsega pH. Međutim, postojanje amino grupa u velikom broju u njihovoj okolini donekle ometa proces vezivanja. Sa druge strane, u okolini aktivnog centra gustina karboksilnih ostataka je znatno veća nego amino grupa, ali je takođe i njihova okolina hidrofobnija, što dovodi do porasta u vrednostima pK ovih grupa iznad prosečnih vrednosti. Stoga, moguće je da su ove grupe naelektrisane tek pri pH vrednostima iznad 5, i u tom slučaju vezivanje enzima se može ostvarti preko ovog regiona, zahvaljujući nedostatku odbojnih sila, zbog male koncentracije amino grupa. Iako postoji mogućnost davezivanjem enzima za nosač na ovaj način dođe do zaklanjanja aktivnog centra i smanjenja aktivnosti imobilisanog enzima, rezultati i prethodna razmatranja upućuju na zaključak da je ovakva orijentacija vezivanja enzima pogodna za njegovu aktivnost. U skladu sa ovim rezultatima, utvrđeno je da je optimalan pufer za imobilizaciju niske jonske jačine i pH 5, čega ćemo se pridržavati u narednim eksperimentima.

U narednom eksperimentu ispitan je uticaj koncentracije ponuđenih proteina na efikasnost procesa imobilizacije. Kao i u prethodnim eksperimentima, praćeno je nekoliko parametara: aktivnost imobilisanog enzima (IU/g nosača), prinos imobilizacije (%) i koncentracija vezanih proteina (mg/g nosača).



Slika 4.59. Uticaj ponuđene koncentracije proteina na: (■) aktivnost imobilisanog enzima (IU/g nosača), (▲) prinos imobilizacije (%) i (●) koncentraciju vezanih proteina (mg/g nosača). Imobilizacija je izvođena u 0,1 M acetatnom puferu (pH 5)

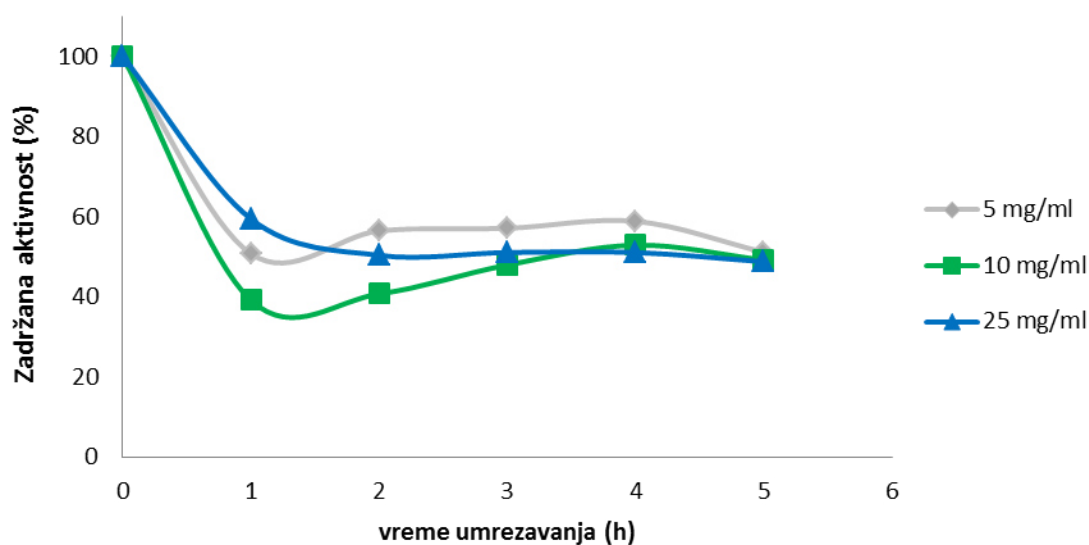
Kao što se sa slike 4.59 može videti, ponuđena koncentracija proteina pokazuje značajan uticaj na svaki od ispitanih faktora. Naime, sa povećanjem ponuđene koncentracije proteina dolazi do porasta aktivnosti imobilisanog enzima i koncentracije proteina na nosaču u celom ispitanom opsegu. U početku (do ponuđene koncentracije proteina od 10 mg/g nosača), javlja se nagli porast u aktivnosti imobilisanog enzima, nakon čega se ovaj rast usporava. U skladu sa ovim rezultatima, primetan je i drastičan pad u prinosu imobilizacije nakon ponuđenih 10 mg/g nosača. Dalje povećanje koncentracije ponuđenog proteina dovodi do značajnog smanjenja efikasnosti imobilizacije, što se verovatno može povezati sa približavanjem koncentraciji zasićenja proteina na nosaču, što verovatno iznosi oko 20 mg/g nosača (Slika 4.59).

Poređenjem rezultata imobilizacije na Eupergit i Purolite (slike 4.52 i 4.57) može se zaključiti da je makroporozna polistirenska jonoizmenjivačka smola Purolite A-109 pogodniji nosač za imobilizaciju β -galaktozidaze iz *A.oryzae* jer se postižu

značajno veće aktivnosti imobilisanog enzima. Iz tog razloga je dalji tok istraživanja posvećen unapređenju imobilizacije enzima na ovaj nosač. Rezultati prethodnih istraživanja ukazuju da se najbolji rezultati postižu adsorpcijom enzima u 0,1 M natrijum-acetatnom puferu na pH 5 nakon sedam sati dobija izuzetno aktivan imobilisan enzim. Međutim, uprkos visokoj aktivnosti dobijenog imobilisanog preparata i brojnim pozitivnim stranama imobilizacije adsorpcijom na čvrste nosače, usled postojanja slabih veza između nosača i enzima, postoji mogućnost desorpcije enzima sa nosača u realnim radnim uslovima. Stoga, u nastavku rada su, sa ciljem ispunjenja ključnog cilja imobilizacije, postizanja zadovoljavajuće stabilnosti imobilisanog preparata, primenjene različite metode: modifikacija enzima ili nosača u cilju uvođenja funkcionalnih grupa pomoću kojih može doći do uspostavljanja kovalentne imobilizacije ili naknadnog umrežavanja adsorbovanog enzima pomoću glutaraldehida.

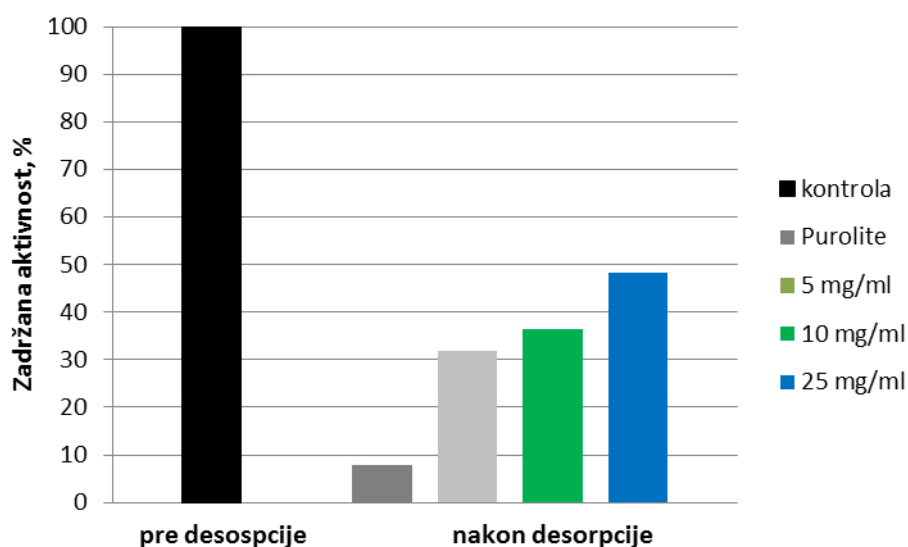
4.4.1.2.2. Umrežavanje enzima glutaraldehydom posle imobilizacije

Pošto je pregledom literature ustanovljeno da se jednostavnim umrežavanjem pomoću različitih bifunkcionalnih agenasa (na primer, glutaraldehida) može značajno povećati stabilnost enzima adsorbovanih na različitim nosačima, ova strategija je primenjena i u ovom radu.^{239, 345, 351}



Slika 4.60. Uticaj koncentracije glutaraldehida i vremena umrežavanja na aktivnost imobilisanog enzima

Imobilisan enzim dobijen adsorpcijom, na način opisan u prethodnom poglavlju, tretirani su glutaraldehydom različitih koncentracija (5 mg/ml, 10 mg/ml i 25 mg/ml) u neutralnoj sredini, kako ne bi došlo do sporednih reakcija, ³⁴⁵ u toku 5 h. Kao što se sa slike 4.60 može videti, efekti umrežavanja postižu se već nakon jednog sata, a dalji tretman nema naročitog uticaja na aktivnost imobilisanog enzima. Koncentracija glutaraldehyda, u analiziranom opsegu nije pokazala veliki uticaj pošto se aktivnost imobilisanih enzima u sva tri slučaja smanjila za oko 50%.



Slika 4.61. Relativna aktivnost nakon tretmana glutaraldehydom (1h) i desorpcije CaCl_2

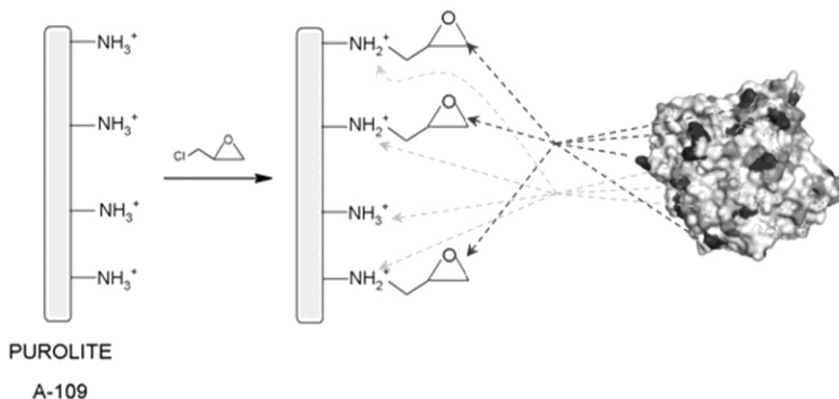
Međutim, uticaj koncentracije glutaraldehyda pokazao se kao izuzetno značajan sa aspekta zadržane aktivnosti nakon desorpcije enzima kalcijum hloridom. Naime, relativna aktivnost nakon desorpcije u uzorcima umreženih pri manjim koncentracijama glutaraldehyda je između 30 i 35%, dok se nakon tretmana sa 25 mg/ml povećava ukupna zadržana aktivnost na 50%. U svakom slučaju jasno je vidljivo da tretman glutaraldehydom vrlo pozitivno utiče na stabilnost imobilisanog enzima, jer je u kontrolnom uzorku koji nije tretiran glutaraldehydom nakon desorpcije zadržano manje od 10% početne aktivnosti.

U nastavku rada imobilizat dobijen adsorpcijom enzima na Purolite A-109 i tretiran glutaraldehydom koncentracije 25 mg/ml u toku 1 h biće primenjen u reakciji sinteze galakto-oligosaharida.

4.4.1.2.3. Kovalentna imobilizacija na modifikovane derivate Purolite® A-109

Kao što je u prethodnim poglavljima već rečeno, usled nedovoljne jačine uspostavljenih veza između enzima i nosača, može doći do značajnog gubitka aktivnosti enzima u toku rada usled neminovnog spiranja enzima. Kako bi se ovaj proces predupredio, neophodno je omogućiti ostvarivanje što čvršće veze između enzima i nosača. Nekada je ovo nemoguće uraditi sa postojećim nosačima, usled nedostatka odgovarajućih funkcionalnih grupa na površini nosača koje mogu stupiti u reakciju sa funkcionalnim grupama na enzimu i obezbediti bolje i stabilnije vezivanje. U tu svrhu razvijene su brojne metode hemijske modifikacije nosača za uvođenje različitih funkcionalnih grupa na površinu nosača za imobilizaciju.

U ovoj disertaciji primenjeno je nekoliko različitih metoda hemijske modifikacije Purolite A-109 u cilju uvođenja različitih funkcionalnih grupa (epoksi, hloridnih, karbonilnih) koje će omogućiti kovalentnu imobilizaciju enzima β -galaktozidaze.

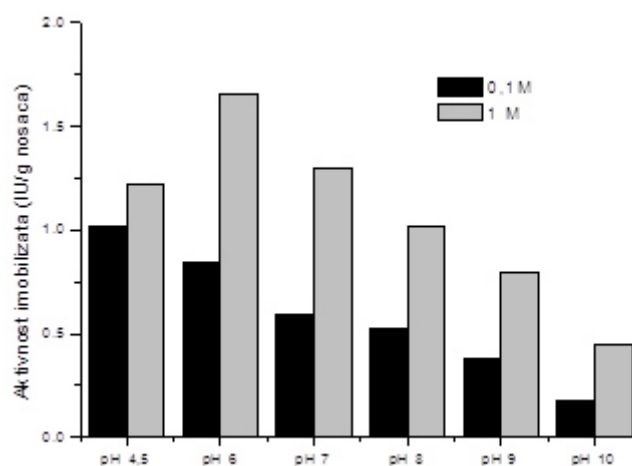


Slika 4.62. Proces modifikacije Purolite A-109 u cilju uvođenja epoksi grupa na površinu nosača i imobilizacije β -galaktozidaze. Svetlo sivom bojom označene su karboksilne, a tamno sivom amino grupe na enzimu.

U prvom setu eksperimenata primenjena je metoda hemijske modifikacije nosača Purolite A-109 epihlorhidrinom. Cilj aktivacije nosača epihlorhidrinom je da se amino grupe, kojima je bogata površina nosača, zamene epoksi grupama. Ova modifikacija je ranije optimizovana i opisana na Katedri za Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju, pri čemu je utvrđeno da koncentracija uvedenih

epoksi grupa iznosi 563 $\mu\text{mol/g}$ nosača. ³⁴⁴ Modifikovani nosač potom može reagovati sa primarnim amino grupama proteina, ali isto tako i sa sulfhidrilnim, karboksilnim, kao i sekundarnim amino grupama. Na taj način se između nosača i enzima mogu uspostaviti prave kovalentne hemijske veze koje dovode do povećanja stabilnosti imobilisanog enzima. Kako ovaj nosač do sada nije bio ispitan za imobilizaciju β -galaktozidaze iz *A. oryzae*, ispitali smo uticaj različitih faktora (pH i jonska jačina rastvora, ponudjena koncentracija enzima, trajanje imobilizacije) na proces imobilizacije.

Stoga je u prvom eksperimentu ispitan uticaj pH i jonske jačine u imobilizaciji na epoksi-Purolite. Naime, nakon modifikacije nosač pored uvedenih epoksidnih grupa na površini sadrži neproreagovale amino grupe, kao i sekundarne amino grupe nastale nakon vezivanja epihlorhidrina (Slika 4.63).

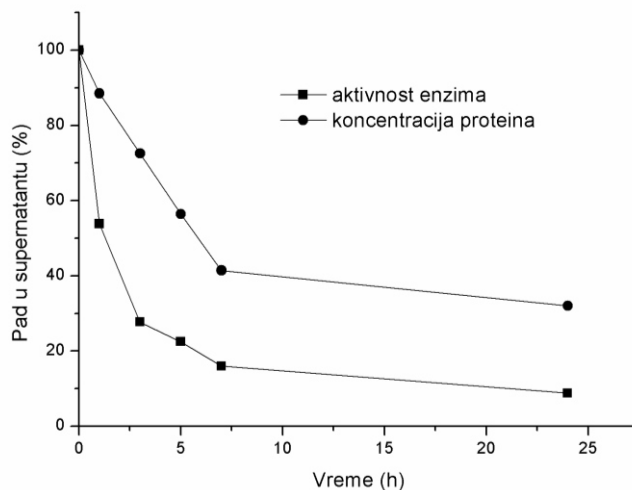


Slika 4.63. Uticaj pH i jonske jačine rastvora na imobilizaciju β -galaktozidaze nakon 24h.

Imobilizacija je izvršena pri početnoj koncentraciji enzima 5 mg/ml

Poznato je da se imobilizacija na ovakve epoksi nosače odvija u dva koraka: u prvom koraku dolazi do adsorpcije enzima putem amino grupa na površini nosača, koje u drugom koraku omogućavaju lakše formiranje kovalentnih veza između epoksi grupa nosača i reaktivnih (najčešće amino) grupa enzima. ³⁵² Ukoliko se imobilizacija vrši pri višim jonskim jačinama, ova jonska adsorpcija u prvom koraku će biti suzbijena, a nasuprot njoj biće favorizovana hidrofobna adsorpcija, kao prethodnica kovalentne imobilizacije. Imobilizacija je u tu svrhu izvršena u različitim 0,1M i 1M puferima (pH 4,5-10), a tokom procesa imobilizacije merene

su aktivnosti i koncentracije proteina u supernatantu i na imobilisanom preparatu. Međutim, aktivnost imobilisanog enzima, u svim eksperimentima, pa čak u u najboljem slučaju (1M fosfatni pufer pH 6) bila je drastično niža nego u eksperimentu sa nemodifikovanim nosačem Purolite A-109.

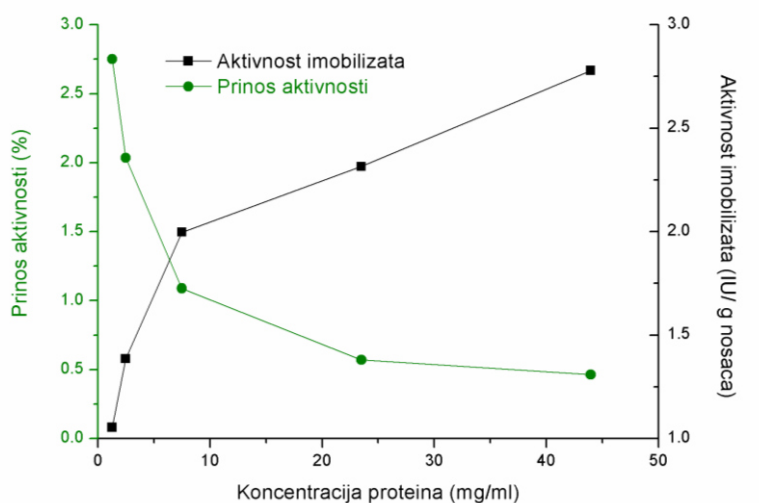


Slika 4.64. Pad aktivnosti i proteina u supernatantu tokom imobilizacije na epoxy-Purolite. Imobilizacija je izvođena u 1 M fosfatnom puferu (pH 6)

Kada se pogledaju profili pada proteina u aktivnosti u supernatantu na pH 6 (Slika 4.64) tokom imobilizacije, može se zaključiti da do značajnog vezivanja enzima za nosač dolazi, ali mala izmerena aktivnost imobilisanog enzima verovatno potiče od stvaranja neželjenih interakcija ili veza koje nepovoljno utiču na konformaciju enzima i smanjuju njegovu aktivnost.

Daljim povećavanjem ponuđene koncentracije proteina, nije postignuto značajno povećanje aktivnosti imobilisanog enzima (Slika 4.65). U svakom slučaju, dobijena aktivnost imobilisanog enzima je jako mala u odnosu na nemodifikovani Purolite. U nastavku rada, ispitana je mogućnost uvođenja karbonilne grupe na površinu dobijenog epoksi nosača. Uvođenje karbonilne grupe je izvedeno na dva načina: primenom metode hemijske modifikacije nosača pomoću etilendiamina i glutaraldehyda (Slika 4.52), odnosno cisteina i glutaraldehyda (Slika 4.53), kao što je opisano u prethodnom poglavlju. Međutim, kao i u slučaju imobilizacije na modifikovane nosače Eupergit C i Eupergit C 250L, aktivnost je bila zanemarljiva.

U sledećoj seriji eksperimenata primenjena je metoda hemijske modifikacije nosača Purolite® A-109 cijanurilhloridom. Osnovni cilj ove modifikacije je da susptituisani atomi hlora na površini nosača omoguće stvaranje većeg broja kovalentnih veza između enzima (tiolne, amino ili hidroksilne grupe enzima) i nosača, koje mogu pozitivno uticati na stabilnost imobilisanih enzima.

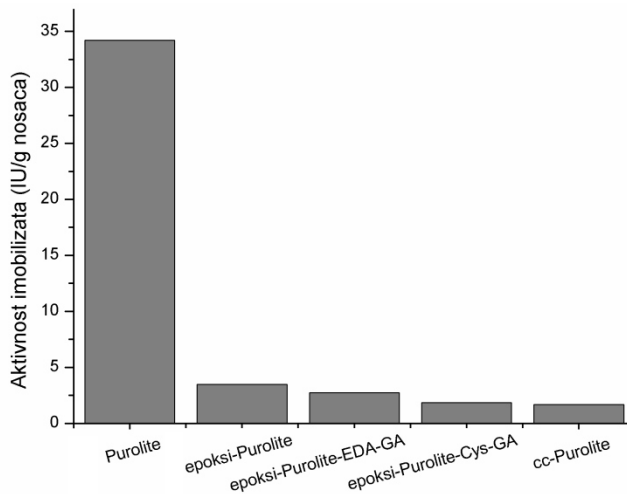


Slika 4.65 Uticaj ponuđene koncentracije proteina na aktivnost imobilisanog enzima (IU/g nosača) i prinos imobilizacije. Imobilizacija je izvođena u 1 M fosfatnom puferu (pH 6)

Uprkos detaljnoj optimizaciji uslova imobilizacije, kao i u prethodno opisanom slučaju postignuta je zanemarljiva aktivnost imobilisanog enzima (2,53 IU/g nosača) u poređenju sa aktivnošću adsorbovanog enzima na nemodifikovani nosač pri sličnim uslovima (33,89 IU/g nosača).

Pretpostavlja se da je imobilizacija enzima na modifikovane nosače bar delimično izvedena putem kovalentne imobilizacije u svim navedenim slučajevima, preko amino grupa na površini enzima, što se pokazalo kao nepoželjno imajući u vidu da je aktivnost imobilisanog enzima bila zanemarljiva (Slika 4.66). Sa druge strane, očigledno je da se imobilizacija enzima na nemodifikovani nosač odvija preko drugog regiona na enzimu, bogatog karboksilnim grupama, što se pokazalo kao poželjno, obzirom da je dobijena visoka aktivnost imobilisanog enzima.

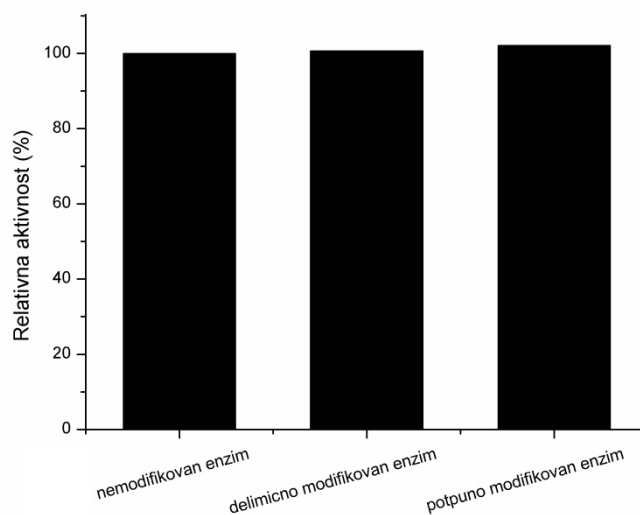
Stoga, u nastavku eksperimentalnog rada primenjen je drugačiji pristup, odnosno modifikacija enzima u cilju uspostavljanja kovalentnih veza i dodatne stabilizacije enzimskog preparata.



Slika 4.66. Imobilizacija na nemodifikovane i modifikovane nosače Purolite A-109

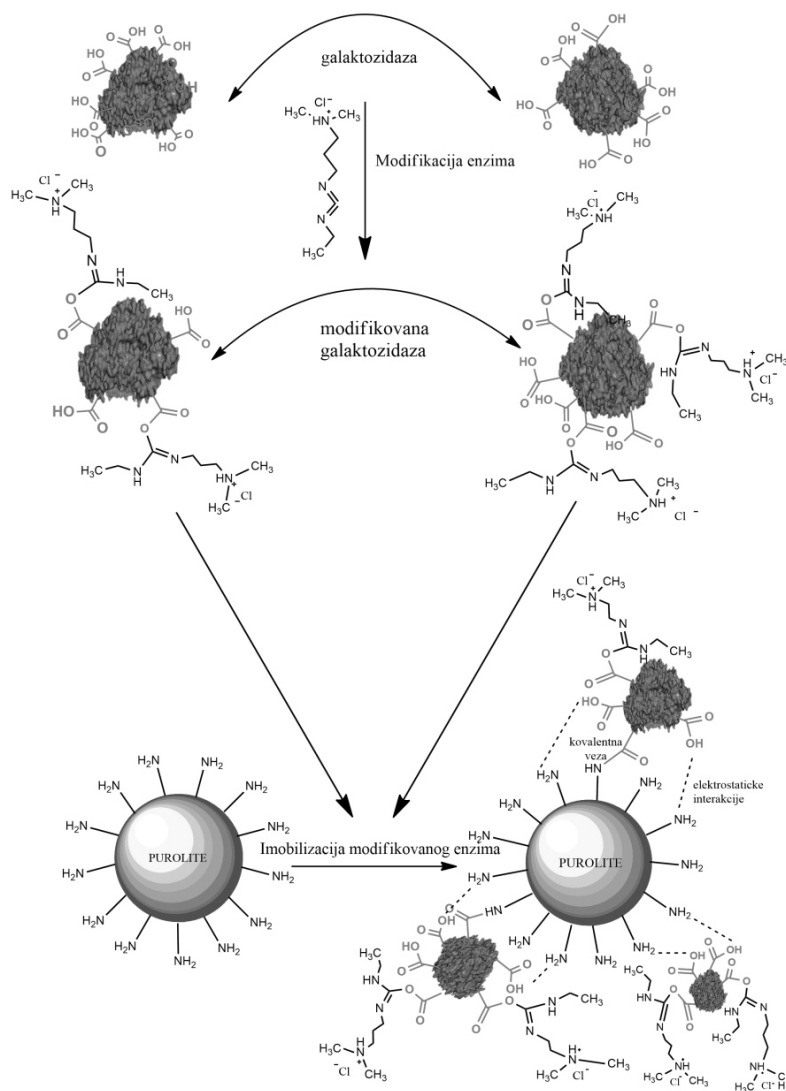
4.4.1.2.4. Kovalentna imobilizacija modifikovanog enzima na Purolite® A-109

U cilju kovalentnog vezivanja enzima za nosač koje će omogućiti istovetnu orijentaciju i vezivanje enzima na nosaču, bilo je potrebno aktivirati karboksilne grupe na enzimu, da bi one mogle da stupe u reakciju sa amino grupama na nosaču. To smo postigli korišćenjem 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimida (EDAC), pri čemu je hemijska modifikacija vršena na pH=4,75 (Slika 4.68).



Slika 4.67. Relativne aktivnosti nemodifikovane i modifikovanih β -galaktozidaza iz *A.oryzae*

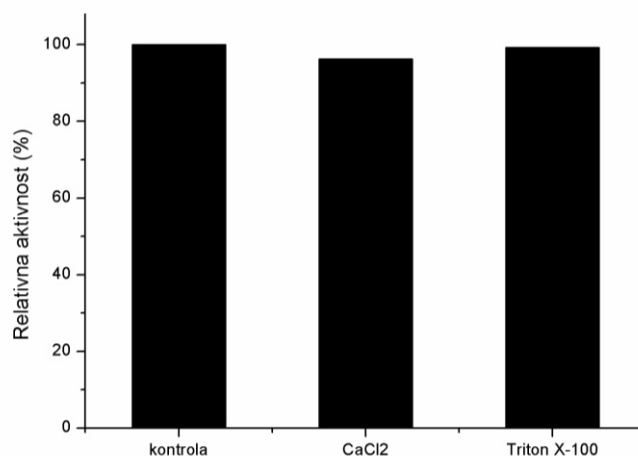
Imajući u vidu da hemijska modifikacija karboksilnih grupa na enzimu može dovesti do značajnog gubitka aktivnosti, u preliminarnom eksperimentu ispitali smo uticaj korišćene koncentracije EDAC-a (10^{-2} M za potpunu modifikaciju i 10^{-3} M za delimičnu modifikaciju) na aktivnost enzima. Sa slike 4.67 jasno se može videti da hemijska modifikacija nije negativno uticala na aktivnost β -galaktozidaze, čak ni u slučaju primene više koncentracije EDAC-a. Stoga, dobijeni enzim sa aktiviranim karboksilnim grupama dalje je primenjen za imobilizaciju na nemodifikovani Purolite A-109.



Slika 4.68. Modifikacija β -galaktozidaze pomoću EDAC-a i njena imobilizacija na Purolite

Nakon izvršene imobilizacije hemijski modificovane β -galaktozidaze na nemodifikovani nosač, pri već određenim optimalnim uslovima za adsorpciju, utvrđeno je da aktivnost imobilisanog modificovanog enzima gotovo identična aktivnosti imobilisanog nemodifikovanog enzima.

U cilju utvrđivanja uspešnosti procesa modifikacije enzima i eventualnog uspostavljanje pravih kovalentnih veza sa nosačem, izvršena je desorpcija, kao i u slučaju adsorbovanog nemodifikovanog enzima. Imobilisani enzim je tretiran rastvorima visoke jonske jačine (1M CaCl_2) i surfaktantima (Triton X-100) radi desorpcije nekovalentno vezanog enzima i merena je aktivnost enzima nakon tretiranja. Tretiranjem rastvorom visoke jonske jačine i rastvorom površinski aktivne supstance, imobilisani enzimi nisu pokazali značajno odstupanje od kontrolnog uzorka. Time je dokazano postojanje jakih i stabilnih veza između nosača i enzima – kovalentnih veza, što nam je i bio cilj. Masa imobilisanog enzima tretirana rastvorom kalcijum-hlorida pokazuje gubitak aktivnosti za oko 5% što ukazuje na minorni uticaj rastvora visoke jonske jačine na kovalentnu vezu, dok masa tretirana rastvorom Triton X-100 ne odstupa od kontrolnog uzorka.



Slika 4.69. Desorpcija enzima izvedena u prisustvu 0,1M rastvora CaCl_2 i 1% Triton X-100

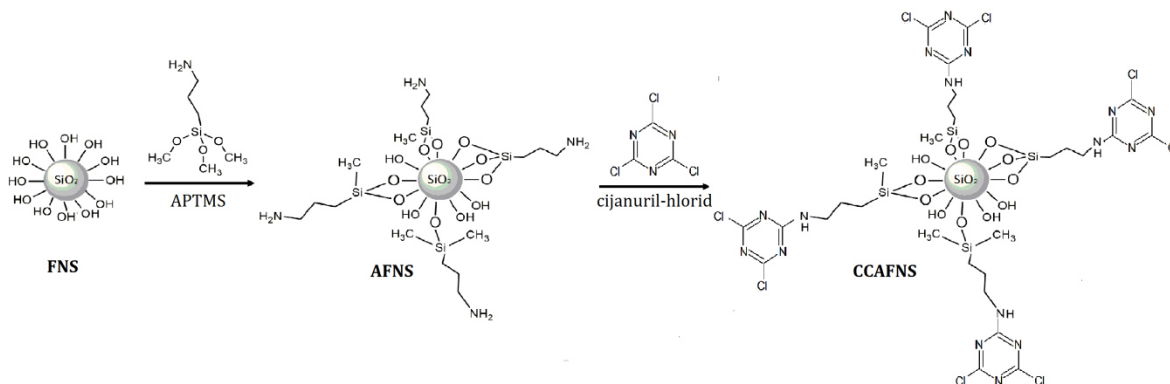
Cilj ovog dela rada bio je da se postigne poboljšanje stabilnosti imobilisanog enzima putem uspostavljanja kovalentne imobilizacije, što je postignuto uvodjenjem jednostavne metode aktivacije karboksilnih grupa na površini enzima. U nastavku rada, obzirom na značajnu aktivnost preparata, ispitaćemo njegovu stabilnost i isprobati u reakciji sinteze galakto-oligosaharida.

4.4.1.3. Imobilizacija β -galaktozidaze iz *A.oryzae* na nano-čestice SiO_2

Poslednjih godina sve više pažnje posvećuje se razvoju nano-materijala, pa se tako sve češće sreće upotreba nano-čestica za imobilizaciju različitih enzima.³⁵³⁻³⁵⁵ Imajući u vidu da silicijum- dioksid predstavlja jedan od najčešće primenjivanih neorganskih materijala u imobilizaciji industrijskih enzima, prevashodno zbog izražene biokompatibilnosti, potom dobrih mehaničkih i termalnih karakteristika, ali i izuzetne otpornosti prema kontaminaciji i organskim rastvaračima, sve veće interesovanje vlada za razvoj nano-čestica silike kao nosača za imobilizaciju enzima. Naime, prednosti nanosilike nad ranije korićenom mezoporoznom silikom su brojne. Generalno, poseduju znatno veću specifičnu površinu koja omogućava vezivanje većih količina enzima i samim tim omogućavaju visoke vrednosti aktivnosti imobilisanog enzima. Potom poseduju uniformniju veličinu i raspodelu pora, ³⁵⁶ osim u slučaju pirogene nanosilike (FNS). Međutim, ovi nedostaci FNS, sa druge strane su nadomešteni izostankom difuzionih limitacija, jer je enzim vezan isključivo za površinu nosača. Takođe, imobilizacija na ove nosače omogućava izraženu stabilizaciju enzima u prisustvu različitih denaturišućih agenasa, visokih temperatura i organskih rastvarača. ³⁵⁶ Uprkos navedenim prednostima imobilizacije na nano-čestice silike, primeri imobilizacije β -galaktozidaze na ovakve čestice su retki. ^{354, 355}

Imajući u vidu inertnost nano-čestica silike, koja preko svojih silanol grupa (Si-OH) sa molekulima enzima može da uspostavi samo slabe vodonične ili elektrostatičke interakcije, neophodno je prvo izvršiti funkcionalizaciju površine silika nano-čestica. Najčešće korišćena metoda funkcionalizacije silike jeste reakcija silanizacije u kojoj se nosač tretira različitim agensima, najčešće aminoalkiltrimetoksi (ili etoksi) silanima u cilju uvođenja reaktivne amino grupe, koja se u narednom koraku može dalje aktivirati različitim agensima (glutaraldehyd, cijanuril-hlorid, tresil-hlorid i drugi) i na taj način omogućiti uvođenje grupa koje mogu dovesti do uspostavljanja kovalentnih veza sa funkcionalnim grupama na površini enzima.

U ovoj disertaciji korićena je pirogena nano-silika Aerosil 380 (FNS). Funkcionalizacija ovih nano-čestica izvedena je u dva koraka: uvođenjem amino-grupe na površinu nosača u reakciji sa 3-aminopropiltrimetoksi-silanom (APTMS), pa potom u drugom koraku aktivacijom amino grupa cijanuril-hloridom (Slika 4.70).

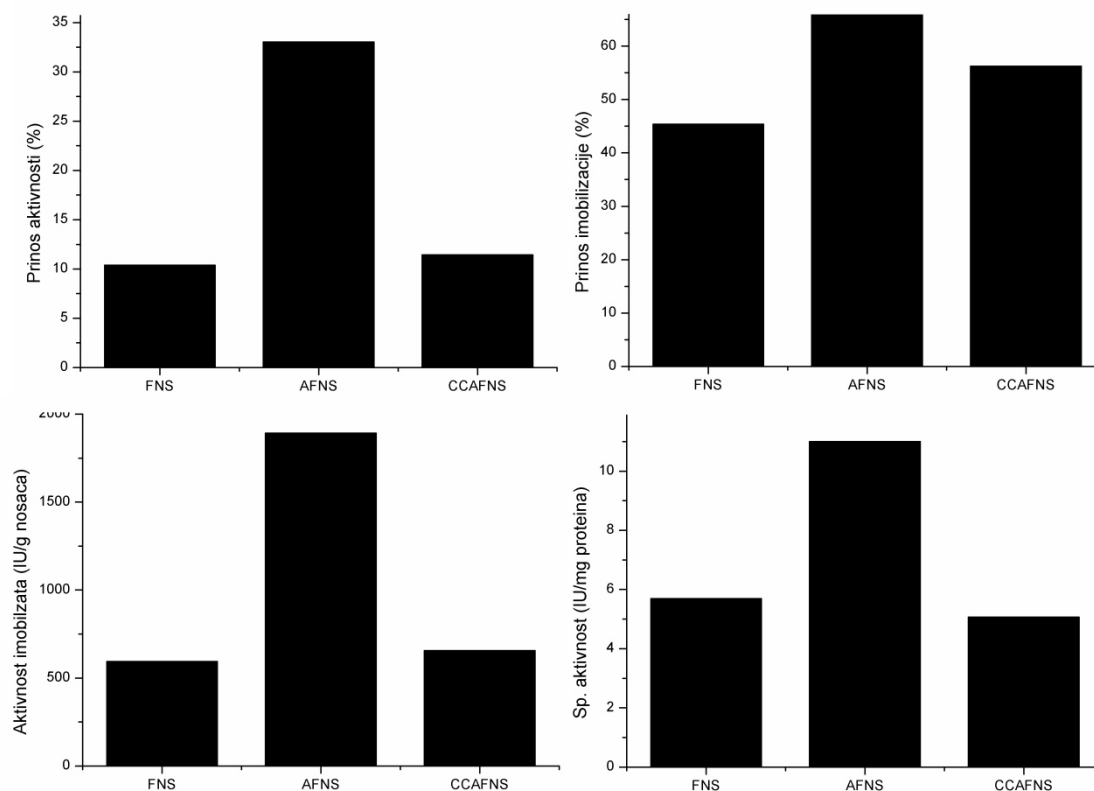


Slika 4.70. Funkcionalizacija pirogene nanosilike u dva koraka: uvođenje amino-grupe na površinu nosača u reakciji sa APTMS-om i aktivacija cijanuril-hloridom

Imobilizacija β -galaktozidaze iz *Aspergillus oryzae* na nemodifikovanu (FNS), amino-modifikovanu (AFNS) i cijanuril-hloridom aktiviranu amino-modifikovanu (CCAFNS) nanosiliku je izvedena pri uslovima optimizovanim ranije na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju (u 0,1 M natrijum acetatnom puferu (pH 4,5), pri ponuđenoj koncentraciji proteina 230 mg/g nosača i u trajanju od 3h). Na slici 112. prikazani su parametri efikasnosti imobilizacije: prinos imobilizacije (%), prinos aktivnosti (%), aktivnost imobilisanog enzima (IU/g nosača), kao i specifična aktivnost imobilisanog enzima (IU/mg proteina).

Kao što se sa slike 4.71 može videti, funkcionalizacija FNS pokazala se opravdanom, jer je u oba slučaja kada je korišćen funkcionalizovan nosač dobijena viša aktivnost imobilisanog enzima, kao i viši prinosi aktivnosti i imobilizacije. Najveća aktivnost enzima dobijena u slučaju kada je korišćen nosač aktiviran samo APTMS-om (1856 IU/g nosača), dakle kada se na površini nalaze amino grupe, što je u skladu sa rezultatima imobilizacije ovog enzima na makroporozne nosače. Sa druge strane, iako značajno manje, aktivnosti enzima imobilisanih na FNS (596 IU/g nosača) i CCAFNS (656 IU/g nosača), pokazuju značajno višu

aktivnost u odnosu na do sada imobilisane makroporozne nosače, što je posledica izuzetno razvijene spoljašnje površine. Kada uporedimo vezane proteine, i specifične aktivnosti na imobilisanom enzimu, može se primetiti da na sva tri ponuđena nosača dolazi do vezivanja značajnih količina proteina (45-70%) proteina



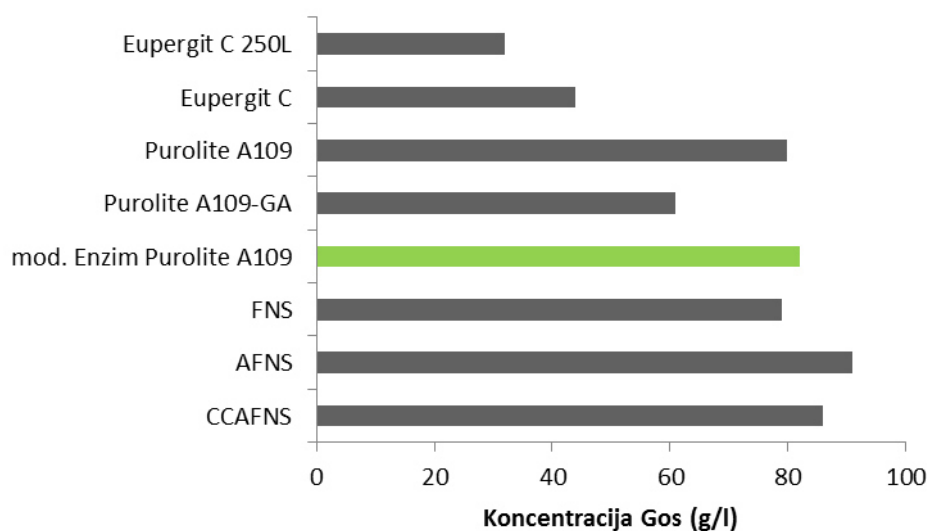
Slika 4.71. Uticaj metode funkcionalizacije nano-silike na parametre imobilizacije β -galaktozidaze iz *A.oryzae*: prinos aktivnosti (a), prinos imobilizacije (b), aktivnost imobilisanog enzima (c) i specifična aktivnost enzima (d)

Međutim, male specifične aktivnosti u slučaju FNS i CCFNS upućuju na činjenicu da oni nisu vezani u svom aktivnom obliku. Međutim, kako su ovi imobilisani enzimi pokazali značajnu hidrolitičku aktivnost, u sledećem koraku efikasnost ovih imobilisanih preparata biće ispitana i u reakciji sinteze galakto-oligosaharida.

4.4.1.4. Selekcija imobilisanog preparata za sintezu galakto-oligosaharida

U prethodnom poglavlju ispitana je mogućnost imobilizacije β -galaktozidaze na nekoliko komercijalnih, modifikovanih i nemodifikovanih, nosača. Nakon detaljne

optimizacije procesa imobilizacije, najaktivniji preparati sa aspekta hidrolitičke aktivnosti ispitani su u reakciji transgalaktozilacije, pri prethodno definisanim optimalnim uslovima za dobijanje galakto-oligosaharida. U svrhu lakšeg poređenja u reakciju je unet isti broj jedinica hidrolitičke aktivnosti (4 IU u reakciji hidrolize *o*-NPG), osim u slučaju imobilisanih preparata nanosilike (FNS, AFNS i CCAFNS) kada je stavljeno 100 mg nosača, kako bi uslovi mešanja bili slični kao kod ostalih imobilisanih enzima. Prinos galakto-oligosaharida (g/l) praćen je u toku 12 h, a grafički su predstavljene maksimalne vrednosti prinosa.



*Slika 4.72. Maksimalan prinos galakto-oligosaharida u reakciji transgalaktzilacije katalizovanom β -galaktozidazom iz *A. oryzae* imobilisanom na različite nosače*

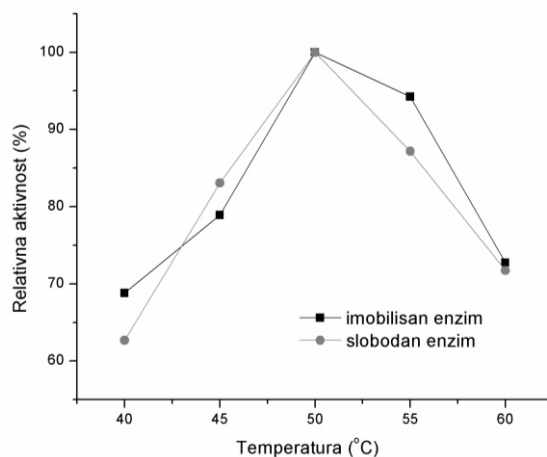
Kao što se sa slike 4.72 može videti, svi odabrani imobilisani enzimi pokazali su određenu transgalaktozilacionu aktivnost. Iako je u reakcije sa imobilisanim preparatima nanosilike uneto daleko više aktivnosti, prinos galakto-oligosaharida bio je među najvišima (80-90 g/l), ali bio je uporediv sa prinosima nekolicine drugih makroporoznih nosača. Naime, Purolite A-109 sa nemodifikovanim enzimom i Purolite A-109 sa modifikovanim enzimom produkovali su gotovo identične koncentracije galakto-oligosaharida (oko 80 g/l). U reakciji sa Purolite A-109-GA, koji predstavlja glutaralhidom dodatno umreženi Purolite A-109, postignut je manji prinos nego kod neumreženog Purolite A-109, što verovatno ukazuje na činjenicu da uvođenjem dodatnog koraka u imobilizaciji (umrežavanjem pomoću glutaraldehyda) dolazi do blokiranja i otežanog prilaska

molekula supstrata aktivnom centru enzima. Najlošije su se pokazali komercijalni epoksi nosači kod kojih se prinos kretao između 30 i 40 g/l. Interesantno je da su kod Eupergit nosača, bez obzira na približno jednaku početnu aktivnost, imobilisani enzimi nisu ispoljili istu transgalaktozilacionu sposobnost. Višu aktivnost ispoljio je Eupergit C (43 g/l), u odnosu na Eupergit C 250L (31 g/l), što je verovatno posledica olakšanog pristupa molekula supstrata enzimu koji je imobilisan na površini nosača, budući da se zbog postojanja jako sitnih pora enzim imobilize isključivo na površinu ovog nosača.

Konačno, kao optimalan imobilisani preparat koji će u nastavku eksperimentalnog rada biti korišćen za reakciju sinteze galakto-oligosaharida u reaktorskim sistemima odabran je preparat dobijen imobilizacijom modifikovanog enzima na jonoizmenjivačku smolu Purolite A-109. Pored visokog prinosa postignutog u ovim preliminarnim eksperimentima, on je izabran i zbog svojih jako povoljnih fizičkih karakteristika (veličina i oblik čestica) koje omogućavaju lakši rad i u šaržnim i u semi-kontinualnim uslovima.

4.4.1.5. Karakterizacija modifikovane β -galaktozidaze imobilisane na Purolite A-109

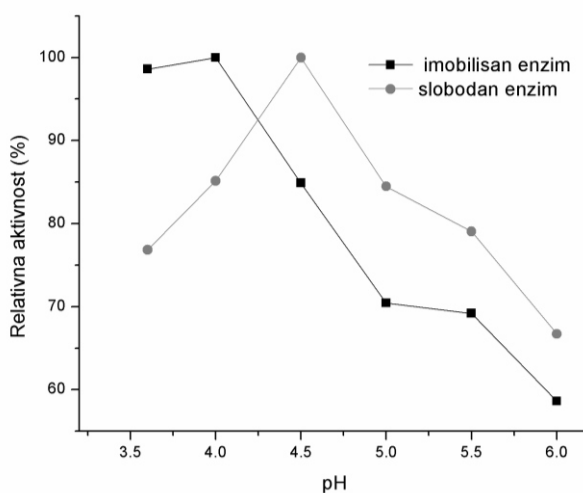
Dobijeni imobilisani preparat koji je odabran u prethodnom poglavlju za korišćenje u sintezi galakto-oligosaharida biće okarakterisan u ovom poglavlju. Imajući u vidu da se imobilizacijom na nosače mikrookolina enzima menja u odnosu na slobodan



Slika 4.73. Temperaturni profil slobodne i imobilisane β -galaktozidaze iz *A.oryzae*

enzim, nije redak sličaj da dođe do promene u karakteristikama enzima poput pH i temperaturnog optimuma. Stoga, u prvom setu eksperimenata biće određene optimalne vrednosti temperature i pH i upoređene sa svojstvima slobodnog enzima. Kao što se sa slike 4.73 može videti, nema razlike u temperaturnim optimumima za slobodnu i imobilisanu β -galaktozidazu iz *A. oryzae*.

Naime, optimalna temperatura u oba slučaja iznosi 50 °C, to je u skladu sa literaturnim podacima za β -galaktozidazu iz *A. oryzae*. Međutim, sa slike 4.73 se takođe može uočiti i neznatno proširenje optimalnog temperaturnog opsega kod imobilisan enzima, koje se najverovatnije javlja kao posledica stabilizacije enzima.

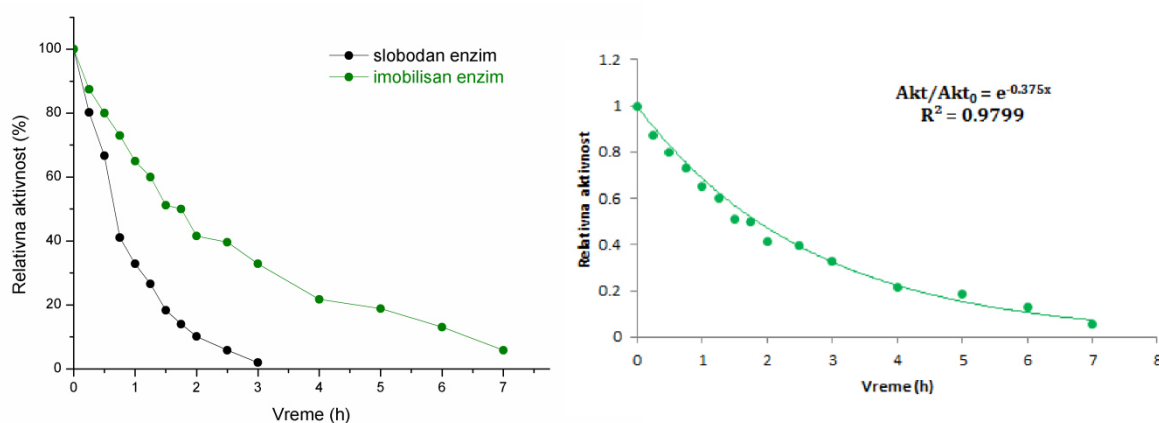


Slika 4.74. pH profili slobodne i imobilisane β -galaktozidaze iz *A.oryzae*

Kada je o pH optimumu reč, sa slike 4.74 se jasno vidi pomeranje temperaturnog optimuma imobilisanog enzima ka kiselijim vrednostima (između pH 3,5 i pH 4), dok je pH optimum slobodnog enzima pH 4,5. Literaturni podaci koji pokazuju slične pojave su retki, češći slučaj su pomeranja optimuma ka baznoj sredini. Recimo, u radu Gurdasa (Gürdaş) i saradnika optimalna vrednost pH imobilisanog enzima pomerena je za 0,5 jedinica ka baznoj sredini.²³⁶ Međutim, Mohi Eldin (Mohy Eldin) i saradnici su u radu prijavili pomeranje pH optimuma kovalentno vezane β -galaktozidaze na amino-funkcionalizovane PVC mikrosferične čestice ka kiseljoj sredini u odnosu na slobodan enzim.³⁵⁷ U svakom slučaju, pomeranje pH optimuma ka kiselijim vrednostima može biti vredan doprinos imobilizacije, imajući u vidu da kiseliji uslovi omogućavaju bolju kontrolu kontaminacije, što je

od izuzetne važnosti kada se radi u protočnim reaktorskim sistemima sa rastvorima visoke koncentracije šećera.

Već je bilo reči o tome da uslove upotrebe enzima u realnim procesima ne ograničavaju samo optimalne vrednosti pH i temperature, već je daleko značajniji podatak o temperaturnoj i pH stabilnosti enzima. Shodno tome, određena je i termička stabilnost imobilisane β -galaktozidaze. Određivanje termostabilnosti slobodnog enzima i imobilisanog preparata vršeno je na 60 °C, shodno prethodnim saznanjima o termostabilnosti β -galaktozidaze iz *A. oryzae*. Sa slike 116.a jasno se može videti da se imobilizacijom dolazi do znatnog povećanja termostabilnost enzima.

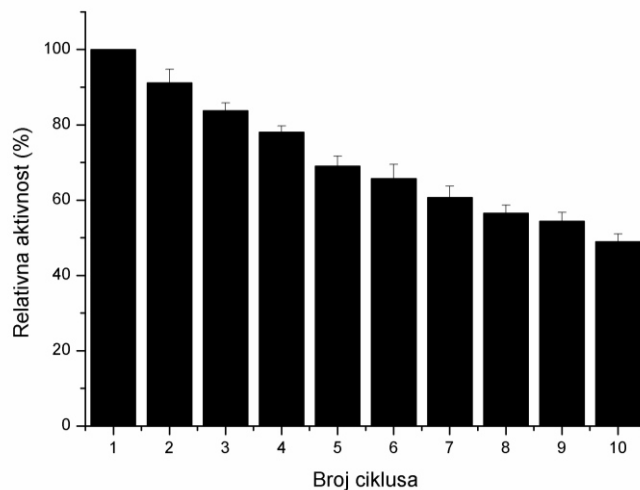


Slika 4.75. Temperaturna stabilnost imobilisane i slobodne β -galaktozidaze iz *A.oryzae* ispitana na 60 °C

Naime, imobilisani preparat se inaktivirao nakon 7 h, dok je inaktivacija slobodnog enzima bila značajno brža (oko 3h). Poredeći vrednosti konstante inaktivacije i vremena polu-života imobilisanog preparata koje iznose 0,375 h⁻¹ i 1,85 h, redom, sa prethodno utvrđenim parametrima za slobodan enzim (1,207 h⁻¹ i 0,57 h), možemo zaključiti da je imobilisani enzim tri puta stabilniji.

Osnovna prednost imobilisanih enzima nad slobodnim enzimima je u tome što se daleko lakše odvajaju iz reakcione smeše i mogu se ponovo upotrebiti. Stoga je ispitivanje operativne stabilnosti enzima, odnosno ispitivanje stabilnosti i mogućnosti ponovnog korišćenja u konsektivnim reakcionim ciklusima važan parametar koji pokazuje valjanost i ekonomsku opravdanost procesa imobilizacije.

Imobilisani preparat testiran je u deset uzastopnih ciklusa sinteze galakto-oligosaharida, pri koncentraciji laktoze 400 g/l u 0,1 M natrijum acetatnom puferu pH 4,5 na temperaturi 50 °C. Relativne vrednosti prinosa galakto-oligosaharida u ovim reakcijama prikazane su grafički (slika 4.76).



Slika 4.76. Operativna stabilnost modifikovanog enzima imobilisanog na Purolite A-109

Kao što se sa grafika može videti, u toku ispitanih deset ciklusa dolazi do gotovo linearnog, ali blagog pada aktivnosti enzima, pa zadržana aktivnost enzima nakon desetog ciklusa iznosi oko 50% početne vrednosti. Na ovom mestu treba napomenuti da je uporedo sa praćenjem prinosa galakto-oligosaharida u konsektivnim reakcionim ciklusima praćena i koncentracija proteina sa ciljem utvrđivanja potencijalnog spiranja enzima sa nosača, odnosno kontaminacije prizvoda proteinom. Međutim, utvrđeno je da do spiranja enzima nije došlo, te da se kontinualno smanjenje aktivnosti pripisati inaktivaciji enzima usled mešanja i postojanja smicajnih sila, o čemu će biti reči u narednim poglavljima.

4.4.2. Imobilizacija β -galaktozidaze iz *L. acidophilus*

4.4.2.1. Imobilizacija na Eupergit, Purolite i nano-SiO₂ nosače

Za razliku od komercijalnog preparata β -galaktozidaze iz *A. oryzae* čija je imobilizacija bila predmet brojnih studija, ^{190, 191, 239, 251, 345, 351, 354} imobilizacija β -galaktozidaze iz *L. acidophilus* do sada nije ispitivana. Takođe, njena struktura još uvek nije razjašnjena u potpunosti, što onemogućava postavljanje različitih

pretpostavki o mogućem rasporedu aminokiselina na površini ovog enzima i potencijalno odgovarajućim nosačima. Stoga, ispitana je imobilizacija na sve prethodno definisane nosače (Poglavlje 5.1). Za razliku od komercijalnog enzima, u preliminarnom skriningu potencijalnih nosača za imobilizaciju broj variranih imobilizacionih faktora bio je ograničen.

Tabela 4.7. Imobilizacija β -galaktozidaze iz *L. acidophilus* na različite nosače

Nosač	SA ₀ (IU/mg)	Yi (%)	A (IU/g n)	Ya (%)	SA (IU/mg p)	SP
Eupergit C	4,671	4,07	10,233	3,05	3,499	0,75
Eupergit C 250L	4,671	3,56	22,324	6,66	1,871	0,4
Eupergit C-EDA-GA	4,671	25,58	8,025	2,39	0,437	0,093
Eupergit C-Cys-GA	4,671	49,83	3,256	0,97	0,091	0,019
Eupergit C 250L-EDA-GA	4,671	8,16	13,014	3,88	2,220	0,48
Eupergit C 250L-Cys-GA	4,671	23,22	16,875	5,03	1,012	0,22
Purolite A-109	4,671	8,11	4,495	1,34	0,772	0,17
Purolite-epoxy	4,671	7,45	3,095	0,92	0,578	0,12
Purolite-cc	4,671	8,5	0	0	0	0
Purolite-epoxy-EDA-GA	4,671	15,16	1,393	0,41	0,128	0,027
Purolite-epoxy-Cys-GA	4,671	5,19	9,211	2,74	2,472	0,53
FNS	4,211	0	0	0	0	0
AFNS	4,211	0	0	0	0	0
CCAFNS	4,211	0	0	0	0	0

* SA₀- početna specifična aktivnost enzima, Yi-prinos imobilizacije, A-aktivnost imobilisanog enzima, Ya-prinos aktivnosti, SA-precifična aktivnost imobilisanog enzima, SP-stepen prčišćenosti

Naime, dobijena β -galaktozidaza iz *L. acidophilus* predstavlja sirovi ekstrakt definisanih parametara: aktivnost enzima, koncentracije proteina (Tabela 4.7), koji će u prvom eksperimentu ostati fiksni. Imobilizacija je izvršena inkubiranjem 1 ml dobijenog enzima i 20 mg makroporoznih nosača, odnosno 5 mg u slučaju nano-silike, na roler šejkeru na temperaturi od 25 °C. Vrednosti aktivnosti supernatanta i imobilisanog enzima, kao i koncentracije proteina su praćeni kroz vreme u cilju određivanja optimalne dužine trajanja svake pojedinačne imobilizacije. U tabeli 4.7 dat je pregled nosača koji su primenjeni u imobilizaciji, kao i odgovarajuće vrednosti parametara efikasnosti imobilizacije: prinosa imobilizacije (%), aktivnosti imobilisanog enzima (IU/g nosača), prinosa aktivnosti (%) i specifične

aktivnosti imobilisanog enzima (IU/mg proteina). U tabeli su takođe date i vrednosti početne specifične aktivnosti kao i stepena prečišćenosti. Budući da ovaj enzim predstavlja sirovi bezćelijski ekstrakt, imobilizacija bi imala i dodatnu funkciju da enzim u nekoj meri i prečisti. Iz tabele se jasno može uočiti da se dobijeni rezultati u velikoj meri razlikuju od onih dobijenih u imobilizaciji β -galaktozidaze iz *A. oryzae*. Prinos aktivnosti je značajno manji, a i drugačiji je trend po pitanju afiniteta enzima prema različitim nosačima. Primetno je da se enzim uopšte nije imobilisao na nano-čestice silike, kako modifikovane tako i nemodifikovane. Takođe, sa nosačem Purolite A-109, koji je bio najpogodniji za imobilizaciju β -galaktozidaze iz *A. oryzae*, postignuti su vrlo mali prinosi aktivnosti (oko 1%). Ovakvi rezultati ukazuju na velike razlike u strukturi ove dve β -galaktozidaze i potrebu da se za imobilizaciju β -galaktozidaze iz *L. acidophilus* pronadu drugačija rešenja. Zato smo u dodatnoj seriji eksperimenata ispitali imobilizaciju na seriju novih nosača „Lifetech“, od istog proizvođača koji proizvodi i nosače Purolite, ali sa pogodnijim karakteristikama površine za primenu u imobilizaciji.

4.4.2.2. Imobilizacija na Lifetech™ ECR nosače

Nosači za imobilizaciju Lifetech™ ERC serije predstavljaju grupu stirenskih, odnosno metakrilatnih biokompatibilnih nosača za imobilizaciju koji se mogu koristiti u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji.

Tabela 4.8. Osobine nosača iz Lifetech™ ERC serije korišćenih u radu

Nosač	Tip nosača	Funkcionalna grupa	Veličina pora
ECR8305F	amino C2 metakrilat	NH ₂ (kratka nožica)	300-600
ECR8309F	amino C2 metakrilat	NH ₂ (kratka nožica)	600-1200
ECR8404F	amino C6 metakrilat	NH ₂ (duga nožica)	300-600
ECR8409F	amino C6 metakrilat	NH ₂ (duga nožica)	600-1200
ECR1508F	tercijarni amino stiren	-NR ₂	-
ECR1604F	kvaternarni amino stiren	-NR ₃ ⁺	-
ECR8806F	Oktadecil metakrilat	Oktadecil	500-700
ECR8285F	Epoksi/butil metakrilat	Epoksi	-

Ovi nosači su fizički, hemijski i mehanički veoma stabilni, sa zanemarljivom tendencijom ka bubrenju, bilo da se radi u vodenim rastvorima ili organskim rastvaračima. Lako se odvajaju iz reakcione smeše i kompatibilni su sa različitim konfiguracijama reaktora. U okviru ove disertacije ispitali smo osam nosača različitih svojstava, čije su osobine date u tabeli 4.8. Lifetech nosači sa primarnim amino grupama (ECR8303F, ECR8305F, ECR8404F, ECR8409F) pokazali su se kao najbolji nosači za imobilizaciju.

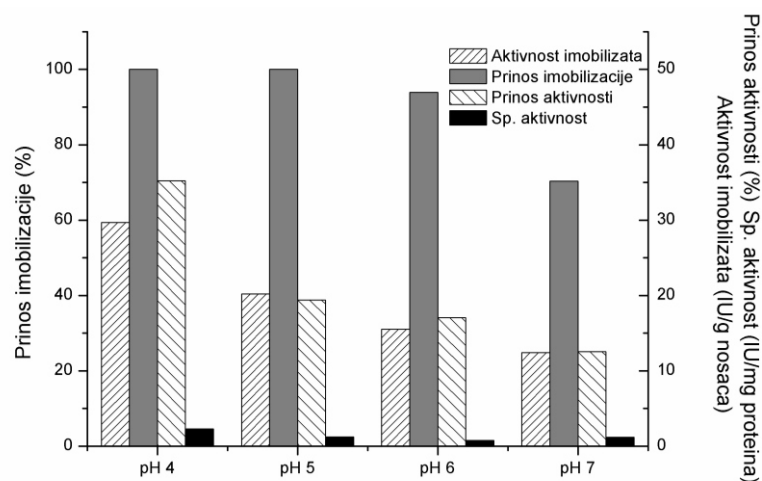
Tabela 4.9. Imobilizacija β -galaktozidaze iz *L. acidophilus* na Lifetech nosače

Nosač	SA ₀ (IU/mg)	Y _i (%)	A (IU/g n)	Y _a (%)	SA (IU/mg p)	SP
Lifetech ECR8305F	3,217	16,62	9,956	14,34	2,351	0,73
Lifetech ECR8309F	3,217	27,75	12,756	18,37	2,129	0,66
Lifetech ECR8404F	3,217	23,16	11,569	16,54	0,914	0,714
Lifetech ECR8409F	3,217	17,23	16,411	23,67	4,421	1,37
Lifetech ECR1508F	3,217	17,13	0,019	0,03	0,005	0
Lifetech ECR1604F	3,217	12,92	0,354	0,51	0,127	0,039
Lifetech ECR8806F	3,217	28,04	0,987	1,42	0,163	0,05
Lifetech ECR8285F	3,217	35,03	5,173	7,45	0,684	0,21

Interesantno je, međutim, istaći da dolazi do značajnih razlika u aktivnostima imobilisanog enzima. Naime, kada pogledamo tabelu sa podacima o svojstvima ovih nosača (Tabela 4.8), možemo videti da se oni međusobno razlikuju u veličini pora, kao i u dužini nožice sa funkcionalnom grupom. Po svemu sudeći enzimu iz *L. acidophilus* najviše odgovara nosač sa većim porama i dužom nožicom (ECR8409). Pored amino nosača značajnu aktivnost pokazao je i nosač sa epoksi grupama (ECR8285F), a kako je jedan od osnovnih ciljeva imobilizacije dobiti što stabilniji imobilisani enzim, u nastavku rada detaljnije je optimizovana imobilizacija na ovom nosaču koji omogućava formiranje kovalentnih veza između enzima i nosača.

U prvom setu eksperimenata ispitali smo detaljnije optimalne uslove za imobilizaciju enzima iz *L. acidophilus* na ECR8409 koji se u preliminarnom ispitivanju pokazao kao najbolji nosač. Imajući u vidu da se imobilizacija u ovom slučaju najverovatnije odvija uspostavljanjem jonskih interakcija između pozitivno naelektrisanih primarnih amino grupa na nosaču i negativno naelektrisanih

karboksilnih grupa na površini enzima putem jonske adsorpcije, od velike je važnosti ispitati uticaj pH rastvora enzima na proces imobilizacije.

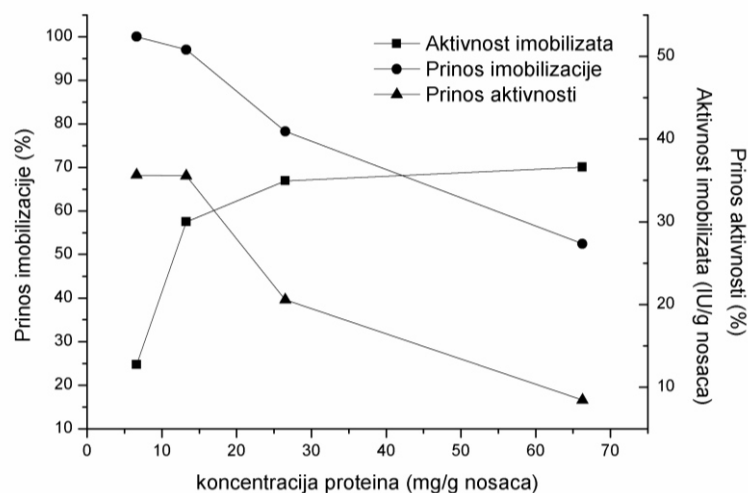


Slika 4.77. Uticaj vrednosti pH na imobilizaciju β -galaktozidaze *L. acidophilus*

Podešavanje odgovarajuće vrednosti pH u rastvoru enzima postignuto je dijaliziranjem rastvora enzima u niskomolarnim puferima odgovarajućih pH vrednosti u opsegu pH 4-7. Nakon podešavanja pH, 1 ml rastvora enzima inkubiran je sa 20 mg nosača, kao u preliminarnom eksperimentu. U skladu sa očekivanjima, pokazalo se da pH vrednost rastvora enzima, zaista ima ogroman uticaj na proces imobilizacije. Najviša aktivnost imobilisanog enzima dobijena je pri pH 4 (29,705 IU/g nosača), što je značajan porast (skoro dvostruko) u odnosu na vrednost aktivnosti imobilisanog enzima u preliminarnom eksperimentu (16,411 IU/g nosača). Značajna količina proteina vezuje se u celom ispitivanom opsegu vrednosti pH, ali sa porastom vrednosti pH značajno opada aktivnost imobilisanog enzima. Ovakvo ponašanje u skladu je sa zaključcima izvedenim u poglavlju o imobilizaciji komercijalnog enzima, a niže optimalne vrednosti posledica su nižih vrednosti izoelektrične tačke ovog enzima. Naime, podaci o vrednostima izoelektrične tačke β -galaktozidaza iz bakterija mlečne kiseline kreću se u opsegu 3,8-4,8.^{27, 29}

Izrazito visoki postignuti prinosi imobilizacije u celokupnom opsegu pH, najverovatnije upućuju na činjenicu da smo u oblasti koncentracija ponuđenih proteina znatno ispod zasićenja nosača. U cilju provere ove hipoteze, u narednom

eksperimentu variran je odnos nosača i enzima (1:25-1:250) u cilju povećanja ponuđene koncentracije proteina. Sa slike 4.78 se jasno vidi da sa povećanjem ponuđene koncentracije proteina raste i aktivnost na imobilizatu. U početku dolazi do naglog rasta, ali nakon dostizanja koncentracije od oko 15 mg/g nosača dolazi do značajnog usporavanja rasta aktivnosti. Sa druge strane, prinos aktivnosti i prinos imobilizacije opadaju u celom ispitivanom opsegu, pa nema smisla povećavati koncentraciju iznad 30 mg proteina po gramu nosača.



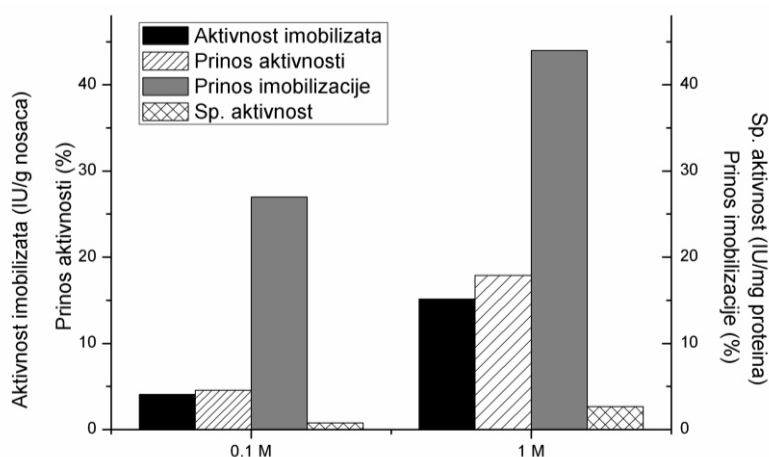
Slika 4.78. Uticaj ponuđene koncentracije proteina na aktivnost imobilisanog enzima (IU/g nosača), prinos imobilizacije (%) i prinos aktivnosti (%). Imobilizacija je izvođena pri pH 4

Nakon optimizacije parametara imobilizacije β -galaktozidaze iz *L. acidophilus* dobijen je imobilisani preparat aktivnosti 33,45 IU/g nosača koji će kasnije biti upotrebljen u reakciji sinteze galakto-oligosaharida.

Na osnovu iskustva sa imobilizacijom komercijalnog enzima, u cilju povećanja stabilnosti imobilisanog preparata, u narednom eksperimentu isprobana je modifikacija enzima zarad aktivacije karboksilnih grupa na površini enzima, kako bi bilo moguće uspostaviti kovalentnu imobilizaciju na nosač ECR8409. Međutim, tretiranje dobijenog enzima, čak i nižom koncentracijom EDAC-a, dovelo je do potpune inaktivacije enzima.

Nakon optimizacije imobilizacija na amino nosaču, u narednom eksperimentu je izvršena imobilizacija enzima na komercijalni nosač sa epoksi grupama

(ECR8285). Imajući u vidu da se radi o nosaču za višetačkastu kovalentnu imobilizaciju, u prvom eksperimentu ispitan je uticaj jonske jačine na proces imobilizacije. Kada se pogleda dijagram, jasno je da imobilizacija pri višim jonskim jačinama dovodi do vezivanja veće količine enzima, ali i dobijanja aktivnijeg preparata (oko 15 IU/g nosača).



Slika 4.79. Uticaj jonske jačine na proces imobilizacije

U narednom koraku izvršen je pokušaj povećanja aktivnosti imobilisanog enzima dodavanjem veće početne koncentracije proteina za imobilizaciju. Koncentracija proteina varirana je u opsegu 6,25-66,52 mg/g nosača. Kao i u prethodnom slučaju, povećavanje koncentracije dovodi do drastičnog smanjenja prinosa imobilizacije i prinosa aktivnosti, dok sa druge strane ne dolazi do značajnog povećanja aktivnosti imobilisanog enzima.

4.5. Sinteza galakto-oligosaharida u različitim reaktorskim sistemima

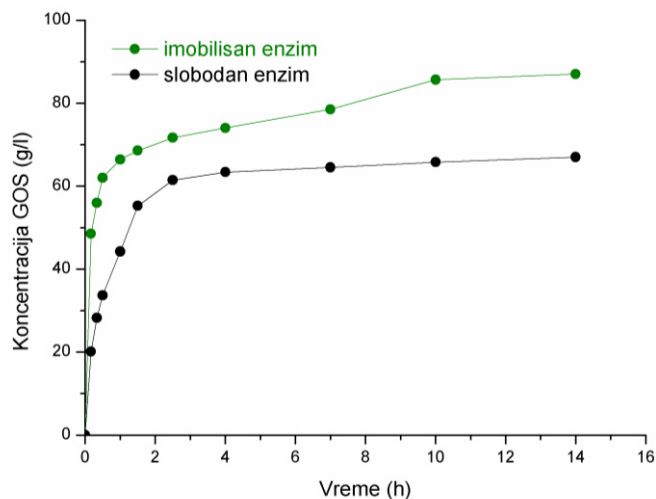
Ispitivanja u prethodnom delu ove doktorske disertacije bila su fokusirana na sintezu galakto-oligosaharida katalizovanu slobodnim enzimom. Kako smo u prethodnom poglavlju optimizovali proces imobilizacije slobodnih enzima iz *A. oryzae* i *L. acidophilus* i izvršili odabir najefikasnijih i najpogodnijih imobilisanih preparata za sintezu željenih jedinjenja, u ovom poglavlju posebna pažnja biće posvećena razvoju različitih imobilisanih reaktorskih sistema. Imajući u vidu da se pravilnim izborom reaktorske konfiguracije značajno može uticati na prinos proizvoda, u prvom delu eksperimentalnog rada biće izvršena optimizacija reakcije u okviru šaržnog reaktora sa imobilisanim enzimima, dok će u drugom delu biti obrađena primena imobilisanog enzima u semi-kontinualnom režimu u reaktoru sa fluidizovanim slojem.

4.5.1. Sinteza galakto-oligosaharida u šaržnom reaktoru

Šaržni reaktor predstavlja najstariji i najjednostavniji tip reaktora. Jednostavno rukovanje i kontrola procesa, kao i jednostavna konfiguracija reaktora, čine ga i danas najkorišćenijim tipom reaktora u biotehnologiji. U ovom radu, pod šaržnim reaktorom podrazumevan je erlenmajer bez odbojnika smešten u temperiranom orbitalnom šejkeru.

U okviru ovog eksperimenta, ispitana je transgalaktozilaciona aktivnost odabranog imobilisanog preparata (modifikovani enzim imobilisan na Purolite A-109) u poređenju sa slobodnim enzimom. Ovaj eksperiment je pogodan za testiranje potencijalne promene specifičnosti enzima i može nam dati uvid o tome koja će reakcija biti favorizovana u zavisnosti od upotrebljenog enzima (slobodnog ili imobilisanog). Takođe, imajući u vidu da pri imobilizaciji na čvrste nosače pored brojnih prednosti - kao što su povećana stabilnost, mogućnost ponovne upotrebe, u toku rada sa imobilisanim biokatalizatorima - može doći i do pojave difuzionih limitacija pri prolasku supstrata do aktivnog centra na enzimu. Kako bismo ovo bolje sagledali, izvedene su paralelne reakcije transgalaktozilacije pomoću slobodnog i imobilisanog enzimskog preparata, pri istim uslovima. Kao supstat za dobijanje galaktooligosaharida korišćen je rastvor laktoze koncentracije 400 g/l u

0,1 M natrijum-acetatnom puferu (pH 4,5), a reakcija je izvedana na orbitalnom šejkeru na 50 °C. Kako bismo lakše uporedili reakcione sisteme unete su jednake aktivnosti enzima (4 IU u hidrolizi *o*-NPG). Imajući u vidu da su molekuli galakto-oligosaharida veći od uobičajenih supstrata za β -galaktozidazu, ovu reakciju ćemo ujedno iskoristiti i za proveru postojanja sternih smetnji prolasku supstata do aktivnog centra na enzimu koji mogu nastati kao posledica imobilizacije.

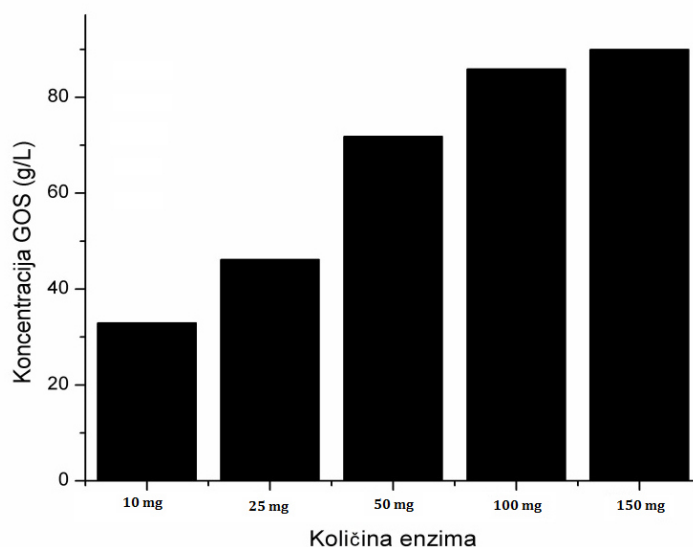


Slika 4.80. Tok reakcije sinteze GOS sa slobodnim i imobilisanim enzimom

Dobijeni su slični oblici krive formiranja galakto-oligosaharida u zavisnosti od vremena za slobodan i imobilisan enzim. Međutim, u sistemu sa imobilisanim enzimom dostignuta je koncentracija galakto-oligosaharida oko 87 g/l nakon 14 časova, dok je u reakciji sa slobodnim enzimom produkovana značajno manja koncentracija galakto-oligosaharida nakon 14 časova, koja iznosi oko 67g/l. U slučaju slobodnog enzima primećujemo nagli porast koncentracije galakto-oligosaharida u prvih sat vremena reakcije, zatim sledi sporiji stupanj reakcije i na kraju postizanje ravnotežnog stanja, dok kod reakcije sa imobilisanim enzimom dolazi do daljeg rasta prinosa. Evidentno je da imobilizacijom enzima dostupnost supstrata nije narušena, odnosno da prilikom sinteze galakto-oligosaharida nije došlo do očekivanih ograničenja u prenosu mase. Obzirom da su uslovi eksperimenta tako podešeni da je u sistem uneta ista hidrolitička aktivnost enzima, rezultati nam ukazuju na činjenicu da je reakcija transgalaktozilacije favorizovana u odnosu na reakciju hidrolize u slučaju imobilisanog enzima. Naime, u reakcijama

koje su katalizovane β -galaktozidazom prvi korak predstavlja nastajanje enzim-galaktozil kompleksa, a tip reakcije je određen akceptorom galaktozil-ostatka (Slika 4.34). Ukoliko je dostupniji akceptor voda doći će do reakcije hidrolize, u suprotnom, ukoliko je akceptor laktoza ili pak neki drugi šećer dolazi do reakcije transgalaktozilacije. U skladu sa tim, pretpostavlja se da je u mikrookolini imobilisanog enzima, prevashodno zbog hidrofobne prirode nosača, niska koncentracija vode, pa je samim tim veća dostupnost ostalih akceptora (laktoze, nižih galakto-oligosaharida), što rezultuje favorizovanjem reakcije transgalaktozilacije.

Da bi transgalaktozilaciona sposobnost modifikovane β -galaktozidaze dominirala nad hidrolitičkom u reakciji sa laktozom, kao što je već ranije napomenuto, potrebno je podesiti određene parametre u njenu korist. Kako je kod slobodnog enzima već određeno da su temperatura i pH nesignifikantni parametri, u nastavku rada ispratićemo uticaj koncentracije imobilisanog enzima i koncentracije supstrata (laktoze), u cilju postizanja što većeg prinosa, odnosno veće koncentracije galakto-oligosaharida.



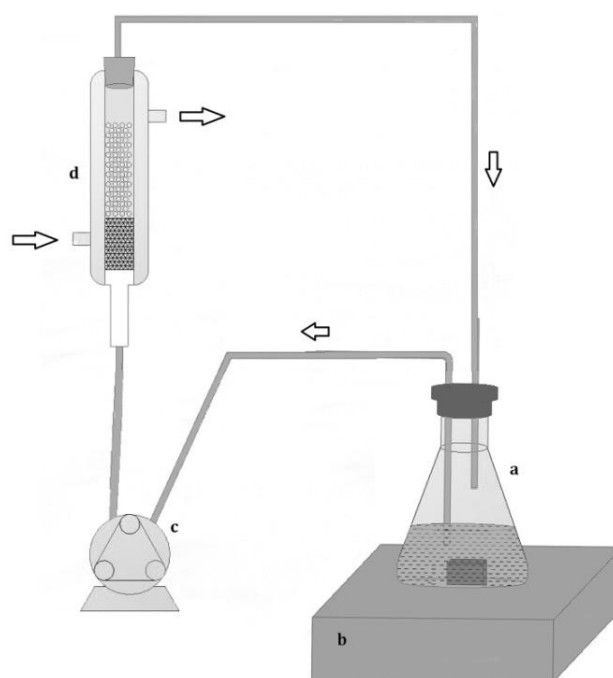
Slika 4.81. Koncentracija galakto-oligosaharida u zavisnosti od količine enzima

U sledećem eksperimentu smo pratili reakciju sinteze galakto-oligosaharida pri identičnim reakcionim uslovima (400 g/l laktoze rastvorene u 0,1 M natrijum acetatnom puferu, pH4,5, na 50 °C) koristeći različite koncentracije imobilisanog

enzima (0,1 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml). Dobijeni rezultati, prikazani na slici 4.81, predstavljaju maksimalne postignute koncentracije galakto-oligosaharida. Utvrđeno je da se najviša koncentracija galakto-oligosaharida postiže pri korišćenju najveće mase imobilisanog enzima (odnosno najveće količine enzima) u reakcionoj smeši, koja iznosi 100 mg. Stoga, u daljim eksperimentima koristićemo ovu količinu enzima.

4.5.2. Sinteza galakto-oligosaharida u reaktoru sa fluidizovanim slojem

Nakon optimizacije šaržnog postupka dobijanja galakto-oligosaharida, dobijeni imobilisani preparat primenjen je u kontinualnom sistemu rada. Poznato je da se u kontinualnim reaktorskim sistemima, postižu veće produktivnosti po masi enzima u poređenju sa šaržnim reaktorima, što je posledica znatno kraćeg vremena zadržavanja supstrata u reaktoru u odnosu na vremena zadržavanja enzima. Do sada najčešće korišćeni kontinualni reaktori sa imobilisanim česticama za sintezu galakto-oligosaharida bili su reaktori sa pakovanim slojem. ^{244, 262, 358}



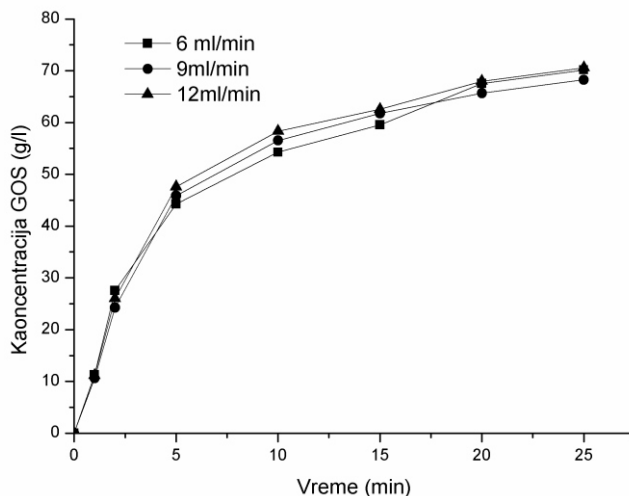
Slika 4.82. Šematski prikaz bioreaktora sa fluidizovanim slojem: erlenmajer sa reakcionom smešom (a), magnetna mešalica sa grejanjem (b), peristaltička pumpa (c), bioreaktor sa plaštom (d)

Međutim, u okviru ove disertacije odabran je reaktor sa fluidizovanim slojem zbog brojnih prednosti nad ostalim tipovima reaktora. Naime, ovaj tip reaktora obezbeđuje bolji prenos mase i toplote sa uniformnijom raspodelom protoka reakcione smeše. Sa druge strane, ovi reaktori zahtevaju nosače i mehanizam vezivanja enzima koji će izdržati trenje, sudare i veće smicajne napone pri fluidizaciji, što će biti odličan test za proveru stabilnosti dobijenog imobilisanog enzima. Reaktor sa fluidizovanim slojem korišćen u ovom radu predstavljao je cilindričnu staklenu kolonu dimenzija 136x9 mm, sa plaštom za održavanje konstantne temperature u reaktoru (Slika 4.82), a reakcija je izvođena pri uslovima optimizovanim za šaržni reaktor.

4.5.2.1. Ispitivanje uticaja zapreminskog protoka na prinos galakto-oligosaharida

Na početku rada sa bioreaktorom sa fluidizovanim slojem ispitan je optimalan režim rada variranjem zapreminskog protoka reakcione smeše (6-12 ml/mn). Ovaj podatak od velike je važnosti za optimizaciju procesa sinteze galakto-oligosaharida imajući u vidu da brzina proticanja utiče na visinu fluidizovanog sloja, kao i na vreme zadržavanja supstrata, odnosno na vreme kontakta između enzima i supstrata. Pri odabiru idealne brzine protoka treba imati vidu da pri suviše niskim protocima, uprkos dužem vremenu kontakta, može doći do povećanja otpora prenosu mase uzrokovanih povećanjem debljine difuzionog sloja koji okružuje imobilisane čestice, i samim tim nižih prinosa reakcije. U suprotnom, kada je protok reakcione smeše suviše visok, doći će do odnošenja imobilisanih čestica, ili pak inaktivacije enzima uzrokovano pojavom jakih smicajanih sila. Uticaj brzine zapreminskog protoka na prinos galakto-oligosaharida u reaktoru predstavljen je na slici 124. Može videti da zapreminski protok, odnosno vreme kontakta u ispitanom opsegu nema značajan uticaj na prinos galakto-oligosaharida. Ovde treba napomenuti da opseg ispitanih brzina protoka nije nasumično izabran, već da predstavlja granične vrednosti koje se u ovom sistemu mogu uspostaviti (minimalnom brzinom koja se može ostvariti pomoću pumpe i maksimalnom brzinom koja ne dovodi do odnošenja čestica). Imajući ovo u vidu, može se pretpostaviti da su nepromenjeni prinosi posledica postojanja zanemarljivih difuzionih limitacija u reaktoru, čak i pri najmanjem zapreminskom protoku. Sa

druge strane, može se primetiti da je reakcija sinteze galakto-oligosaharida izrazito brza budući da smanjenje vremena zadržavanja ne uzrokuje smanjenje prinosa u ispitanom opsegu.



Slika 4.83. Uticaj zapreminskog protoka na prinos galakto-oligosaharida

Stoga, u nastavku rada biće korišćena najniža brzina protoka (6 ml/min) u cilju što dužeg očuvanja aktivnosti imobilisanog preparata i smanjenja smicajnih napona.

4.5.3. Hidrodinamika i prenos mase u reaktorima

4.5.3.1. Šaržni reaktor

Kao šaržni reaktor u okviru ove disertacije korišćen je erlemajer zapremine 100 ml, prečnika dna 6,5 cm, postavljen na tresilicu na 50°C, prethodno utvrđenoj optimalnoj temperaturi za sintezu galakto-oligosaharida pomoću β -galaktozidaze iz *A. oryzae* i pri brzini od 200 rpm.

Kako bi bila ispitana priroda kretanja fluida (reakcione smeše) i smicajni naponi koji u njoj vladaju, bitno je da prvo odredimo Rejnoldsov broj (Re):

$$Re = \frac{\rho N d^2}{\mu} \quad (4.1)$$

ρ (kg/m³)– gustina reakcione smeše

N (s⁻¹)- brzina obrtaja tresilice

d (m³)- prečnik erlenmajera

μ (Pa·s) - kinematska viskoznost

Hydrodinamički parametri za rastvor laktoze, neophodni za proračun hidrodinamike, kao i prenosa mase dati su u tabeli 4.10.

Tabela 4.10. Vrednost različitih parametara za rastvor laktoze 400 g/l na 50°C

Parametar	Vrednost	Referenca
gustina, ρ (kg/l)	1,164	359
dinamička viskoznost, μ (Pa·s)	$3,395 \times 10^{-3}$	359
kinematska viskoznost, ν (m ² /s)	$2,92 \times 10^{-6}$	-
Difuzivnost (m ² /s)	1×10^{-9}	360, 361

Koristeći podatke iz tabele 20., kao i prethodno definisane parametre vezane za uslove rada u šaržnom reaktoru dobijeno je da je vrednost Rejnoldsovog broja, $Re=4828,6$. Imajući u vidu da taj broj premašuje graničnu vrednost, $Re>1000$, zaključujemo da je u erlenmajeru na orbitalnom šejkeru kretanje fluida turbulentno.

Kako bi snaga mešanja (P) u erlenmajeru na orbitalnom šejkeru bila izračunata, definiše se modifikovani Njutnov broj (Ne')^{362, 363}:

$$Ne' = 70Re^{-1} + 25Re^{-0,6} + 1,5Re^{-0,2} \quad (4.2)$$

$$Ne' = \frac{P}{\rho N^3 d^4 V_l^{1/3}} \quad (4.3)$$

Iz jednačina 13. i 14. Dobija se da snaga (P) iznosi $9,24 \cdot 10^{-3} W$. Pomoću snage, dalje se može izračunati disipacija energije (ε) i konačno tangencijalni napon (τ) pomoću jednačina 15. i 16.³⁶⁴

$$\varepsilon = 0,629 \cdot \frac{P}{V_{rs}} \quad (4.4)$$

$$\tau = A\rho \cdot (\varepsilon \cdot d_\xi)^a \quad (4.5)$$

Gde su : ν (m²/s) – kinematska viskoznost

d_ξ (m) – prečnik čestice

η (m) – dimenzija najmanjeg mikrovrtloga

A,a – konstante koje zavise od η .

Na osnovu izračunate vrednosti disipacije energije ($0,25 \text{ m}^2/\text{s}^3$) pomoću Kolmogorovog modela izotropne turbulencije, izračunava se dimenzija najmanjeg mikro-vrtloga (Jednačina 17.)³⁶⁴

$$\eta = \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon} \right)^{1/4} \quad (4.6)$$

Kako je izračunata vrednost dimenzije najmanjeg mikrovrtloga ($1 \times 10^{-4} \text{ m}$), može se smatrati da je sistem u podoblasti disipacije u okviru turbulentne oblasti ($3 \cdot \eta < dp < 12 \cdot \eta$), i u tom slučaju se tangencijalni napon kome su izložene čestice može izračunati iz sledeće korelacije:

$$\tau = 2,46 \cdot \rho \cdot (\varepsilon \cdot d_c)^{2/3} \quad (4.7)$$

Vrednost tangencijalnog napona u ovom slučaju iznosi 6,16 Pa.

Prenos mase tečnost-čestica najčešće se opisuje teorijom filma, koja pretpostavlja da je celokupan otpor prenosu mase skoncentrisan u tankom filmu tečnosti koji se formira oko čestice. Kako se debljina filma tečnosti ne može precizno odrediti, koeficijent prenosa mase tečno-čvrsto, k može se odrediti korišćenjem bezdimenzionih parametara koji uz izvesne empirijske korelacije omogućavaju procenu prenosa mase i upoređivanje različitih sistema. Tako je uveden Šervudov bezdimenzioni broj (Sh) kojim se izražava odnos između konvektivnog i difuzionog prenosa mase.

$$Sh = \frac{k \cdot d_p}{D} \quad (4.8)$$

Šervudov broj zavisi od brzine proticanja, geometrije, fluida i osobina čestica (Jednačina 4.8). Za sferične čestice u fluidu koji miruje $Sh=2$. Sa povećanjem brzine proticanja fluida, debljina filma oko čestice se smanjuje, što dovodi do povećanja koeficijenta prenosa mase, odnosno Šervudovog broja. Pri različitim režimima strujanja, u različitim sistemima čestica i reakcionih smeša, postavljene su odgovarajuće empirijske korelacije koje povezuju vrednost Šervudovog broja sa režimom strujanja (preko Rejnoldsovog broja, Re) i kinematskom viskoznošću i difuzivnošću reakcionog medijuma (preko Šmitovog broja, Sc). Tako dobijen

Šervudov broj se koristi za određivanje koeficijenta transporta mase koji je jedinstven parametar za procenu transfera mase u biorektorskom imobilisanom sistemu.

$$Sh = 2 + 0,35 \cdot \left(\frac{\Delta\rho}{\rho}\right)^{1/3} \left(\frac{P \cdot \rho^2 \cdot d_p^4}{V_{rs} \cdot \mu^3}\right)^{2/3} \cdot Sc^{1/3} \quad (4.9)$$

Pri čemu je:

$$Sc = \frac{v}{D} = 2920 \quad (4.10)$$

$$k = \frac{Sh \cdot D}{d_\xi} \quad (4.11)$$

$\Delta\rho$ (kg/m³) = $\rho_\xi - \rho$

D (m²/s) – difuzivnost supstrata

Na osnovu jednačina 21. i 20. izračunavamo da je vrednost Šervudovog broja 286, što će dalje biti iskorišćeno u jednačini 22. za računanje koeficijenta prenosa mase, k čija vrednost iznosi 7,15x10⁻⁴.

Imobilizacijom enzima na čvrste nosače, pri čemu se on prevodi iz rastvorljivog u nerastvorljiv oblik, najčešće dolazi do smanjenja brzine, koja se javlja kao posledica pojave difuzionih limitacija. Efekat difuzionih limitacija na brzinu reakcije imobilisanih enzima zavisi od velikog broja faktora: metode imobilizacije, poroznosti nosača, distribucije enzima u/na nosaču, kao i hidrodinamičkih uslova reakcije⁵⁵. On se kvantitativno može odrediti izračunavanjem Damkelerovog broja, Da (Jednačine 4.12 i 4.13)

$$Da = \frac{V_m''}{k \cdot C}, \quad (4.12)$$

$$\text{pri čemu je } V_m'' = \frac{V_m \cdot V_{rs}}{A_b} \quad (4.13)$$

V_m'' (mol/m²s) - maksimalna brzina reakcije po jedinici površine biokatalizatora,

k (m/s) - koeficijent prenosa mase tečno-čvrsto

C (mol/m³) - koncentracija supstrata u rastvoru.

V_m (mol/m³s) - maksimalna vrednost početne brzine reakcije

V_{rs} (m³) - zapremina reakcione smeše

A_b (m²) - površina biokatalizatora

Ukoliko su izračunate vrednosti za $Da \ll 1$ efekat otpora prenosu mase je zanemarljiv (kinetički kontrolisana reakcija), i obratno, kada je $Da \gg 1$ proces se usled difuzionih limitacija ne može smatrati kinetički kontrolisanim (difuziono kontrolisana reakcija). U slučaju da je $Da=1$ brzina reakcije i brzina kojom supstrati dolaze do aktivnog centra su približno jednake.

Tabela 4.11. Vrednosti Da broja za reakcione smeše različite koncentracije

Koncentracija supstrata (mM)	$Da \times 10^4$
146	2,51
292	2,20
584	1,87
876	1,41
1169	1,21
1753	0,91

Kao što se iz tabele 4.11 može videti za sve ispitivane koncentracije laktoze $Da \ll 1$, pa možemo zaključiti da otpora spoljašnjem prenosu mase ne postoji. Međutim, da bi se difuzione limitacije potpuno mogle zanemariti, mora se ispitati postojanje difuzionih limitacija i unutar pora imobilisanog preparata. Naime, difuzione limitacije su zanemarljive ukoliko su zadovoljeni uslovi: da faktor efektivnosti (η - odnos ostvarene brzine reakcije i brzine u sistemu bez limitacija) bude približno jednak jedinici, a vrednost Tielovog modula manja od 0,3. Kako je prvi uslov ispunjen, potrebno je izračunati i vrednost Tielovog modula pomoću jednačina 4.14 i 4.15.

$$\phi = \frac{\vartheta}{D_{ef} \cdot C} \left(\frac{d_c}{6} \right)^2 \quad (4.14)$$

$$D_{ef} = D \cdot \frac{\varepsilon_c}{T} \quad (4.15)$$

ε_c - poroznost čestica

T - tortuoznost ili uvijenost unutrašnjih pora (određena na osnovu korelacije predložene na osnovu Bolcmanovog modela rešetki ³⁶⁵). Konačno kako je izračunata vrednost Tielovog modula ($8,52 \times 10^{-4}$) zaista manja od 0,3 može se zaključiti da je pojava difuzionih limitacija u ispitivanom sistemu zanemarljiva.

4.5.3.2. Reaktor sa fluidizovanim slojem

Kao i kod šaržnog bioreaktora, kod bioreaktora sa fluidizovanim slojem potrebno je odrediti režim strujanja i vrednost smicajnog napona, kako bi bilo izvršeno poređenje ovih reaktora. Prvo je trebalo izračunati hidraulički dijametar intersticijalnih praznina u fluidizovanom sloju (D_h), a potom i brzinu reakcione smeše (U) imajući u vidu da ovi parametri figurišu u izrazu za Reynoldsov broj (Jednačina 4.16)

$$Re = \frac{U \cdot D_h \cdot \rho}{\mu} \quad (4.16)$$

U (m/s)- brzina reakcione smeše

D_h (m) - hidraulički dijametar intersticijalnih praznina

Dakle, da bismo izračunali brzinu reakcione smeše, a potom i Reynoldsov broj, potrebno je izračunati nekoliko veličina: površinske brzine, poroznosti fluidizovanog sloja i stvarnog zapreminskog protoka (Jednačine 4.17—4.22).

$$U = \frac{Up}{\varepsilon} \quad (4.17)$$

$$\varepsilon = \frac{Vr - \frac{m}{\rho_c}(1 - \varepsilon_c)}{Vr} \quad (4.18)$$

$$Vr = \frac{d_k^2}{4} \pi \cdot h \quad (4.19)$$

$$Up = \frac{V}{\frac{d^2}{4} \cdot \pi} \quad (4.20)$$

$$Dh = \frac{1}{3} \cdot \frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} \frac{d}{M} \quad (4.21)$$

$$M = 1 + \frac{2}{3} \cdot \frac{1}{1 - \varepsilon} \frac{d_c}{d_k} \quad (4.22)$$

Gde su: U_p (m/s)-površinska brzina,

ε - poroznost fluidizovanog sloja,

V_r (m³) – zapremina reaktora,

m (kg) – masa imobilisanog preparata,

ρ_c (kg/m³)– gustina čestice,

ε_c - poroznost čestice,

d_k (m) – prečnik reaktora,

h (m)-visina reaktora,

M -korekcionni faktor kojim se utvrđuje uticaj zidova kolone na veličinu hidrauličkog dijametra.

Nakon izračunavanja jednačina 4.17-4.22, i uvrščavanja rezultata u jednačinu 4.16, dobija se vrednost Renojldsovog broja 0,976 što je manje od granične vrednosti za laminaran tok u reaktoru sa fluidizovanim slojem. Na osnovu ovoga možemo zaključiti da je u reaktoru sa fluidizovanim slojem ostvaren laminaran protok reakcione smeše. U skladu sa ovim zaključkom, tangencijalni napon za reaktor sa fluidizovanim slojem možemo izračunati na osnovu jednačine 4.23, pri čemu se dobija vrednost $4,1 \times 10^{-2}$ Pa.

$$\tau = \frac{8 \cdot \mu \cdot U}{Dh} \quad (4.23)$$

Kao i kod proračuna koeficijenta prenosa mase za šaržni reaktor, korišćićemo vrednost Šervudovog broja i odgovarajući empirijski jednačina (jednačine 4.8, 4.10, 4.24 i 4.25)

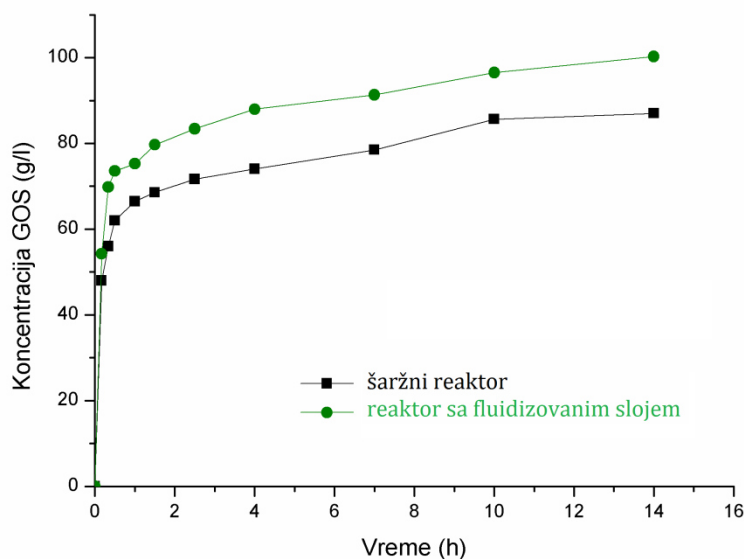
$$Sh = 0,23 \cdot Ar^{1/3} \cdot Sc^{0,4} \quad (4.24)$$

$$Ar = \frac{g \cdot d_c^3 \cdot \rho \cdot (\rho_c - \rho)}{\mu^2} \quad (4.25)$$

Zamenom vrednosti u prethodne jednačine dolazi se do podatka da je koeficijent prenosa mase u reaktoru sa fluidizovanim slojem $1,2 \times 10^{-2}$ m/s.

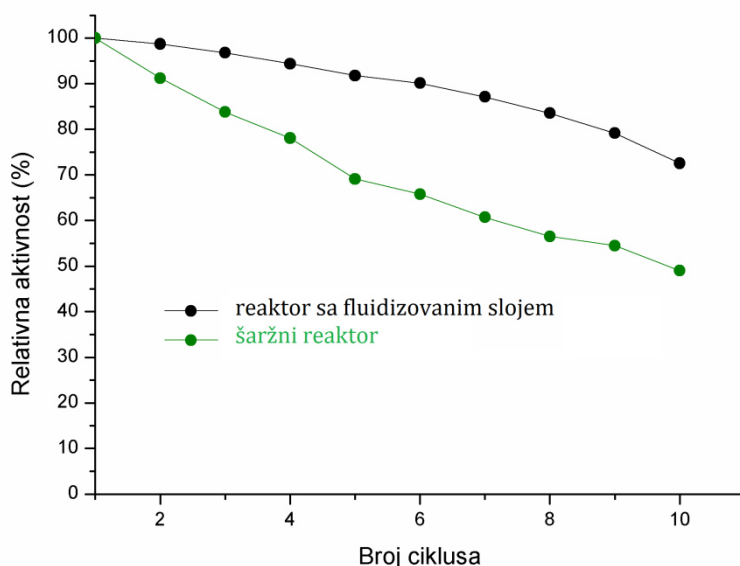
4.5.4. Poređenje prinosa galakto-oligosaharida u šaržnom reaktoru i reaktoru sa fluidizovanim slojem

Pravilnim odabirom reaktorske konfiguracije i odgovarajućih uslova rada, moguće je postići visoke prinose željenih proizvoda, produžiti operativno vreme imobilisanog preparata i na taj način ostvariti isplative industrijske enzimske procese. Stoga, u nastavku ove disertacije izvršićemo poređenje ispitanih reaktorskih sistema pod optimizovanim uslovima rada, sa aspekta produktivnosti, odnosno prinosa galakto-oligosaharida, kao i operativne stabilnosti imobilisanog preparata. Na slici 4.84. Prikazani su tokovi reakcija sinteze galakto-oligosaharida u oba tipa reaktora, pri identičnim uslovima (400 g/l laktoze u 0,1 M acetatnom puferu, pri koncentraciji enzima 0,4 IU/ml). Sa slike 4.84 se jasno vidi da su prinosi u reaktoru sa fluidizovanim slojem za oko 30% bolji, nego u šaržnom reaktoru pri identičnim uslovima. Ovo se može pre svega objasniti boljim prenosom mase u bioreaktoru sa fluidizovanim slojem. Ukoliko se uporede koeficijenti prenosa mase za ova dva reaktorska sistema, izračunata u prethodnom poglavlju, može se uočiti da je koeficijent prenosa mase u reaktoru sa fluidizovanim slojem skoro dva puta veći.



Slika 4.84. Tok reakcije u šaržnom reaktoru i reaktoru sa fluidizovanim slojem. Reakcije su izvođene sa 10 mL (šaržni) i 80 mL (fluidizovani) rastvora laktoze koncentracije 400 g/l u 0,1 M acetatnom puferu, pri koncentraciji enzima 0,4 IU/ml.

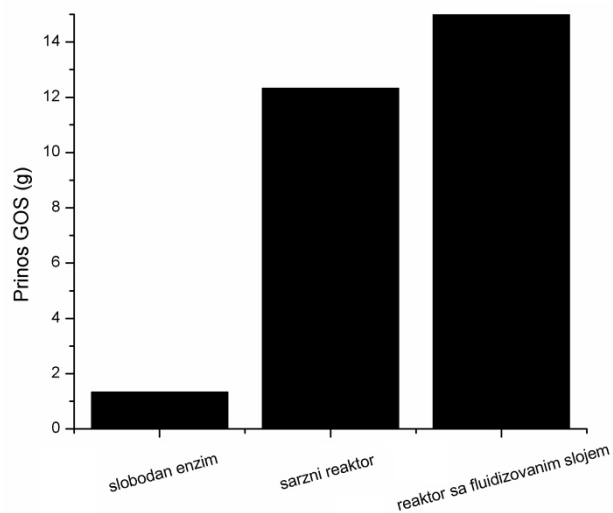
Takođe, kao posledica različitih režima strujanja, verovatno je da u šaržnom reaktoru zbog jakih smicajnih sila dolazi do inaktivacije jednog dela enzima, što potencijalno može uticati na ukupni prinos galakto-oligosaharida. U cilju potvrde ove hipoteze upoređene su operativne stabilnosti enzima u obe reaktorske konfiguracije. Operativna stabilnost je ispitana u deset uzastopnih reakcionih ciklusa pri optimalnim reakcionim uslovima, a rezultati poređenja prinosa u svakom ciklusu predstavljani su grafički.



Slika 4.85. Operativna stabilnost imobilisanih enzima u šaržnom reaktoru i reaktoru sa fluidizovanim slojem. Reakcija je izvođena 12 h, pri koncentraciji laktoze 400 g/l u 0,1 M acetatnom puferu na temperaturi od 50°C.

Kao što se sa slike 4.85 može jasno videti, imobilisani enzim pokazuje bolju operativnu stabilnost u reaktoru sa fluidizovanim slojem. Tokom 10 ciklusa njegova aktivnost pada na oko 80% početne vrednosti. Za to vreme, u šaržnom reaktoru, dolazi do značajnijeg pada aktivnosti (oko 50%). Ovakvi rezultati nisu iznenađujući budući da je u prethodnom poglavlju pokazano da su tangencijalni naponi znatno izraženiji u šaržnom reaktoru (čak 1000 puta). Ovi rezultati izuzetno su značajni kao pokazatelji efikasnosti imobilizacije i mogućnosti što ekonomičnije proizvodnje galakto-oligosaharida. Nakon uzimanja u obzir mogućnosti korišćenja imobilisanog preparata u samo deset ciklusa (iako su aktivnosti i dalje jako visoke), vidi se da je postignut značajan doprinos u

proizvodnji galakto-oligosaharida. Naime, kada izrazimo kolika je masa dobijenog proizvoda nakon jednog ciklusa sa slobodnim enzimom, kao i deset ciklusa sa imobilisanim enzimom u oba reaktorska sistema, pri čemu je unet isti broj jedinica aktivnosti, može se uočiti da se postižu više nego desetostruko veći prinosi i da je imobilizacija enzima značajno doprinela unapređenju produktivnosti procesa.



Slika 4.86 Poređenje prinosa (g) galakto-oligosaharida dobijenih u reakciji sa slobodnim enzimom, imobilisanim enzimom u šaržnom i bireктору sa fluidizovanim slojem

4.6. Sinteza novih bioaktivnih galaktozida korišćenjem alternativnih galaktozil akceptora

4.6.1. Sinteza galaktozida salicina

Galaktozidi su grupa jedinjenja koja je poslednjih godina u fokusu naučne zajednice zahvaljujući svojoj izraženoj fiziološkoj aktivnosti. Iako su galaktooligosaharidi najpoznatija i najviše istražena jedinjenja ove grupe, u poslednje vreme sve se više pažnje obraća na galaktozide aglikona. Naime, pronađeno je da se galaktozidi niske molekulske mase, a pre svega fenil-galaktozidi, najviše zahvaljujući svojoj hidrofilnosti i specifičnoj konformaciji, mogu smatrati inhibitorima galektina. Ovo saznanje je od izuzetne važnosti jer se prevelika ekspresija ljudskog galektina 3 može dovesti u vezu sa brojnim bolestima, kao što su karcinom, bolesti srca i hematološka oboljenja. Na taj način galaktozidi aglikona mogu naći ulogu u farmaceutskoj industriji kao perspektivan lek za lečenje ovih bolesti. U ovoj doktorskoj disertaciji pozabavićemo se optimizacijom sinteze galaktozida salicina kao potencijalno fiziološki značajnog jedinjenja, imajući u vidu njegovu izrazitu sličnost sa inhibitorima galektina.

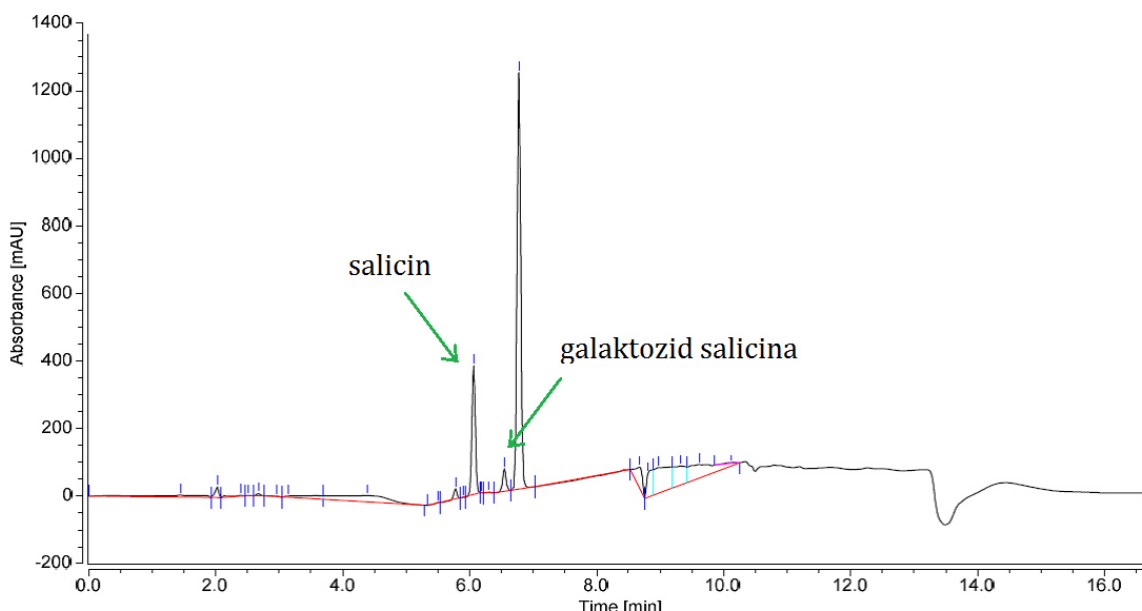
U prvom delu rada izvršena je detaljna optimizacija naj važnijih parametara procesa sinteze galaktozida salicina pomoću komercijalnog enzima iz *A. oryzae*, dok će u drugom delu za sintezu ovog jedinjenja pri usvojenim optimalnim uslovima biti iskorišćena izolovana β -galaktozidaza iz *L. acidophilus*.

4.6.1.1. Sinteza galaktozida salicina pomoću β -galaktozidaze iz *A. oryzae*

4.6.1.1.1. Detekcija i karakterizacija proizvoda

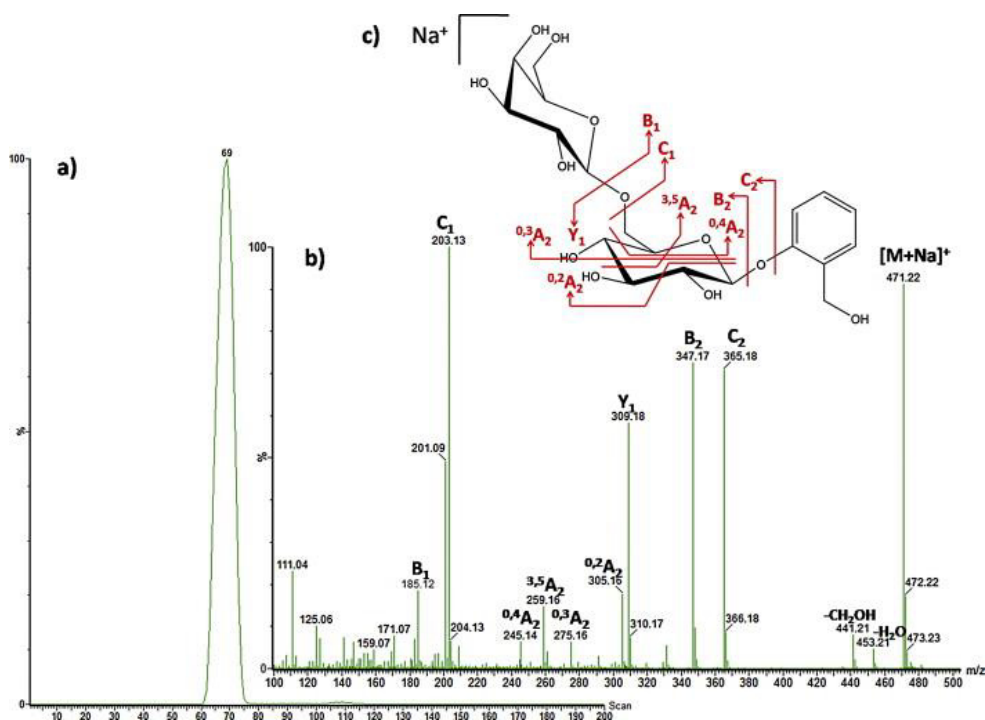
Na samom početku izveden je preliminarni eksperiment u cilju optimizovanja metoda za detekciju i karakterizaciju samog proizvoda. Eksperiment je izveden pri sledećim uslovima: koncentracija laktoze 100 mM, koncentracija salicina 100 mM, koncentracija enzima β -galaktozidaze iz *A. oryzae* 40 IU, u 0,1M natrijum acetatnom puferu (pH 4,5) na 50 °C. Uzorak početne smeše (kontrola) i uzorak

nakon 1 h analizirani su reverzno faznom hromatografijom visokih performansi (RP-HPLC). RP-HPLC analiza je pokazala da u uzorku dolazi do smanjenja pika salicina ($R_t = 6,070$ min) u odnosu na kontrolni uzorak, kao i do pojave pika proizvoda na $R_t = 6,577$ min, koji u kontrolnom uzorku nije detektovan.



Slika 4.87 Karakterističan dijagram RP-HPLC analize reakcione smeše

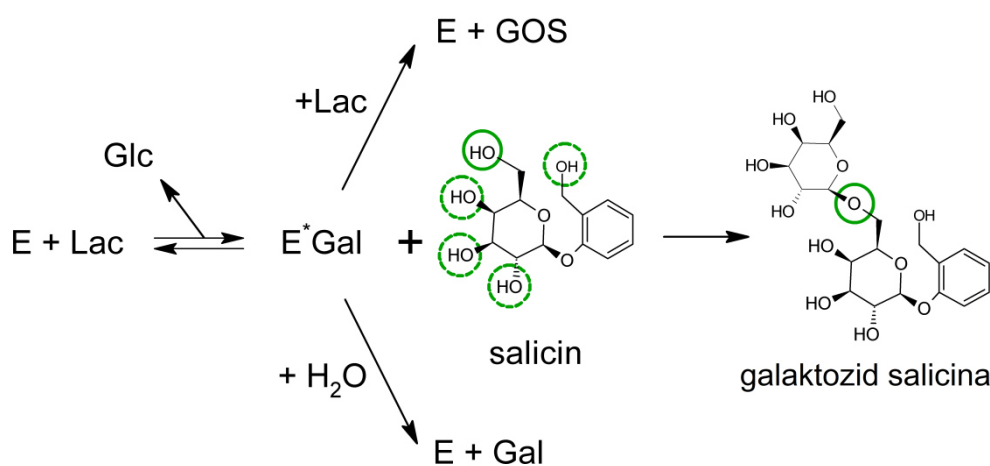
Uzorak je potom analiziran IMS-MS/MS metodom kako bi se odredila struktura proizvoda. Slika 129.a prikazuje jonski mobilogram za jon na 471 m/z, koji odgovara $[M+Na]^+$ jonu očekivanog proizvoda, galaktozidu salicina. Kao što se sa slike 4.88 može videti na $dt=69$ bins izmeren je uzak i simetričan pik, što nam ukazuje da je u pitanju samo jedinstven izomer. Kako bi ovo dodatno potvrdili, a ujedno i odredili njegovu strukturu, snimljen je i MS/MS spektar (Slika 4.88b). Na osnovu nomenklature predložene od strane Domona i Kostela za glukokonjugate³³⁷, urađena je nomenklatura fragmentacije jona za uzorak reakcione smeše. Tako je na osnovu fragmenata B_2 (347 m/z) i C_2 (365) utvrđeno da je galaktozil jedinica vezana za glukozil grupu na salicinu. Takođe, $^{0,4}A_2$ (245 m/z) fragment potvrđuje da β -galaktozidaza iz *A.oryzae* katalizuje transfer glukozilnog ostatka na primarnu hidroksilnu grupu glukozne jedinice salicina, pre nego na ostale sekundarne hidroksilne grupe (Slika 4.88c).



Slika 4.88. Jonski mobilogram jona na 471 m/z (a). MS/MS spektar jona na 471 m/z (b) i predložena struktura na osnovu fragmentacije (c).

4.6.1.1.2. Optimizacija eksperimentalnih faktora

Kao i u slučaju sinteze galakto-oligosaharida, posebnu pažnju treba obratiti na optimizaciju uslova imajući u vidu veliki broj reakcija katalizovanih β -galaktozidazom, koje se odigravaju paralelno. Naime, paralelno sa sintezom galaktozida salicina dolazi i do reakcija u koje salicin i nije uključen, a kao to su hidroliza laktoze i sinteza/hidroliza galaktooligosaharida (Slika 4.89). Brzine ovih reakcija zavise od velikog broja faktora kao što su priroda i koncentracija enzima, koncentracija supstrata, dužina trajanja reakcije, temperatura i karakteristike reakcionog medijuma ^{77, 185, 366}. Imajući u vidu prethodno dobijene rezultate da temperatura i pH ne utiču značajno na transgalaktozilacionu aktivnost β -galaktozidaze iz *A.oryzae*, u narednom eksperimentu ispitaćemo uticaj koncentracije oba supstrata (salicin i laktoza), enzima i vreme trajanja reakcije na dve izlazne veličine koncentraciju proizvoda (mM) i produktivnost (mM/h).



Slika 4.89. Šematski prikaz reakcija koje se odigravaju u toku sinteze galaktozida salicina

5.1.2.1. Uticaj eksperimentalnih faktora na prinos galaktozida salicina

Plan primenjen u ovom istraživanju uključuje 30 eksperimentalnih tačaka: 16 faktorskih, 8 aksijalnih i 6 centralnih. U tabeli 4.12 su prikazane kodirane i stvarne vrednosti eksperimentalnih faktora, kao i rezultati izvedenih eksperimenata. Eksperimenti su izvođeni nasumično u cilju eliminisanja eventualnih sistematskih grešaka eksperimenta. Dobijeni rezultati su modelovani jednačinom drugog reda koja uključuje članove koji opisuju interakciju između različitih faktora.

4.6.1.1.2.1. Uticaj faktora na prinos galaktozida salicina

U ovom eksperimentu, kao što se može videti iz tabele 4.12, najveći prinos proizvoda (galaktozida salicina) se postiže u eksperimentu 23 (18,884 mM), pri koncentraciji laktoze 180 mM, koncentraciji salicina 85 mM, koncentraciji enzima 280 za 4,5 h. Sa druge strane, najniži prinos (0,0667 mM) se postiže u eksperimentu 25, pri koncentraciji laktoze 320 mM, koncentraciji salicina 10 mM i koncentraciji enzima 200 IU za 7 h.

Izračunata vrednost Fišerovog testa (Fr) iznosi 3,75. Teorijska vrednost Fišerovog testa za nivo značajnosti 5% iznosi 4,58. Pošto je izračunata vrednost manja od teorijske, može se zaključiti da je model adekvatan.

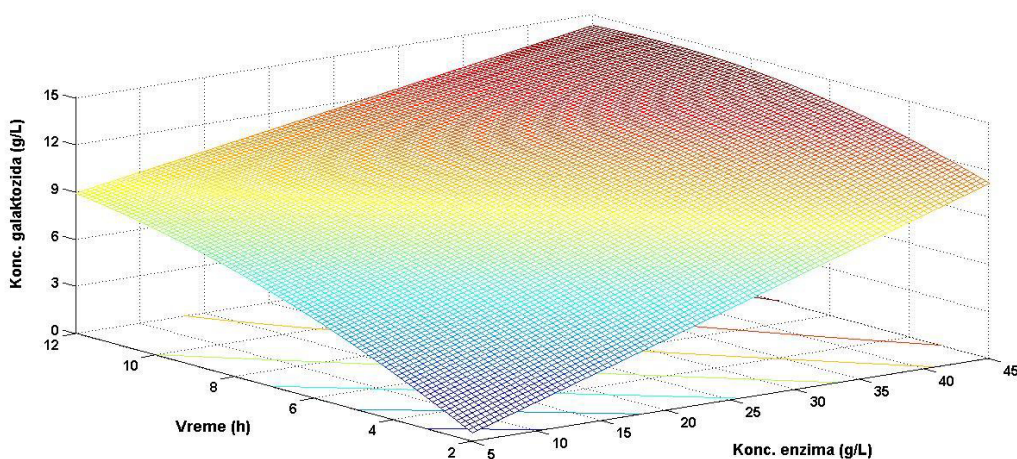
Tabela 4.12. Kodirane i stvarne vrednosti eksperimentalnih faktora

Uzorak	Konc. laktoze (mM)	Konc. salicina (mM)	Konc. enzima (IU)	Vreme (h)	Prinos proizvoda (mM)	Produktivnost (mM/h)
1	0 (320)	0 (60)	0 (200)	-2 (2)	0,781	0,390
2	-1 (180)	1 (85)	-1 (120)	-1 (4,5)	6,049	1,350
3	-1 (180)	-1 (35)	1 (280)	1 (9,5)	3,058	0,322
4	1 (460)	1 (85)	1 (280)	1 (9,5)	12,23	1,290
5	-2 (40)	0 (60)	0 (280)	0 (7)	3,839	0,549
6	1 (460)	-1 (35)	1 (280)	-1 (4,5)	1,741	0,385
7	2 (600)	0 (60)	0 (200)	0 (7)	3,862	0,550
8	1 (460)	-1 (35)	-1 (120)	1 (9,5)	1,875	0,197
9	1 (460)	1 (85)	-1 (120)	-1 (4,5)	1,920	0,424
10	1 (460)	1 (85)	1 (280)	-1 (4,5)	7,634	1,69
11	-1 (180)	1 (85)	1 (280)	1 (9,5)	15,335	1,61
12	0 (320)	0 (60)	0 (200)	0 (7)	7,500	0,943
13	0 (320)	0 (60)	2 (360)	0 (7)	9,286	1,33
14	1 (460)	-1 (35)	-1 (120)	-1 (4,5)	2,076	0,462
15	0 (320)	0 (60)	0 (200)	0 (7)	7,924	1,06
16	-1 (180)	-1 (35)	-1 (120)	1 (9,5)	2,054	0,217
17	0 (320)	0 (60)	0 (200)	0 (7)	7,991	1,22
18	0 (320)	0 (60)	0 (200)	0 (7)	7,879	1,18
19	0 (320)	0 (60)	-2 (40)	0 (7)	1,429	0,203
20	-1 (180)	1 (85)	-1 (120)	1 (9,5)	17,098	1,81
21	-1 (180)	-1 (35)	1 (280)	-1 (4,5)	5,313	1,18
22	0 (320)	2 (110)	0 (200)	0 (7)	13,884	1,98
23	-1 (180)	1 (85)	1 (280)	-1 (4,5)	18,884	4,19
24	1 (460)	1 (85)	-1 (120)	1 (9,5)	4,732	0,498
25	0 (320)	-2 (10)	0 (200)	0 (7)	0,067	0,00839
26	0 (320)	0 (60)	0 (200)	2 (12)	6,429	0,536
27	0 (320)	0 (60)	0 (200)	0 (7)	9,219	1,34
28	1 (460)	-1 (35)	1 (280)	1 (9,5)	3,125	0,329
29	0 (320)	0 (60)	0 (200)	0 (7)	6,272	0,795
30	-1 (180)	-1 (35)	-1 (120)	-1 (4,5)	3,973	0,882

Signifikantnost parametara modela je ispitana Studentovim testom i nakon odbacivanja nesignifikantnih parametara dobijen je regresioni model sledećeg oblika:

$$Y = 7,90 - 1,52 \cdot X_1 + 3,68 \cdot X_2 + 1,81 \cdot X_3 + 0,969 \cdot X_4 - 0,686 \cdot X_4^2 - 0,626 \cdot X_1^2 - 1,59 \cdot X_1 \cdot X_2 + 1,32 \cdot X_2 \cdot X_3 + 1,12 \cdot X_2 \cdot X_4 - 0,725 \cdot X_3 \cdot X_4 \quad (4.26)$$

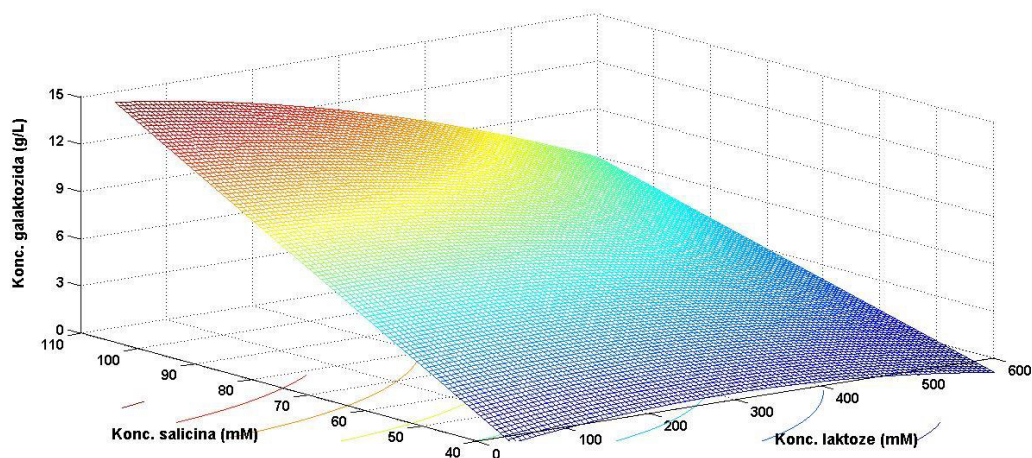
Rezultati Studentovog testa pokazali su da su svi linearni regresioni koeficijenti: β_1 , β_2 , β_3 , β_4 signifikantni. Oba signifikantna kvadratna regresiona koeficijenta β_{11} i β_{44} imaju negativnu vrednost, što ukazuje na to da se njihov uticaj na prinos galaktozida salicina može opisati kvadratnom funkcijom sa maksimumom. Takođe, utvrđeno je da postoji pozitivna interakcija između koncentracije salicina (X_2) i koncentracije enzima (X_3), kao i između koncentracije salicina (X_2) i vremena reakcije (X_4). Negativna interakcija je uočena između koncentracije laktoze (X_1) i koncentracije salicina (X_2) i koncentracije enzima (X_3) i vremena reakcije (X_4). Uticaji najinteresantnijih parova faktora na prinos galaktozida salicina su ilustrovani trodimenzionalnim odzivnim površinama i/ili konturnim dijagramima.



Slika 4.90. Odzivna površina uticaja koncentracije enzima i vremena na prinos galaktozida. Ostali eksperimentalni faktori su fiksirani na $X_1=2$ i $X_2=2$

Efekte koncentracije enzima i vremena reakcije predviđene po modelu su prikazani na slici 4.90. Može se uočiti da oba faktora imaju pozitivan uticaj na prinos galaktozida salicina. Povećanje koncentracije enzima dovodi do linearanog povećanja prinosa proizvoda u celom vremenskom opsegu. Povećanje prinosa sa koncentracijom enzima je izraženije pri nižim vremenima reakcija, ali se sa druge strane pri većim vremenima postižu veći prinosi. Uticaj vremena reakcije (X_4) se

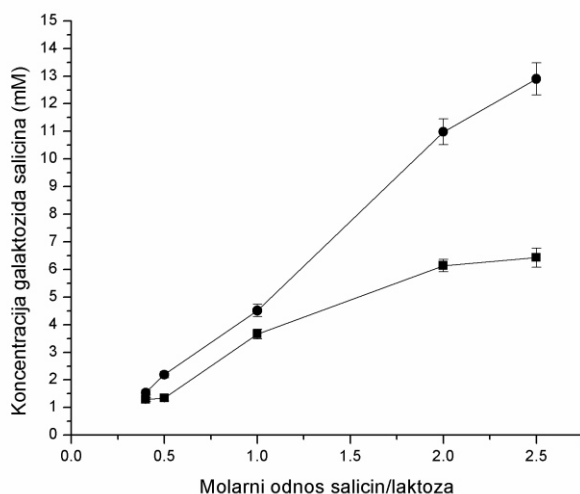
zbog negativnog kvadratnog koeficijenta može opisati grafički kao funkcija sa maksimumom. Tačan trenutak dostizanja maksimalnog prinosa zavisi od koncentracije enzima, zahvaljujući negativnoj interakciji između ovih faktora (β_{34}), tako da pri minimalnoj koncentraciji enzima konstantan porast u prinosu proizvoda je primećena, dok pri maksimalnoj koncentraciji enzima dolazi do dostizanja platoa nakon već 6 h. Ovde je važno naglasiti da u celom ispitivanom opsegu nije došlo do smanjenja prinosa proizvoda, što mnogo govori o stabilnosti ovog proizvoda. Naime, produkti transgalaktozilacije najčeće nisu finalni produkti reakcije, jer nakon nekog vremena počinje da prevladava reakcija hidrolize i oni bivaju hidrolizovani. Ovo, međutim, nije slučaj sa galaktozidom salicina, za šta je najverovatnije zaslužna njegova struktura koja otežava pristup aktivnom centru enzima.



Slika 4.91. Odzivna površina uticaja koncentracije oba supstrata na prinos galaktozida salicina. Ostali eksperimentalni faktori su fiksirani na $X_3=2$ i $X_4=2$

Uticaj koncentracije supstrata (laktoze i salicina) na prinos reakcije prikazan je na slici 4.91. Sa grafika se može videti da zahvaljujući negativnoj interakciji između ovih faktora (β_{12}) povećanje koncentracije laktoze uzrokuje povećanje prinosa galaktozida salicina samo pri izuzetno niskim koncentracijama salicina, dok je pri višim koncentracijama salicina primetan samo pad prinosa proizvoda. Najveći prinos galaktozida salicina se uočava pri najvišim koncentracijama salicina i najnižim koncentracijama laktoze, odnosno kada je salicin u višku. Ovakva pojava

može se objasniti činjenicom da je verovatnoća vezivanja galaktoze na salicin veća ukoliko je povećana koncentracija salicina u okolini enzim-galaktozil kompleksa (Slika 4.89). Sa druge strane, u slučaju povećanja koncentracije laktoze, dolazi do povećanog stvaranja galakto-oligosaharida. Kako bismo dokazali ovu tvrdnju urađen je dodatni eksperiment pri dve fiksirane koncentracije laktoze i različitim molarnim odnosima salicin/laktoza. U toku reakcije praćene su koncentracija GOS-a i koncentracija galaktozida salicina.



Slika 4.92. Uticaj molarnog odnosa salicin/laktoza na koncentraciju produkovanog galaktozida salicina pri fiksiranim koncentracijama laktoze: (■) 60 mM (●) 180 mM

Pokazalo se da je koncentracija GOS-a nezavisna od molarnog odnosa salicin/galaktoza i samim tim konstantna u celom ispitanom opsegu, odnosno da zavisi isključivo od početne koncentracije laktoze. Tako su ostvarene koncentracije GOS-a iznosile $23,99 \pm 1,0$ mM u slučaju koncentracije laktoze 60 mM i $40,64 \pm 1,78$ mM u slučaju koncentracije laktoze 180 mM. Međutim, koncentracija galaktozida salicina značajno raste sa povećanjem molarnog odnosa, što je još izraženije pri većim koncentracijama laktoze.

Konačno, poređenjem prinosa dobijenih u eksperimentalnom dizajnu i rezultata predviđenih regresionim modelom, primetno je da model predviđa znatno veći prinos galaktozida salicina od onog ostvarenog u eksperimentalnom dizajnu, što

ukazuje na činjenicu da eksperimentalnim planom nije bio obuhvaćen eksperiment pod optimalnim uslovima. Predviđeni optimalni uslovi za ovu reakciju su: koncentracija laktoze 40 mM, koncentracija salicina 110 mm, koncentracija enzima 360 IU i vreme reakcije 12 h. Pri ovim uslovima predviđeni prinos iznosi 31,875 mM, što je višestruko veće od najboljeg prinosa 18,884 mM u eksperimentu 23. Da bismo ocenili tačnost predikcije ovog modela urađen je dodatni eksperiment, pod optimalnim uslovima. Koncentracija proizvoda u ovom dodatnom eksperimentu iznosila je 30,8 mM, što je samo 3,2% manje od predviđene vrednosti, i ukazuje na činjenicu da je izvedeni model valjan.

4.6.1.1.2.2. Uticaj faktora na produktivnost proizvodnje galaktozida salicina

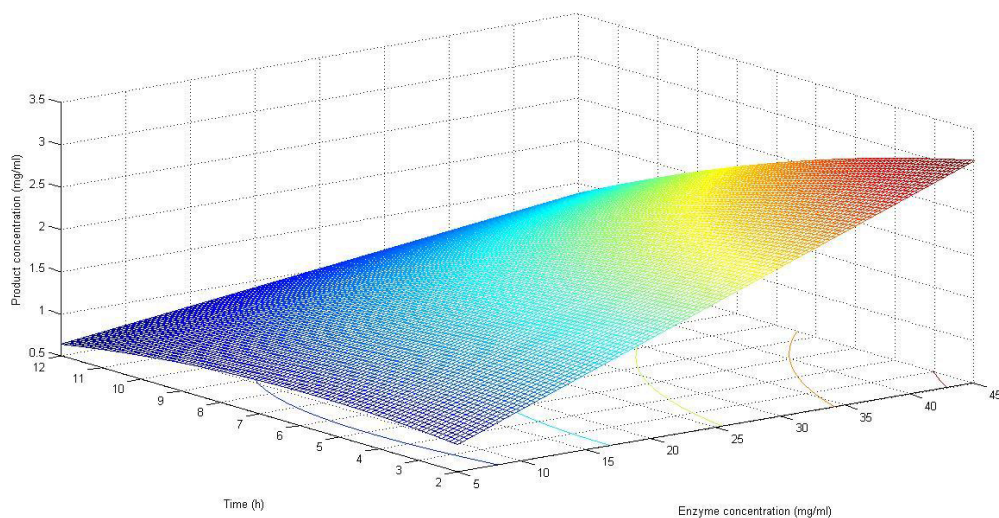
Cilj ovog eksperimenta bio je da se oceni produktivnost enzimskog procesa sinteze galaktozida salicina, kao i da se proceni uticaj faktora. Kao što se može videti iz tabele 22., najveća produktivnost sinteze galaktozida salicina (4,19 mM/h) postiže se u eksperimentu 23, na najmanja (0,00839 mM/h) u eksperimentu 25., kao i u prethodnom slučaju.

Izračunata vrednost Fišerovog testa (Fr) iznosi 4,12, i kao u prethodnom slučaju može se zaključiti da je model adekvatan. Signifikantnost parametara modela je ispitana Studentovim testom i nakon odbacivanja nesignifikantnih parametara dobijen je regresioni model sledećeg oblika:

$$Y = 1,11 - 0,262 \cdot X_1 + 0,535 \cdot X_2 + 0,311 \cdot X_3 + 0,168 \cdot X_4 - 0,0862 \cdot X_4^2 - 0,239 \cdot X_1 \cdot X_2 + 0,268 \cdot X_2 \cdot X_3 + 0,188 \cdot X_1 \cdot X_4 - 0,22 \cdot X_3 \cdot X_4 \quad (4.27)$$

Rezultati Studentovog testa pokazali su da su svi linearni regresioni koeficijenti: β_1 , β_2 , β_3 , β_4 signifikantni. Kvadratni regresioni koeficijent β_{44} ima negativnu vrednost, što ukazuje na to da se njegov uticaj na produktivnost može opisati kvadratnom funkcijom sa maksimumom. Takođe, utvrđeno je da postoji pozitivna interakcija između koncentracije salicina (X_2) i koncentracije enzima (X_3), kao i između koncentracije laktoze (X_1) i vremena reakcije (X_4). Negativna interakcija je uočena između koncentracije laktoze (X_1) i koncentracije salicina (X_2) i koncentracije enzima (X_3) i vremena reakcije (X_4). Uticaji najinteresantnijih parova faktora na

prinos galaktozida salicina su ilustrovani trodimenzionalnim odzivnim površinama i/ili konturnim dijagramima.

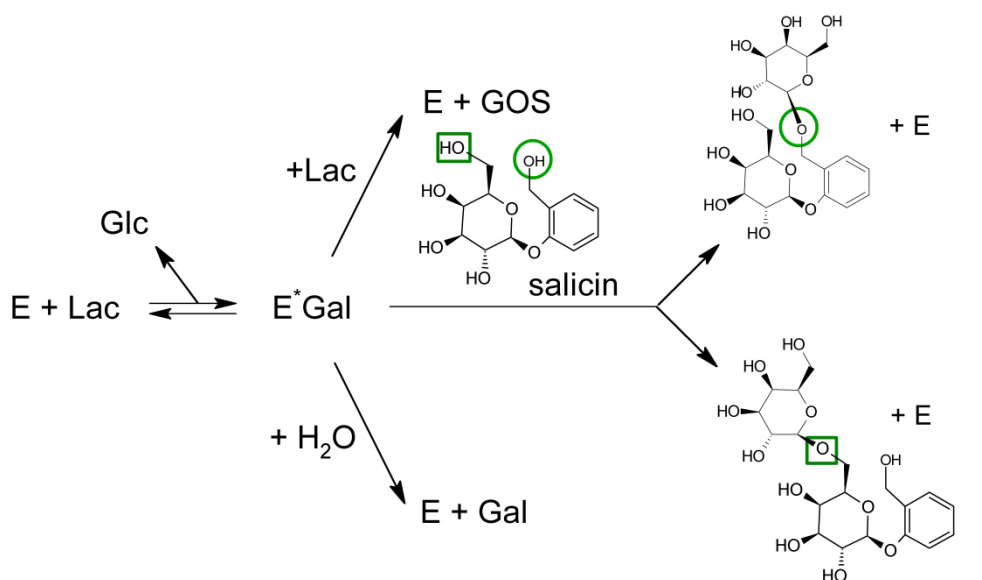


Slika 4.93 Odzivna površina uticaja koncentracije vremena i koncentracije enzima na produktivnost procesa sinteze galaktozida salicina. Ostali eksperimentalni faktori su fiksirani na $X_1=-2$ i $X_2=2$

Poredeći ova dva modela može se zaključiti da vreme pokazuje uticaj na produktivnost, jer se maksimalna produktivnost postiže već nakon 2h. Zahvaljujući negativnoj interakciji između ovih faktora (β_{34}) uticaj vremena je znatno izraženiji pri višim koncentracijama enzima. U cilju provere tačnosti predviđanja modela, izveden je dodatni eksperiment pri optimalnim uslovima (koncentracija laktoze 40 mM, koncentracija salicina 110 mM, koncentracija enzima 360 IU i reakciono vreme 2h). Rezultat produktivnosti u ovom eksperimentu iznosio je 7,2 mM/h, što je 4,5% više od predviđene vrednosti. Kako bismo utvrdili efikasnost ove reakcije, uporedili smo dobijenu produktivnost sa literaturnim podacima za slične akceptore, kao što su: vanilil i homovanilil alkohol ³⁶⁷, hlorfensin ³⁶⁸, aciklovir ³⁶⁹ i hidrohinon ³⁷⁰. Prosečne vrednosti produktivnosti u ovim reakcijama kretale su se u opsegu 0,7-3,7 mM/h što je značajno niže nego u ovom radu.

4.6.1.2. Sinteza galaktozida salicina pomoću β -galaktozidaze iz *L. acidophilus*

Nakon detaljne optimizacije sinteze galaktozida salicina pomoću komercijalnog enzima, saznanja o uticajima ključnih reakcionih uslova iskorišćena su za ispitivanje reakcije sinteze ovog jedinjenja pomoću izolovanog enzima iz *L. acidophilus*. Naime, u ovoj reakciji usvojene su optimalne vrednosti koncentracije reaktanata: koncentracija laktoze 40 mM, koncentracija salicina 110 mM, dok je uneta enzimaska aktivnost bila znatno manja (30 IU), što je posledica činjenice da su svi reaktanti u reakciji rastvoreni u odgovarajućoj zapremini tečnog enzimskog preparata (pH 6,8).



Slika 4.94. Sematski prikaz reakcije sinteze galaktozida salicina pomoću β -galaktozidaze *L. acidophilus*

Prilikom analize rezultata detektovana su dva proizvoda (Slika 4.94), kod kojih je molekul galaktoze bio vezan za primarne grupe glukoze (Gal-Glc-Sal), odnosno fenola (Gal-Sal-Glc). Interesantno je da u reakciji sa komercijalnim enzimom dobijen samo jedan proizvod, i to onaj kod koga je galaktoza vezana za molekul salicina preko primarne grupe galaktoze (Gal-Glc-Sal), a koji u ovom slučaju predstavlja manje dominantan proizvod. Naime, međusoban odnos koncentracija proizvoda pri najvišoj ostvarenoj (3,6 mM) jeste 4,2 u korist dominantnijeg proizvoda. Iako je prinos značajno manji u odnosu na prinose dobijene pomoću

komercijalnog enzima, ova reakcija je dala doprinos u sagledavanju različitih specifičnosti ovih enzima.

4.6.2. Sinteza galaktozida sorbitola

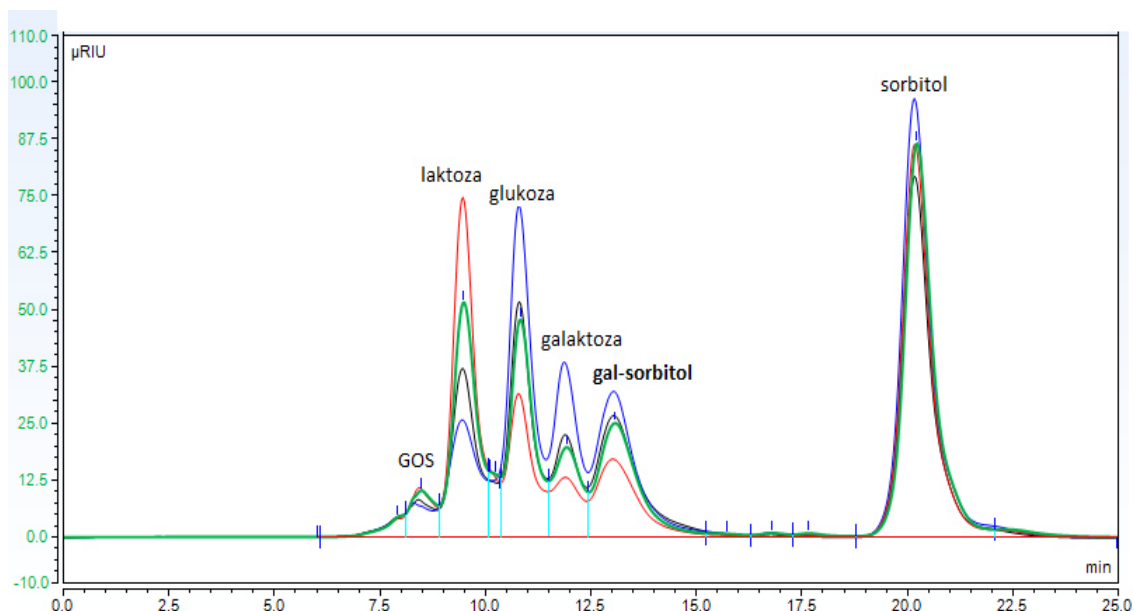
Rastuće tržište prebiotika zahteva stalna istraživanja mogućnosti dobijanja novih raznovrsnijih smeša prebiotika poboljšanih funkcionalnih, ali i fizičko-hemijskih karakteristika koji će potom imati primenu u širokoj paleti proizvoda prehrambene i farmaceutske industrije. Galaktozidi šećernih alkohola, formirani tokom reakcije transgalaktozilacije, predstavljaju izuzetno zanimljiva jedinjenja zahvaljujući činjenici da kombinuju funkcionalna dejstva šećernih alkohola i galaktozida. U ovom radu opredelili smo se za korišćenje šećernog alkohola sorbitola, kao supstance sa priznatim GRAS statusom. Sorbitol se uglavnom koristi kao niskokalorični zaslađivač u slatkišima i žvakaćim gumama bez šećera, ali i u hrani za dijabetičare. U kombinaciji s drugim šećerima sorbitol menja organoleptička svojstva hrane, stabilizuje rastvore i sprečava kristalizaciju drugih supstanci u toku čuvanja. Takođe se može koristiti kao sredstvo za vezivanje vode i sprečavanje preteranog sušenja proizvoda. Ne razgrađuju ga bakterije usne duplje, pa sprečava pojavu karijesa. Zahvaljujući navedenim osobinama, sorbitol predstavlja izuzetno atraktivno jedinjenje za primenu u reakciji transgalaktozilacije. Takođe, važno je istaći da galaktozid sorbitola predstavlja strukturni izomer potvrđenog funkcionalno aktivnog jedinjenja laktitola, koji je do sada bilo moguće dobiti isključivo organskom sintezom.

4.6.2.1. Sinteza galaktozida sorbitola pomoću β -galaktozidaze iz *A. oryzae*

4.6.2.1.1. Optimizacija sinteze galaktozida sorbitola

Budući da se u prethodnim poglavljima nedvosmisleno pokazalo da je optimizacija uslova reakcije transgalaktozilacije veoma zahtevan zadatak, prevashodno zahvaljujući postojanju brojnih interakcija među ključnim parametrima reakcije, i u ovom slučaju primenjena je metoda statističkog planiranja eksperimenta sa ciljem postizanja maksimalnog prinosa i produktivnosti reakcije sinteze

galaktozida sorbitola. Pre primene eksperimentalnog plana, izvedeni su preliminarni eksperimenti kako bi utvrdili adekvatnost već opisane metode za detekciju šećera za detekciju ovog proizvoda. Eksperiment je izveden pri sledećim uslovima: koncentracija laktoze 200 mM, koncentracija sorbitola 400 mM (što odgovara molarnom odnosu sorbitol/laktoza 2), koncentracija enzima β -galaktozidaze iz *A. oryzae* 0,75 mg/ml, u 0,1M natrijum-acetatnom puferu (pH 4,5) na 50 °C, a uzorci su uzimani na 1, 2, 4 i 6 h (Slika 4.95).

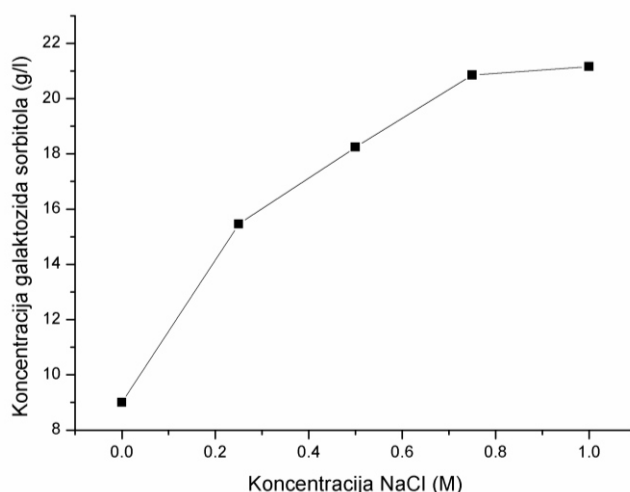


Slika 4.95. Hromatogram reakcione smeše nakon: 1 h (crvena linija), 2 h (zelena linija), 4 h (crna linija) i 6 h (plava linija)

Kao što se sa slike 4.95 jasno može primetiti svi pikovi su jasno razdvojeni i ova metoda biće dalje primenjena pri analiziranju rezultata. Kao što je od ranije poznato koncentracija enzima, laktoze, alternativnog akceptora i vreme predstavljaju ključne parametre za optimizaciju sinteze galaktozida. Međutim, u ovom eksperimentu uveden je još jedan faktor (koncentracija NaCl), koji bi mogao da doprinese poboljšanju prinosa proizvoda. Naime, smatra se da je dodatkom NaCl moguće smanjiti aktivnost vode i na taj način omogućiti favorizovanje reakcije transgalaktozilacije u odnosu na reakciju hidrolize. U cilju testiranja ove hipoteze, urađeni su dodatni eksperimenti, variranjem početne koncentracije NaCl u opsegu 0-1,0 M. Rezultati ovog eksperimenta (slika 4.96) pokazali su da sa

povećanjem koncentracije do koncentracije od 0,8 M NaCl dolazi do značajnog povećanja prinosa galaktozida sorbitola i da ima smisla uvrstiti ga među ispitivane faktore u nastavku optimizacije reakcije sinteze galaktozida sorbitola.

Dalja optimizacija sinteze galaktozida sorbitola izvršena je primenom centralnog kompozitnog rotatabilnog eksperimentalnog plana (Tabela 4.13), a za tumačenje rezultata i određivanje optimalnih vrednosti ispitivanih parametara (koncentracija enzima, koncentracija laktoze, molarni odnos laktoze i sorbitola, koncentracija NaCl i dužina trajanja reakcije) korišćena je metoda odzivnih površina.



Slika 4.96. Uticaj koncentracije NaCl na prinos galaktozida sorbitola

Eksperimentalni faktori su ispitani u sledećim opsezima vrednosti: koncentracija enzima, X_1 (0,2-1,0 mg/ml), koncentracija laktoze, X_2 (100-500 mM), molarni odnos sorbitola i laktoze, X_3 (1-9), koncentracija NaCl, X_4 (0-0,8 M) i vreme reakcije, X_5 (0,5-6,5 h). Eksperimentalni plan se sastojao iz 32 eksperimenata izvedena slučajnim redosledom, a tokom eksperimenata praćene su dve izlazne veličine: koncentracija galaktozida sorbitola (g/l) i produktivnost galaktozida sorbitola (g/g enzima).

4.6.2.1.1.1. Uticaj reakcionih parametara na koncentraciju galaktozida sorbitola

Najveći prinos proizvoda (41,86 g/l) dobijen je u eksperimentu br. 10, pri koncentraciji enzima od 0,8 mg/ml, početnoj koncentraciji laktoze od 400 mM, molarnom odnosu sorbitola i laktoze 7, koncentraciji NaCl 0,6 M nakon 5 h.

Nasuprot tome, minimalan prinos (1,5 g/l) postignut je u eksperimentu br. 6 pri koncentraciji enzima od 0,6 mg/ml, početnoj koncentraciji laktoze od 300 mM, molarnom odnosu sorbitola i laktoze 5, koncentraciji NaCl 0,4 M nakon 0,5 h.

Tabela 4.13. Kodirane i stvarne vrednosti faktora u eksperimentalnom planu

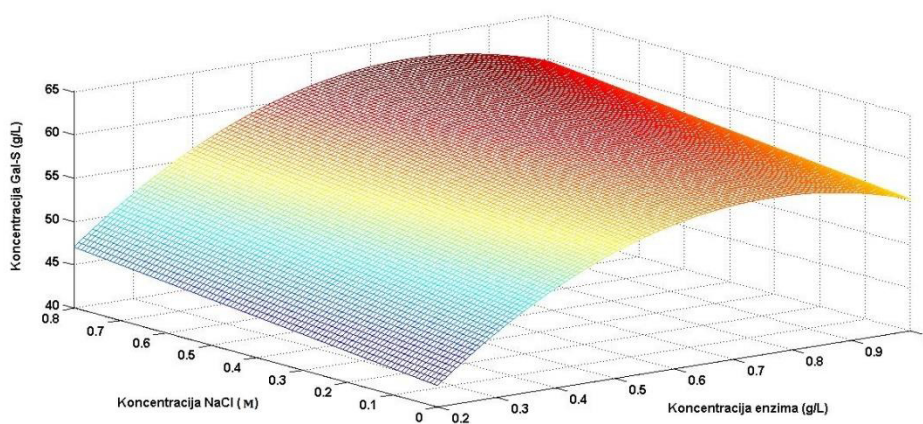
Eksp.	Konc. enzima (mg/ml)	Konc. laktoze (mM)	Molarni odnos Supstrata	Konc. NaCl (M)	Vreme (h)	Prinos proizvoda (g/l)	Produktivnost (g/g enz)
1	0 (0,6)	0 (300)	0 (5)	0 (0,4)	0 (3,5)	32,36	53,93
2	0 (0,6)	0 (300)	0 (5)	0 (0,4)	0 (3,5)	29,65	49,42
3	0 (0,6)	0 (300)	0 (5)	0 (0,4)	0 (3,5)	25,46	42,43
4	-2 (0,2)	0 (300)	0 (5)	0 (0,4)	0 (3,5)	7,91	39,54
5	-1 (0,4)	-1 (200)	-1 (3)	1 (0,6)	-1 (2)	18,76	46,90
6	0 (0,6)	0 (300)	0 (5)	0 (0,4)	-2 (0,5)	1,50	2,50
7	-1 (0,4)	-1 (200)	1 (7)	1 (0,6)	1 (5)	22,40	56,00
8	-1 (0,4)	-1 (200)	1 (7)	-1 (0,2)	-1 (2)	15,09	37,73
9	1 (0,8)	-1 (200)	-1 (3)	1 (0,6)	1 (5)	19,58	24,48
10	1 (0,8)	1 (400)	1 (7)	1 (0,6)	1 (5)	41,86	52,32
11	0 (0,6)	2 (500)	0 (5)	0 (0,4)	0 (3,5)	27,84	46,40
12	0 (0,6)	0 (300)	0 (5)	0 (0,4)	2 (6,5)	32,17	53,62
13	-1 (0,4)	1 (400)	-1 (3)	1 (0,6)	1 (5)	38,75	96,89
14	1 (0,8)	-1 (200)	1 (7)	-1 (0,2)	1 (5)	22,35	27,94
15	-1 (0,4)	1 (400)	1 (7)	1 (0,6)	-1 (2)	5,75	14,38
16	1 (0,8)	-1 (200)	-1 (3)	-1 (0,2)	-1 (2)	15,69	19,61
17	0 (0,6)	0 (300)	0 (5)	0 (0,4)	0 (3,5)	27,84	46,39
18	-1 (0,4)	1 (400)	1 (7)	-1 (0,2)	1 (5)	37,90	94,76
19	1 (0,8)	1 (400)	-1 (3)	1 (0,6)	-1 (2)	27,69	34,61
20	1 (0,8)	-1 (200)	1 (7)	1 (0,6)	-1 (2)	19,11	23,89
21	1 (0,8)	1 (400)	1 (7)	-1 (0,2)	-1 (2)	4,03	5,04
22	0 (0,6)	0 (300)	-2 (1)	0 (0,4)	0 (3,5)	21,43	35,71
23	0 (0,6)	-2 (100)	0 (5)	0 (0,4)	0 (3,5)	11,01	18,34
24	-1 (0,4)	-1 (200)	-1 (3)	-1 (0,2)	1 (5)	7,21	18,02
25	0 (0,6)	0 (300)	0 (5)	2 (0,8)	0 (3,5)	19,38	32,30
26	1 (0,8)	1 (400)	-1 (3)	-1 (0,2)	1 (5)	35,63	44,53
27	0 (0,6)	0 (300)	2 (9)	0 (0,4)	0 (3,5)	38,81	64,68
28	0 (0,6)	0 (300)	0 (5)	0 (0,4)	0 (3,5)	33,67	56,11
29	2 (1,0)	0 (300)	0 (5)	0 (0,4)	0 (3,5)	34,26	34,26
30	0 (0,6)	0 (300)	0 (5)	0 (0,4)	0 (3,5)	27,69	46,16
31	-1 (0,4)	1 (400)	-1 (3)	-1 (0,2)	-1 (2)	16,60	41,50
32	0 (0,6)	0 (300)	0 (5)	-2 (0,0)	0 (3,5)	28,27	47,11

Adekvatnost regresionog modela je procenjena primenom Fišerovog testa, pri čemu izračunata vrednost ovog parametra iznosi 2,74, pa se može zaključiti da je

model signifikantan. Signifikantnost parametara modela je ispitana Studentovim testom, a izračunate vrednosti su upoređene sa tabličnim vrednostima Studentovog testa. Nakon ove statističke analize utvrđeno je da su signifikantni koeficijenti regresije $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4, \beta_5, \beta_{23}, \beta_{25}, \beta_{35}, \beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{55}$, odnosno dobijen je regresioni model sledećeg oblika:

$$Y(g/l) = 29,59 + 3,17 \cdot X_1 + 4,24 \cdot X_2 + 0,97 \cdot X_3 + 1,13 \cdot X_4 + 6,93 \cdot X_5 - 2,93 \cdot X_2 \cdot X_3 + 6,07 \cdot X_2 \cdot X_5 + 3,63 \cdot X_3 \cdot X_5 - 1,96 \cdot X_1^2 - 2,37 \cdot X_2^2 - 3,14 \cdot X_5^2 \quad (4.28)$$

Kao što se iz jednačine može jasno uočiti, rezultati Studentovog testa pokazali su da su svi linearni regresioni koeficijenti signifikantni, dok su od kvadratnih regresionih koeficijenata signifikantni β_{11}, β_{22} i β_{55} . Sva tri kvadratna koeficijenta imaju negativnu vrednost, što upućuje na to da se njihov uticaj na prinos proizvoda može opisati kvadratnom funkcijom sa maksimumom. Takođe, može se primetiti da su signifikantni i koeficijenti $\beta_{23}, \beta_{25}, \beta_{35}$, odnosno da postoje interakcije između koncentracije laktoze (X_2) i molarnog odnosa (X_3), koncentracije laktoze (X_2) i vremena (X_5), i molarnog odnosa supstrata (X_3) i vremena (X_5), redom. Uticaji parova faktora na prinos proizvoda predstavljeni su dijagramima odzivnih površina.

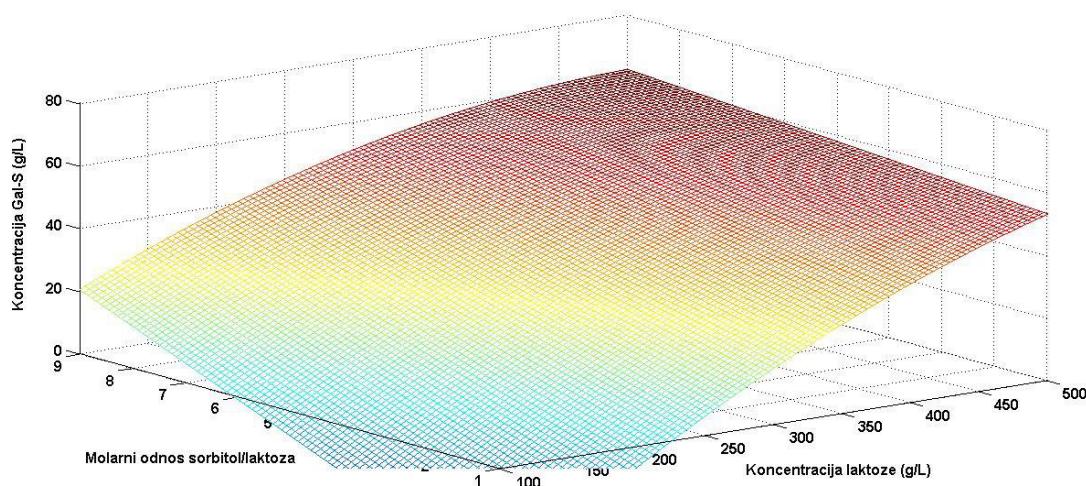


Slika 4.97. Uticaj koncentracije enzima i koncentracije NaCl na prinos galaktozida sorbitola prikazan kao odzivna površina. Ostali faktori su fiksirani na $X_2=2, X_3=2$ i $X_4=2$.

Uticaj koncentracije enzima (X_1) opisuje kvadratna funkcija koja ima negativan kvadratni koeficijent (β_{11}), pa se grafički ona može predstaviti kvadratnom

funkcijom sa maksimumom (slika 4.97). Može se videti da se maksimalan prinos galaktozida sorbitola postiže pri koncentraciji enzima od 0,76 mg/ml, kada su ostali parametri: koncentracija laktoze 500 mM, molarni odnos sorbitola i laktoze 9, koncentracija NaCl 0,8 M i za vreme 6,5 h. Kada se posmatra uticaj koncentracije NaCl (X_4), može se uočiti da sa porastom koncentracije NaCl dolazi do neznatnog, ali konstantnog linearnog rasta prinosa proizvoda, što je posledica pozitivnog linearnog regresionog koeficijenta za ovaj faktor. Pozitivan efekat NaCl nije iznenađujući, imajući u vidu njegovu osnovnu funkciju, a to je da smanji dostupnost vode kao akceptora galaktozil grupe, čime se suzbija reakcija hidrolize.

Uticaj početne koncentracije laktoze (X_2) takođe se može predstaviti kao kvadratna funkcija sa maksimumom, zbog negativnog kvadratnog koeficijenta (β_{22}). Međutim, uticaj laktoze na prinos galaktozida sorbitola u mnogome je složeniji od uticaja koncentracije enzima jer dolazi do lokalnog pomeranja maksimuma zbog postojanja interakcija sa drugim faktorima, i to negativne interakcije sa molarnim odnosom supstrata (β_{23}) i pozitivne interakcije sa vremenom trajanja reakcije (β_{25}).

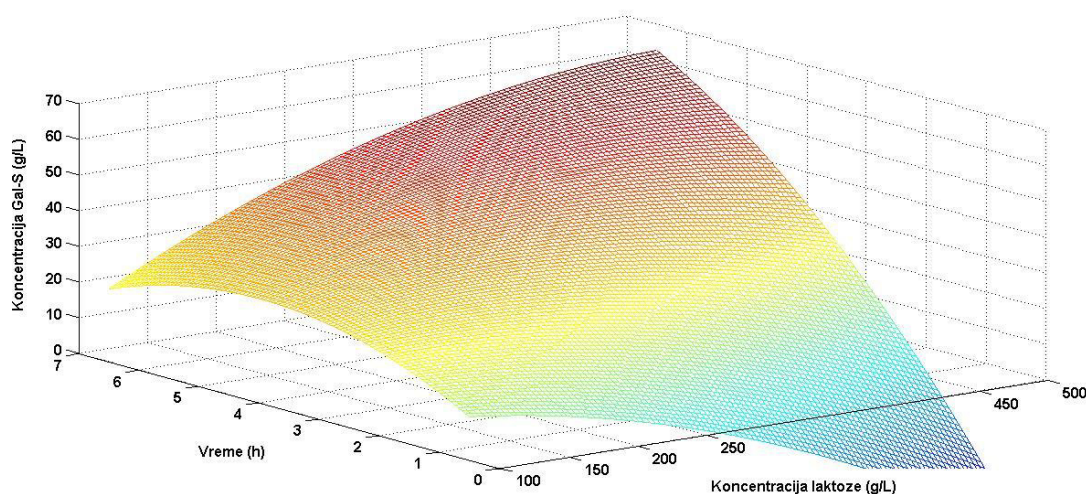


Slika 4.98. Uticaj koncentracije laktoze i molarnog odnosa supstrata na prinos galaktozida sorbitola prikazan kao odzivna površina. Ostali faktori su fiksirani na $X_1=0,8$, $X_4=2$ i $X_5=2$.

Ove interakcije prikazane su na slikama 4.98 i 4.99. Generalno, sa porastom početne koncentracije laktoze dolazi do porasta prinosa proizvoda u ispitivanom

opsegu parametara, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima da sa povećanjem početne koncentracije laktoze dolazi do favorizovanja reakcije transgalaktozilacije, a samim tim i do porasta koncentracije dobijenih galaktozida.^{74, 177}

Sa slike 139. se može uočiti da oba faktora imaju pozitivan uticaj na prinos galaktozida sorbitola u celokupnom ispitivanom opsegu. Povećanje prinosa sa molarnim odnosom supstrata je izraženije pri nižim početnim koncentracijama laktoze, nego pri višim, ali se sa druge strane pri višim koncentracijama laktoze postižu veći prinosi. Ovakvo ponašanje sistema može se objasniti činjenicom da u uslovima jako visokih koncentracija laktoze, a naročito visokog molarnog odnosa sorbitola i laktoze dolazi do smanjenja aktivnosti enzima, dok je sa druge strane moguća kristalizacija supstrata usled slabe rastvorljivosti, čime je smanjena njihova dostupnost za reakciju. Sa druge strane, povećanje koncentracije laktoze dovodi do linearanog povećanja prinosa, ali se može primetiti da pri visokim molskim odnosima, prinos počinje da ulazi u plato povećanjem koncentracije laktoze iznad 400 mM.



Slika 4.99. Uticaj koncentracije laktoze i vremena na prinos galaktozida sorbitola prikazan kao odzivna površina. Ostali faktori su fiksirani na $X_1=-2$, $X_3=-2$ i $X_4=2$.

Da se uticaj koncentracija laktoze može opisati kvadratnom funkcijom sa maksimumom još jasnije se vidi na slici 4.99 na kojoj je predstavljen uticaj početne

koncentracije laktoze i vremena reakcije (Slika 4.99) Naime, pri kratkim vremenima reakcije, može se primetiti da sa porastom koncentracije laktoze dolazi do smanjenja prinosa proizvoda reakcije, te da je optimalna koncentracija laktoze 100 mM ukoliko reakcija traje kraće. Sa povećavanjem dužine trajanja reakcije, zbog pozitivnog koeficijenta interakcije, dolazi do pomeranja optimalne vrednosti početne koncentracije laktoze ka višim vrednostima, tako da maksimum izlazi iz ispitivanog okvira.

Uticaj vremena (X_5) takođe se može opisati kvadratnom funkcijom sa maksimumom, zbog postojanja negativne vrednosti kvadratnog regresionog koeficijenta. Ovaj maksimum jasno se može uočiti na slici 4.99, gde je takođe zbog postojanja interakcije između vremena i koncentracije laktoze primetno pomeranje lokalnih maksimuma. Naime, vidi se da pri nižim koncentracijama laktoze optimalno vreme iznosi oko 4h, dok se pri višim koncentracijama laktoze zahvaljujući pozitivnoj interakciji između ovih faktora maksimum pomera izvan ispitivanog opsega. Ovakvi rezultati su logični, imajući u vidu da je reakcija transgalaktozilacije kinetički kontrolisana i da nakon određenog vremena, kada se konvertuje određena količina supstrata dolazi do preovladavanja reakcije hidrolize. Iz modela se može uočiti postojanje još jedne interakcije, i to između molarnog odnosa supstrata i vremena. Ova interakcija opisana je pozitivnim regresionim koeficijentom, što slično prethodnom slučaju, znači da sa povećanjem molarnog odnosa supstrata dolazi do povećanja dužine trajanja reakcije u cilju postizanja maksimalnog prinosa proizvoda.

Sumiranjem ovih rezultata dolazi se do zaključka da su za postizanje visokih vrednosti prinosa galaktozida sorbitola optimalni sledeći uslovi: koncentracija enzima 0,76 mg/ml, koncentracija laktoze 500 mM, molarni odnos sorbitola prema laktozi 9, koncentracija NaCl 0,8 M i dužina trajanja reakcije 7h. Pošto eksperiment pod ovim optimalnim uslovima faktora nije izveden u okviru eksperimentalnog plana, urađen je dodatni eksperiment sa ciljem provere adekvatnosti modela. U ovom eksperimentu postignut je prinos galaktozida sorbitola od 68,41 g/l, što je u skladu sa predviđenom vrednošću prinosa proizvoda po modelu koja iznosi 66,18 g/l.

4.6.2.1.1.2. Uticaj reakcionih parametara na produktivnost sinteze galaktozida sorbitola

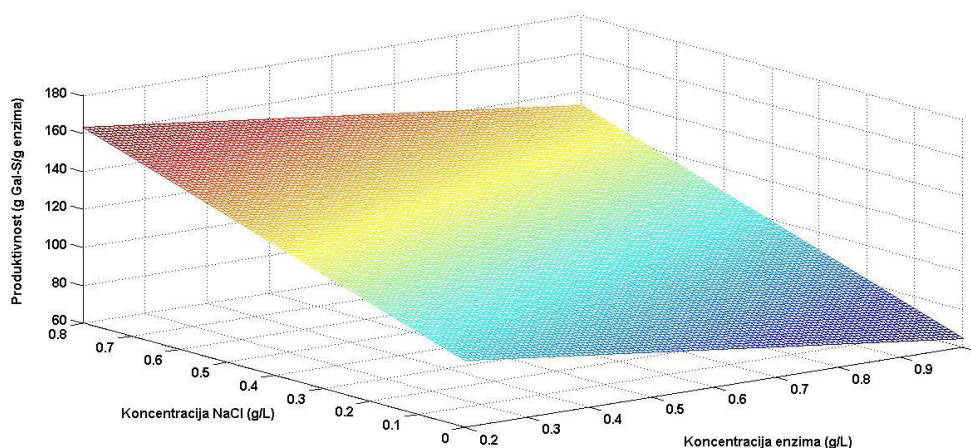
Najveća produktivnost proizvoda (96,89 g/g enzima) dobijena je u eksperimentu br. 13, pri koncentraciji enzima od 0,4 mg/ml, početnoj koncentraciji laktoze od 400 mM, molarnom odnosu sorbitola i laktoze 3, koncentraciji NaCl 0,6 M nakon 5 h. Sa druge strane, minimalan prinos (2,5 g/g enzima) postignut je u eksperimentu br. 6 pri koncentraciji enzima od 0,6 mg/ml, početnoj koncentraciji laktoze od 300 mM, molarnom odnosu sorbitola i laktoze 5, koncentraciji NaCl 0,4 M nakon 0,5 h.

Kao i kod prethodnog odziva, adekvatnost regresionog modela je procenjena primenom Fišerovg testa, pri čemu izračunata vrednost ovog parametra iznosi 3,12, pa se može zaključiti da je i ovaj model signifikantan. Signifikantnost parametara modela je ispitana Studentovim testom, a izračunate vrednosti su upoređene sa tabličnim vrednostima Studentovog testa, pri čemu je utvrđeno da su signifikantni sledeći koeficijenti regresije $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4, \beta_5, \beta_{23}, \beta_{25}, \beta_{35}, \beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{55}$, odnosno dobijen je regresioni model sledećeg oblika:

$$Y(g/g\ enz) = 45,05 - 7,68 \cdot X_1 + 7,73 \cdot X_2 - 1,25 \cdot X_3 + 1,60 \cdot X_4 + 12,337 \cdot X_5 - 5,47 \cdot X_2 \cdot X_3 + 12,17 \cdot X_2 \cdot X_5 - 7,66 \cdot X_3 \cdot X_4 + 6,07 \cdot X_3 \cdot X_5 - 4,37 \cdot X_5^2 \quad (2.29)$$

Kao što se iz jednačine može jasno uočiti, rezultati Studentovog testa pokazali su da su svi linearni regresioni koeficijenti signifikantni, dok je među kvadratnim regresionim koeficijentima signifikantan samo β_{55} . Kao i kod prethodnog odziva, kvadratni koeficijent ima negativnu vrednost, što upućuje na činjenicu da se njegov uticaj na produktivnost reakcije može opisati kvadratnom funkcijom sa maksimumom. Takođe, može se primetiti da su signifikantni i koeficijenti $\beta_{23}, \beta_{25}, \beta_{34}, \beta_{35}$, odnosno da postoje interakcije između koncentracije laktoze (X_2) i molarnog odnosa (X_3), koncentracije laktoze (X_2) i vremena (X_5), molarnog odnosa supstrata (X_3) i koncentracije NaCl (X_4), i molarnog odnosa supstrata (X_3) i vremena (X_5), redom. Uticaji parova faktora na prinos proizvoda predstavljeni su dijagramima odzivih površina.

Uticaj koncentracije enzima (X_1) na produktivnost sinteze galaktozida sorbitola može se predstaviti opadajućom funkcijom, zahvaljujući negativnom linearnom regresionom koeficijentu (β_1). Sa slike X se jasno vidi da u celom ispitivanom opsegu produktivnost opada sa porastom koncentracije enzima. Uticaj koncentracije laktoze (X_2), sa druge strane, znatno je kompleksniji. Naime, pored pozitivnog linearnog koeficijenta (β_2), iz modela se može uočiti postojanje interakcija sa drugim faktorima, i to negativne interakcije sa molarnim odnosom supstrata (β_{23}) i pozitivne interakcije sa vremenom trajanja reakcije (β_{25}), kao i u slučaju modela za prinos proizvoda.

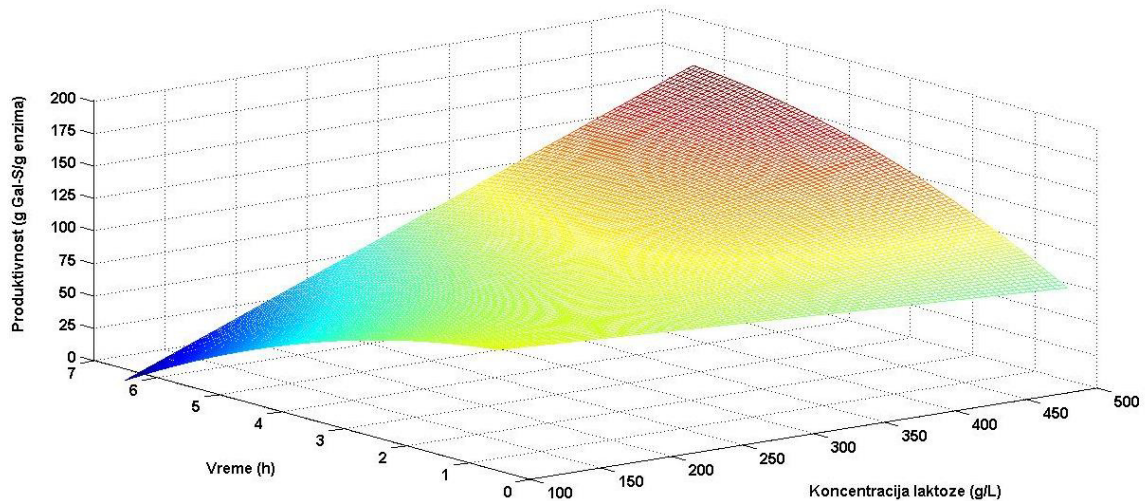


Slika 4.100. Uticaj koncentracije NaCl i koncentracije enzima na produktivnost sinteze galaktozida sorbitola prikazan kao odzivna površina. Ostali faktori su fiksirani na $X_2=2$, $X_3=2$ i $X_5=2$.

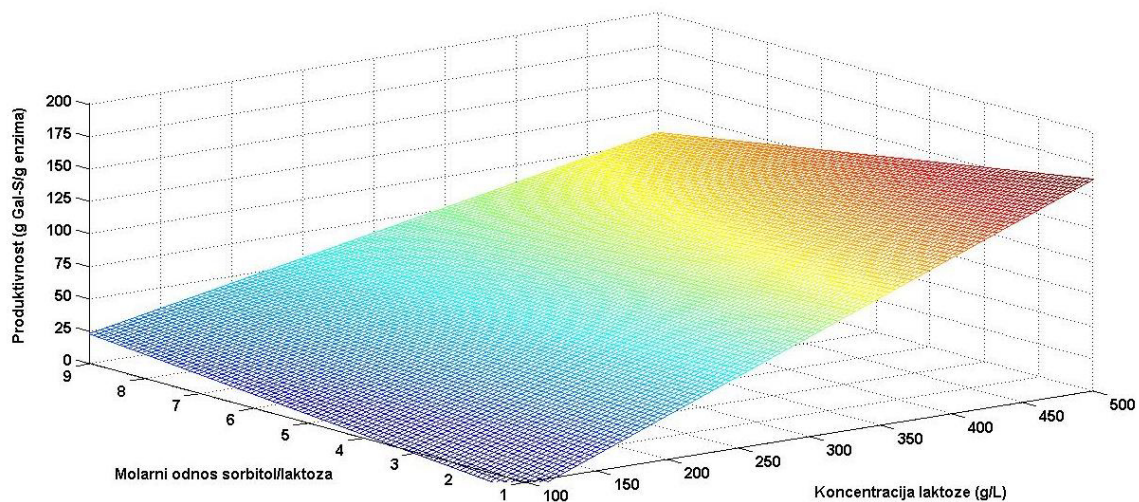
Sa slike 4.101 se vidi da je uticaj koncentracije laktoze izraženiji pri dužim vremenima reakcije, dok je pri kratkim vremenima uticaj laktoze na produktivnost procesa gotovo zanemarljiva. Ovo se može objasniti činjenicom da u kratkom vremenskom intervalu stigne da proreaguje jako niska koncentracija laktoze, pa dodavanje laktoze u višku ne dovodi do povećanja niskih produktivnosti reakcije sinteze proizvoda.

Slično kao u slučaju ispitivanja uticaja parametara na prinos proizvoda, između koncentracije laktoze i molarnog odnosa supstrata postoji negativna interakcija, međutim, u ovom slučaju ona je znatno izraženija. Naime, sa slike 4.101 može se

jasno uočiti da povećanje koncentracije laktoze u ispitivanom opsegu kontinualno raste, dok se uticaj molarnog odnosa ponaša dvojako.



Slika 4.101. Uticaj koncentracije laktoze i vremena na produktivnost sinteze galaktozida sorbitola prikazan kao odzivna površina. Ostali faktori su fiksirani na $X_1=-2$, $X_3=-2$ i $X_4=2$.



Slika 4.102. Uticaj koncentracije laktoze i molarnog odnosa supstrata na produktivnost sinteze galaktozida sorbitola prikazan kao odzivna površina. Ostali faktori su fiksirani na $X_2=2$, $X_3=2$ i $X_5=2$.

Pri niskim početnim koncentracijama laktoze, produktivnost reakcije raste sa povećanjem molarnog odnosa supstrata, dok se pri višim koncentracijama laktoze produktivnost smanjuje sa porastom molarnog odnosa. Budući da su postignute

više vrednosti produktivnosti pri višim koncentracijama laktoze (500 mM), optimalan molarni odnos sorbitola i laktoze sa aspekta produktivnosti procesa je 1. Sumiranjem ovih rezultata dolazi se do zaključka da su za postizanje visokih vrednosti prinosa galaktozida sorbitola optimalni sledeći uslovi: koncentracija enzima 0,8 mg/ml, koncentracija laktoze 500 mM, molarni odnos sorbitola prema laktozi 1, koncentracija NaCl 0,8 M i dužina trajanja reakcije 7h. Pošto eksperiment pod ovim optimalnim uslovima faktora nije izveden u okviru eksperimentalnog plana, urađen je dodatni eksperiment sa ciljem provere adekvatnosti modela.

U ovom eksperimentu postignuta produktivnost reakcije sinteze galaktozida sorbitola iznosila je 161,33 g/g enzima, što pokazuje dobro slaganje sa predviđenom vrednošću produktivnosti od 164,14 g/g enzima.

4.6.2.2. Sinteza galaktozida sorbitola pomoću β -galaktozidaze iz *L. acidophilus*

Nakon detaljne optimizacije sinteze galaktozida sorbitola pomoću komercijalnog enzima, određeni optimalni reakcioni uslovi sa aspekta prinosa proizvoda (koncentracija enzima oko 2 IU/ml, koncentracija laktoze 500 mM, molarni odnos sorbitola i laktoze 9, koncentracija NaCl 0,8 M i vreme trajanja reakcije 7h) primenjeni su za sintezu galaktozida sorbitola pomoću enzima izolovanog iz *L. acidophilus*. Postignuta je koncentracija od 43 g/l, što ukazuje na činjenicu da se ovaj enzim može koristiti i u sintezi novih galaktozida.

5. ZAKLJUČAK

Na osnovu prikazanih rezultata eksperimentalnog rada mogu se izvesti sledeći najvažniji zaključci.

- Ispitan je veliki broj mikroorganizama (bakterija, kvasaca i plesni) iz kolekcije kultura Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu u cilju izbora najefikasnijeg producenta β -galaktozidaze, nakon čega je za producenta odabrana probiotska vrsta *L. acidophilus*.

- Izvršena je detaljna optimizacija sastava hranljivih podloga i parametara procesa proizvodnje enzima u cilju poboljšanja produkcije enzima. Takođe, ispitano je nekoliko različitih postupaka izolovanja enzima, a najefikasnija metoda mehaničkog razaranja ćelija je optimizovana sa aspekta postizanja maksimalne aktivnosti, ali i specifične aktivnosti β -galaktozidaze. Dobijeni sirovi enzimski preparat se, zahvaljujući mikrobnom producentu bezbednom po ljudsko zdravlje, može koristiti bez potrebe za zametnim metodama prečišćavanja koje dodatno poskupljuju proces proizvodnje enzima.

- Izvršena je detaljna karakterizacija svojstava β -galaktozidaze iz *L. acidophilus* i ovaj enzim upoređen je sa komercijalnim preparatom β -galaktozidaze iz *A. oryzae*.

- Oba enzima primenjena su u reakciji transgalaktozilacije za sintezu galakto-oligosaharida, pri čemu je reakcija optimizovana sa ciljem postizanja maksimalnog stepena hidrolize laktoze i udela galakto-oligosaharida u finalnoj smeši. Kao ključni faktori za postizanje maksimalnog prinosa reakcije identifikovani su koncentracija enzima i koncentracija laktoze, a pošto su i galakto-oligosaharidi supstrati enzima podložni hidrolizi, reakcija je kinetički kontrolisana pa je optimizovano i vreme reakcije. Ustanovljeno je da oba enzima katalizuju sintezu tri- i tetraoligosaharidi, dok su pentaoligosaharidi prisutni samo u tragovima. Za razliku od komercijalnog enzima β -galaktozidaza iz *L. acidophilus* proizvela je i manju količinu disaharida.

- Primenom IMS spregnute sa masenom spektroskopijom razvijena je brza i efikasna jednostepena metoda pomoću koje je određena struktura dobijenih galaktooligosaharida. Ustanovljeno je da galakto-oligosaharidi dobijeni u reakcijama katalizovanim pomoću β -galaktozidaze iz *A. oryzae* sadrže $\beta(1\rightarrow6)$ i $\beta(1\rightarrow3)$ glikozidne veze čiji se udeo menja u toku reakcije, što ukazuje i na mogućnost menjanja fiziološke aktivnosti dobijenih proizvoda adekvatnom kontrolom kinetike procesa. S druge strane, galakto-oligosaharidi dobijeni pomoću β -galaktozidaze iz *L. acidophilus* sadrže $\beta(1\rightarrow6)$ i novoformirane $\beta(1\rightarrow4)$ veze, čime je pokazano da se izborom drugačijeg mikrobnog producenta enzima ne menja samo prinos galakto-oligosaharida već i njihova struktura, a time i fiziološko dejstvo.

- Imobilizacijom β -galaktozidaza na više nosača različitih karakteristika posredstvom različitih mehanizama vezivanja (adsorpcijom ili kovalentnom imobilizacijom), pokazano je da su za primenu u katalizovanju sinteze galakto-oligosaharida najpogodniji nosači sa primarnim amino grupama na koje se enzim adsorbuje elektrostatičkim interakcijama. Najbolji rezultati su postignuti sa komercijalnim nosačem Purolite® A-109 koji ima (poli)stiren-divinilbenzensku osnovu i primarne amino grupe. Značajno unapređenje procesa imobilizacije je postignuto hemijskom aktivacijom karboksilnih grupa na površini enzima koje nije dovelo do gubitka enzimske aktivnosti, a omogućilo je formiranje kovalentnih veza između nosača i enzima. Takođe, postignuto je značajno povećanje termičke i operativne stabilnosti. Ustanovljeno je i da imobilisani enzimi pokazuju veći afinitet prema reakciji transgalaktozilacije jer se, u poređenju sa reakcijom sa slobodnim enzimom jednake hidrolitičke aktivnosti, dobijaju viši prinosi galakto-oligosaharida.

- Imobilisani preparati β -galaktozidaza pored šaržnog, uspešno su implementirani i u bioreaktoru sa fluidizovanim slojem enzima i recirkulacijom supstrata pri čemu je pokazano da je moguće sprečiti uticaj unutrašnjeg i spoljašnjeg otpora prenosu mase na tok reakcije i inaktivaciju enzima usled delovanja smicajnih napona. Utvrđeno je da se u bioreaktoru sa fluidizovanim slojem reakcija odigrava podjednako brzinom kao u šaržnom, ali je stabilnost

enzima povećana pa se imobilisani enzim može koristiti u većem broju reakcionih ciklusa.

- Ispitana je mogućnost korišćenja alternativnih akceptora galaktozil ostataka (salicin i sorbitol) u reakciji transgalaktozilacije, pri čemu su dobijene nove i raznovrsnije smeše potencijalnih prebiotika, koji će zahvaljujući različitoj prirodi konstituenata imati i dodatna fiziološka dejstva. Slobodne i imobilisane β -galaktozidaze pokazale su visok afinitet prema sintezi novih proizvoda, a ustanovljeno je da je ključni faktor za postizanje visokih prinosa izbor adekvatnog molarnog odnosa supstrata (laktoze i sorbitola i salicina).

6. REFERENCE

1. Balasubramaniam, S.; Lee, H. C.; Lazan, H.; Othman, R.; Ali, Z. M., Purification and properties of a β -galactosidase from carambola fruit with significant activity towards cell wall polysaccharides. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 153-163.
2. Gerardi, C.; Blando, F.; Santino, A., Purification and chemical characterisation of a cell wall-associated β -galactosidase from mature sweet cherry (*Prunus avium L.*) fruit. *Plant Physiology and Biochemistry* **2012**, *61*, 123-130.
3. Panesar, P. S.; Panesar, R.; Singh, R. S.; Kennedy, J. F.; Kumar, H., Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **2006**, *81*, 530-543.
4. Kobayashi, T.; Shinnoh, N.; Goto, I.; Kuroiwa, Y., Hydrolysis of galactosylceramide is catalyzed by two genetically distinct acid β -galactosidases. *Journal of Biological Chemistry* **1985**, *260*, 14982-14987.
5. Al-Jazairi, M.; Abou-Ghorra, S.; Bakri, Y.; Mustafa, M., Optimization of β -galactosidase production by response surface methodology using locally isolated *Kluyveromyces marxianus*. *International Food Research Journal* **2015**, *22*, 1361-1367.
6. Terra, V. S.; Homer, K. A.; Rao, S. G.; Andrew, P. W.; Yesilkaya, H., Characterization of novel β -galactosidase activity that contributes to glycoprotein degradation and virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity* **2010**, *78*, 348-357.
7. Van Laere, K. M. J.; Abee, T.; Schols, H. A.; Beldman, G.; Voragen, A. G. J., Characterization of a novel β -galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 active towards transgalactooligosaccharides. *Applied and Environmental Microbiology* **2000**, *66*, 1379-1384.
8. Panesar, P. S.; Kumari, S.; Panesar, R., Potential applications of immobilized β -galactosidase in food processing industries. *Enzyme Research* **2010**, *2010*.
9. Lazan, H.; Ng, S. Y.; Goh, L. Y.; Ali, Z. M., Papaya β -galactosidase/galactanase isoforms in differential cell wall hydrolysis and fruit softening during ripening. *Plant Physiology and Biochemistry* **2004**, *42*, 847-853.

10. Shovon, M. S.; Sharma, S. C. D.; Roy, N., Purification, characterization and effect of physico-chemical agents on the stability of β -galactosidase from betel leaves. *Journal of Bio-Science* **2010**, *18*, 108-115.
11. Richmond, M. L.; Gray, J. I.; Stine, C. M., Beta-Galactosidase: Review of Recent Research Related to Technological Application, Nutritional Concerns, and Immobilization. *Journal of Dairy Science* *64*, 1759-1771.
12. Oliveira, C.; Guimarães, P. M. R.; Domingues, L., Recombinant microbial systems for improved β -galactosidase production and biotechnological applications. *Biotechnology Advances* **2011**, *29*, 600-609.
13. Ansari, S. A.; Satar, R., Recombinant β -galactosidases - Past, present and future: A mini review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2012**, *81*, 1-6.
14. Gosling, A.; Stevens, G. W.; Barber, A. R.; Kentish, S. E.; Gras, S. L., Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. *Food Chemistry* **2010**, *121*, 307-318.
15. Mlichová, Z.; Rosenberg, M., Current trends of β -galactosidase application in food technology. *Journal of Food and Nutrition Research* **2006**, *45*, 47-54.
16. Nakagawa, T.; Ikehata, R.; Myoda, T.; Miyaji, T.; Tomizuka, N., Overexpression and functional analysis of cold-active β -galactosidase from *Arthrobacter psychrolactophilus* strain F2. *Protein Expression and Purification* **2007**, *54*, 295-299.
17. Fujimoto, H.; Miyasato, M.; Ito, Y.; Sasaki, T.; Ajisaka, K., Purification and properties of recombinant β -galactosidase from *Bacillus circulans*. *Glycoconjugate Journal* **1998**, *15*, 155-160.
18. Yoon, K. H., Properties of β -galactosidase from *Bacillus licheniformis* isolated from Cheongkookjang. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology* **2012**, *40*, 17-22.
19. Kamel, Z.; Mohamed, N. M.; Farahat, M. G., Optimization of culture conditions for production of β -galactosidase by *Bacillus megaterium* NM56 isolated from raw milk. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* **2016**, *7*, 366-376.

20. Chen, W.; Chen, H.; Xia, Y.; Zhao, J.; Tian, F.; Zhang, H., Production, purification, and characterization of a potential thermostable galactosidase for milk lactose hydrolysis from *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Dairy Science* **2008**, *91*, 1751-1758.
21. Abd El-Kader, A. S. S.; El-Dosouky, M. A.; Abouwarda, A.; Abdel All, S. M.; Osman, M. I., Characterization of partially purified β -galactosidase from *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Sciences Research* **2012**, *8*, 2379-2385.
22. Iqbal, S.; Nguyen, T. H.; Nguyen, H. A.; Nguyen, T. T.; Maischberger, T.; Kittl, R.; Haltrich, D., Characterization of a heterodimeric GH2 β -galactosidase from *Lactobacillus sakei* Lb790 and formation of prebiotic galacto-oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59*, 3803-3811.
23. Iqbal, S.; Nguyen, T. H.; Nguyen, T. T.; Maischberger, T.; Haltrich, D., β -galactosidase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1: Biochemical characterization and formation of prebiotic galacto-oligosaccharides. *Carbohydrate Research* **2010**, *345*, 1408-1416.
24. Maischberger, T.; Leitner, E.; Nitisinprasert, S.; Juajun, O.; Yamabhai, M.; Nguyen, T. H.; Haltrich, D., β -Galactosidase from *Lactobacillus pentosus*: Purification, characterization and formation of galacto-oligosaccharides. *Biotechnology Journal* **2010**, *5*, 838-847.
25. Nguyen, T. T.; Nguyen, H. A.; Arreola, S. L.; Mlynek, G.; Djinović-Carugo, K.; Mathiesen, G.; Nguyen, T. H.; Haltrich, D., Homodimeric β -galactosidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081: Expression in *Lactobacillus plantarum* and biochemical characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60*, 1713-1721.
26. Liu, G. X.; Kong, J.; Lu, W. W.; Kong, W. T.; Tian, H.; Tian, X. Y.; Huo, G. C., β -Galactosidase with transgalactosylation activity from *Lactobacillus fermentum* K4. *Journal of Dairy Science* **2011**, *94*, 5811-5820.
27. Nguyen, T.-h.; Splechna, B.; Steinböck, M.; Kneifel, W.; Lettner, H. P.; Kulbe, K. D.; Haltrich, D., Purification and Characterization of Two Novel β -Galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 4989-4998.

28. Pan, Q.; Zhu, J.; Liu, L.; Cong, Y.; Hu, F.; Li, J.; Yu, X., Functional Identification of a Putative β -Galactosidase Gene in the Special lac Gene Cluster of *Lactobacillus acidophilus*. *Current Microbiology* **2009**, *60*, 172-178.
29. Nguyen, T. H.; Splechna, B.; Krasteva, S.; Kneifel, W.; Kulbe, K. D.; Divne, C.; Haltrich, D., Characterization and molecular cloning of a heterodimeric β -galactosidase from the probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* R22. *FEMS Microbiology Letters* **2007**, *269*, 136-144.
30. Itoh, K.; Toba, T.; Itoh, T.; Adachi, S., Properties of β -galactosidase of *Lactobacillus kefiranofaciens* K-1 isolated from kefir grains. *Letters in Applied Microbiology* **1992**, *15*, 232-234.
31. Kim, J. W.; Rajagopal, S. N., Isolation and characterization of β -galactosidase from *Lactobacillus crispatus*. *Folia Microbiologica* **2000**, *45*, 29-34.
32. de Macías, M. E.; Manca de Nadra, M. C.; Strasser de Saad, A. M.; Pesce de Ruiz Holgado, A. A.; Oliver, G., Isolation and properties of beta-galactosidase of a strain of *Lactobacillus helveticus* isolated from natural whey starter. *Journal of Applied Biochemistry* **1983**, *5*, 275-281.
33. Bae, H. C.; Renchinkhand, G.; Nam, M. S., Properties of β -galactosidase from *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* Nam27. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* **2007**, *27*, 110-116.
34. Hung, M.-N.; Lee, B., Purification and characterization of a recombinant β -galactosidase with transgalactosylation activity from *Bifidobacterium infantis* HL96. *Applied Microbiology and Biotechnology* **58**, 439-445.
35. Hinz, S. W. A.; Van Den Broek, L. A. M.; Beldman, G.; Vincken, J. P.; Voragen, A. G. J., β -Galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis* DSM20083 prefers $\beta(1,4)$ -galactosides over lactose. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2004**, *66*, 276-284.
36. Tanaka, Y.; Kagamiishi, A.; Kiuchi, A.; Horiuchi, T., Purification and properties of β galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Biochemistry* **1975**, *77*, 241-247.
37. Lu, L.-l.; Xiao, M.; Li, Z.-y.; Li, Y.-m.; Wang, F.-s., A novel transglycosylating β -galactosidase from *Enterobacter cloacae* B5. *Process Biochemistry* **2009**, *44*, 232-236.

38. Ghatak, A.; Guha, A. K.; Ray, L., β -D-galactosidase from *Enterobacter cloacae*: Production and some physicochemical properties. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2010**, *162*, 1678-1688.
39. Jacobson, R. H.; Zhang, X. J.; DuBose, R. F.; Matthews, B. W., Three-dimensional structure of β -galactosidase from *E. coli*. *Nature* **1994**, *369*, 761-766.
40. Pisani, F. M.; Rella, R.; Raia, C. A.; Rozzo, C.; Nucci, R.; Gambacorta, A.; De Rosa, M.; Rossi, M., Thermostable β -galactosidase from the archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. Purification and properties. *European Journal of Biochemistry* **1990**, *187*, 321-328.
41. Kim, C. S.; Ji, E. S.; Oh, D. K., Expression and characterization of *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters* **2003**, *25*, 1769-1774.
42. O'Connell, S.; Walsh, G., Application relevant studies of fungal β -galactosidases with potential application in the alleviation of lactose intolerance. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2008**, *149*, 129-138.
43. Roy, I.; Gupta, M. N., Lactose hydrolysis by Lactozym[™] immobilized on cellulose beads in batch and fluidized bed modes. *Process Biochemistry* **2003**, *39*, 325-332.
44. Ohtsuka, K.; Tanoh, A.; Ozawa, O.; Kanematsu, T.; Uchida, T.; Shinke, R., Purification and properties of a β -galactosidase with high galactosyl transfer activity from *Cryptococcus laurentii* OKN-4. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **1990**, *70*, 301-307.
45. Cho, Y. J.; Shin, H. J.; Bucke, C., Purification and biochemical properties of a galactooligosaccharide producing β -galactosidase from *Bullera singularis*. *Biotechnology Letters* **2003**, *25*, 2107-2111.
46. Van Casteren, W. H. M.; Eimermann, M.; Van Den Broek, L. A. M.; Vincken, J. P.; Schols, H. A.; Voragen, A. G. J., Purification and characterisation of a β -galactosidase from *Aspergillus aculeatus* with activity towards (modified) exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B39 and B891. *Carbohydrate Research* **2000**, *329*, 75-85.

47. Gonzalez, R. R.; Monsan, P., Purification and some characteristics of β -galactosidase from *Aspergillus fonsecaeus*. *Enzyme and Microbial Technology* **1991**, *13*, 349-352.
48. Todorova-Balvay, D.; Stoilova, I.; Gargova, S.; Vijayalakshmi, M. A., An efficient two step purification and molecular characterization of β -galactosidases from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Molecular Recognition* **2006**, *19*, 299-304.
49. Widmer, F.; Leuba, J. L., β -Galactosidase from *Aspergillus niger*. Separation and characterization of three multiple forms. *European Journal of Biochemistry* **1979**, *100*, 559-567.
50. Nagy, Z.; Kiss, T.; Szentirmai, A.; Biró, S., β -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: Production, Purification, and Characterization of the Enzyme. *Protein Expression and Purification* **2001**, *21*, 24-29.
51. Pilipenko, O. S.; Atyaksheva, L. F.; Poltorak, O. M.; Chukhrai, E. S., The catalytic properties and stability of β -galactosidases from fungi. *Russian Journal of Physical Chemistry A, Focus on Chemistry* **2008**, *82*, 2250-2254.
52. Fischer, L.; Scheckermann, C.; Wagner, F., Purification and characterization of a thermotolerant β -galactosidase from *Thermomyces lanuginosus*. *Applied and Environmental Microbiology* **1995**, *61*, 1497-1501.
53. Chiba, S.; Yamada, M.; Isobe, K., Novel acidophilic β -galactosidase with high activity at extremely acidic pH region from *Teratosphaeria acidotherma* AIU BGA-1. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2015**, *120*, 263-267.
54. Sheik Asraf, S., Gunasekaran, P., Current trends of β -galactosidase research and application In *Current Research, Technology and Education, Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, Méndez-Vilas, A., Ed. Formatex: Spain, 2010; pp 880-890.
55. Knežević-Jugović, Z., *Enzimsko inženjerstvo*. Tehnološko-metalurški fakultet: Beograd, Srbija, 2008.
56. Maksimainen, M. M.; Lampio, A.; Mertanen, M.; Turunen, O.; Rouvinen, J., The crystal structure of acidic β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *International Journal of Biological Macromolecules* **2013**, *60*, 109-115.
57. Pereira-Rodríguez, Á.; Fernández-Leiro, R.; González-Siso, M. I.; Cerdán, M. E.; Becerra, M.; Sanz-Aparicio, J., Structural basis of specificity in tetrameric

Kluyveromyces lactis β -galactosidase. *Journal of Structural Biology* **2012**, *177*, 392-401.

58. Maksimainen, M.; Paavilainen, S.; Hakulinen, N.; Rouvinen, J., Structural analysis, enzymatic characterization, and catalytic mechanisms of β -galactosidase from *Bacillus circulans* sp. *alkalophilus*. *FEBS Journal* **2012**, *279*, 1788-1798.

59. Zhou, Q. Z. K.; Chen, X. D., Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochemical Engineering Journal* **2001**, *9*, 33-40.

60. Prenosil, J. E.; Stuker, E.; Bourne, J. R., FORMATION OF OLIGOSACCHARIDES DURING ENZYMATIC LACTOSE HYDROLYSIS: PART I: STATE OF ART. *Biotechnology and Bioengineering* **1987**, *30*, 1019-1025.

61. Rico-Diaz, A.; Vizoso Vazquez, A.; Cerdan, M. E.; Becerra, M.; Sanz-Aparicio, J., Crystallization and preliminary X-ray diffraction data of β -galactosidase from *Aspergillus niger*. *Acta Crystallographica Section F* **2014**, *70*, 1529-1531.

62. Rojas, A. L.; Nagem, R. A. P.; Neustroev, K. N.; Arand, M.; Adamska, M.; Eneyskaya, E. V.; Kulminskaya, A. A.; Garratt, R. C.; Golubev, A. M.; Polikarpov, I., Crystal Structures of β -Galactosidase from *Penicillium* sp. and its Complex with Galactose. *Journal of Molecular Biology* **2004**, *343*, 1281-1292.

63. Gloster, T. M.; Roberts, S.; Ducros, V. M. A.; Perugino, G.; Rossi, M.; Hoos, R.; Moracci, M.; Vasella, A.; Davies, G. J., Structural studies of the β -glycosidase from *Sulfolobus solfataricus* in complex with covalently and noncovalently bound inhibitors. *Biochemistry* **2004**, *43*, 6101-6109.

64. Brás, N. F.; Moura-Tamames, S. A.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. J., Mechanistic studies on the formation of glycosidase-substrate and glycosidase-inhibitor covalent intermediates. *Journal of Computational Chemistry* **2008**, *29*, 2565-2574.

65. Juers, D. H.; Heightman, T. D.; Vasella, A.; McCarter, J. D.; Mackenzie, L.; Withers, S. G.; Matthews, B. W., A structural view of the action of *Escherichia coli* (*lacZ*) β -galactosidase. *Biochemistry* **2001**, *40*, 14781-14794.

66. Nath, A.; Verasztó, B.; Basak, S.; Koris, A.; Kovács, Z.; Vatai, G., Synthesis of Lactose-Derived Nutraceuticals from Dairy Waste Whey—a Review. *Food and Bioprocess Technology* **2015**, *9*, 16-48.

67. Hansson, T.; Kaper, T.; Van Oost, J. D.; De Vos, W. M.; Adlercreutz, P., Improved oligosaccharide synthesis by protein engineering of β -glucosidase CelB from hyperthermophilic *Pyrococcus furiosus*. *Biotechnology and Bioengineering* **2001**, *73*, 203-210.
68. Jørgensen, F.; Hansen, O. C.; Stougaard, P., High-efficiency synthesis of oligosaccharides with a truncated β -galactosidase from *Bifidobacterium bifidum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2001**, *57*, 647-652.
69. Jørgensen, F.; Hansen, O. C.; Stougaard, P., Beta-galactosidase isolated from bifidobacterium. *-galactosidase isolated from bifidobacterium* **2007**.
70. Henrissat, B., A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal* **1991**, *280*, 309-316.
71. Kang, S. K.; Cho, K. K.; Ahn, J. K.; Bok, J. D.; Kang, S. H.; Woo, J. H.; Lee, H. G.; You, S. K.; Choi, Y. J., Three forms of thermostable lactose-hydrolase from *Thermus sp.* IB-21: Cloning, expression, and enzyme characterization. *Journal of Biotechnology* **2005**, *117*, 337-346.
72. Van Den Broek, L. A. M.; Hinz, S. W. A.; Beldman, G.; Vincken, J. P.; Voragen, A. G. J., *Bifidobacterium* carbohydrases-their role in breakdown and synthesis of (potential) prebiotics. *Molecular Nutrition and Food Research* **2008**, *52*, 146-163.
73. Van Den Broek, L. A. M.; Voragen, A. G. J., *Bifidobacterium* glycoside hydrolases and (potential) prebiotics. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **2008**, *9*, 401-407.
74. Gänzle, M. G., Enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides and other lactose derivatives (hetero-oligosaccharides) from lactose. *International Dairy Journal* **2012**, *22*, 116-122.
75. Neri, D. F. M.; Balcão, V. M.; Costa, R. S.; Rocha, I. C. A. P.; Ferreira, E. M. F. C.; Torres, D. P. M.; Rodrigues, L. R. M.; Carvalho Jr, L. B.; Teixeira, J. A., Galacto-oligosaccharides production during lactose hydrolysis by free *Aspergillus oryzae* β -galactosidase and immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol. *Food Chemistry* **2009**, *115*, 92-99.

76. Vera, C.; Guerrero, C.; Conejeros, R.; Illanes, A., Synthesis of galactooligosaccharides by β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* using partially dissolved and supersaturated solution of lactose. *Enzyme and Microbial Technology* **2012**, *50*, 188-194.
77. Vera, C.; Guerrero, C.; Illanes, A., Determination of the transgalactosylation activity of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase: effect of pH, temperature, and galactose and glucose concentrations. *Carbohydrate Research* **2011**, *346*, 745-752.
78. Altermann, E.; Russell, W. M.; Azcarate-Peril, M. A.; Barrangou, R.; Buck, B. L.; McAuliffe, O.; Souther, N.; Dobson, A.; Duong, T.; Callanan, M.; Lick, S.; Hamrick, A.; Cano, R.; Klaenhammer, T. R., Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 3906-3912.
79. Nguyen, T.-H.; Splechna, B.; Krasteva, S.; Kneifel, W.; Kulbe, K. D.; Divne, C.; Haltrich, D., Characterization and molecular cloning of a heterodimeric β -galactosidase from the probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* R22. *FEMS microbiology letters* **2007**, *269*, 136-144.
80. Fortina, M. G.; Ricci, G.; Mora, D.; Guglielmetti, S.; Manachini, P. L., Unusual organization for lactose and galactose gene clusters in *Lactobacillus helveticus*. *Applied and Environmental Microbiology* **2003**, *69*, 3238-3243.
81. Gänzle, M. G.; Haase, G.; Jelen, P., Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. *International Dairy Journal* **2008**, *18*, 685-694.
82. Machado, J. J. B.; Coutinho, J. A.; Macedo, E. A., Solid-liquid equilibrium of α -lactose in ethanol/water. *Fluid Phase Equilibria* **2000**, *173*, 121-134.
83. Perotti, M. C.; Verónica, W. I.; Inés, V. C.; Viviana, B. C., Dairy products modified in their lactose content. *Current Nutrition and Food Science* **2012**, *8*, 8-18.
84. Husain, Q., β -Galactosidases and their potential applications: A review. *Critical Reviews in Biotechnology* **2010**, *30*, 41-62.
85. Das-Bradoo, S.; Svensson, I.; Santos, J.; Plieva, F.; Mattiasson, B.; Hatti-Kaul, R., Synthesis of alkylgalactosides using whole cells of *Bacillus pseudofirmus* species as catalysts. *Journal of Biotechnology* **2004**, *110*, 273-285.
86. Illanés, A., Whey upgrading by enzyme biocatalysis. *Electronic Journal of Biotechnology* **2011**, *14*.

87. Wail, A.; Alsaed, A. K.; Hadadin, M., Utilization of labneh whey lactose hydrolyzed syrup in baking and confectionery. *Pakistan Journal of Nutrition* **2012**, *11*, 688-695.
88. Wang, Y.; Luo, X. G.; Li, X. M.; Zhang, T. C., Production of D-tagatose with recombinant *Escherichia coli* strain secreting β -galactosidase and L-arabinose isomerase from *E.coli* K-12. *Journal of Pure and Applied Microbiology* **2013**, *7*, 1497-1504.
89. Zhan, Y.; Xu, Z.; Li, S.; Liu, X.; Xu, L.; Feng, X.; Xu, H., Coexpression of β -d-galactosidase and l-arabinose isomerase in the production of d-tagatose: A functional sweetener. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, *62*, 2412-2417.
90. Rogosa, M.; Browne, H. H.; Whittier, E. O., Ethyl Alcohol from Whey. *Journal of Dairy Science* **1947**, *30*, 263-269.
91. Guimarães, P. M. R.; Teixeira, J. A.; Domingues, L., Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances* **2010**, *28*, 375-384.
92. Prazeres, A. R.; Carvalho, F.; Rivas, J., Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management* **2012**, *110*, 48-68.
93. Tomaszewska, M.; Białończyk, L., Production of ethanol from lactose in a bioreactor integrated with membrane distillation. *Desalination* **2013**, *323*, 114-119.
94. Pisano, I.; Agrimia, G.; Grosso, G.; Mena, M. C.; Ricci, M. A.; Palmieri, L., Improved *Saccharomyces Cerevisiae* growth on cheese whey by controlling enzymatic lactose hydrolysis. In *Chemical Engineering Transactions*, 2015; Vol. 43, pp 637-642.
95. Staniszewski, M.; Kujawski, W.; Lewandowska, M., Ethanol production from whey in bioreactor with co-immobilized enzyme and yeast cells followed by pervaporative recovery of product - Kinetic model predictions. *Journal of Food Engineering* **2007**, *82*, 618-625.

96. Hahn-Hagerdal, B., Comparison between immobilized *Kluyveromyces fragilis* and *Saccharomyces cerevisiae* coimmobilized with β -galactosidase, with respect to continuous ethanol production from concentrated whey permeate. *Biotechnology and Bioengineering* **1985**, *27*, 914-916.
97. Compagno, C.; Porro, D.; Smeraldi, C.; Ranzi, B. M., Fermentation of whey and starch by transformed *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* **1995**, *43*, 822-825.
98. Domingues, L.; Onnela, M. L.; Teixeira, J. A.; Lima, N.; Penttilä, M., Construction of a flocculent brewer's yeast strain secreting *Aspergillus niger* β -galactosidase. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2000**, *54*, 97-103.
99. Guimarães, P. M. R.; Teixeira, J. A.; Domingues, L., Fermentation of high concentrations of lactose to ethanol by engineered flocculent *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters* **2008**, *30*, 1953-1958.
100. Zou, J.; Guo, X.; Shen, T.; Dong, J.; Zhang, C.; Xiao, D., Construction of lactose-consuming *Saccharomyces cerevisiae* for lactose fermentation into ethanol fuel. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2013**, *40*, 353-363.
101. Pescuma, M.; de Valdez, G. F.; Mozzi, F., Whey-derived valuable products obtained by microbial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2015**, *99*, 6183-6196.
102. Nguyen, B. H.; Nguyen, B. T.; Van Vu, H.; Van Nguyen, C.; Nguyen, D. T.; Nguyen, L. T.; Vu, T. T.; Tran, L. D., Development of label-free electrochemical lactose biosensor based on graphene/poly(1,5-diaminonaphthalene) film. *Current Applied Physics* **2016**, *16*, 135-140.
103. Tkáč, J.; Šturdík, E.; Gemeiner, P., Novel glucose non-interference biosensor for lactose detection based on galactose oxidase-peroxidase with and without co-immobilised β -galactosidase. *Analyst* **2000**, *125*, 1285-1289.
104. Liu, H.; Ying, T.; Sun, K.; Li, H.; Qi, D., Reagentless amperometric biosensors highly sensitive to hydrogen peroxide, glucose and lactose based on N-methyl phenazine methosulfate incorporated in a Nafion film as an electron transfer mediator between horseradish peroxidase and an electrode. *Analytica Chimica Acta* **1997**, *344*, 187-199.

105. Conzuelo, F.; Gamella, M.; Campuzano, S.; Ruiz, M. A.; Reviejo, A. J.; Pingarrón, J. M., An Integrated Amperometric Biosensor for the Determination of Lactose in Milk and Dairy Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 7141-7148.
106. Campos, P. P.; Moraes, M. L.; Volpati, D.; Miranda, P. B.; Oliveira, O. N.; Ferreira, M., Amperometric Detection of Lactose Using β -Galactosidase Immobilized in Layer-by-Layer Films. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2014**, *6*, 11657-11664.
107. Benjamins, E.; Boxem, L.; KleinJan-Noeverman, J.; Broekhuis, T. A., Assessment of repetitive batch-wise synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose slurry using immobilised β -galactosidase from *Bacillus circulans*. *International Dairy Journal* **2014**, *38*, 160-168.
108. Iqbal, S.; Nguyen, T. H.; Nguyen, H. A.; Nguyen, T. T.; Maischberger, T.; Kittl, R.; Haltrich, D., Characterization of a heterodimeric GH2 β -galactosidase from *Lactobacillus sakei* Lb790 and formation of prebiotic galacto-oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59*, 3803-3811.
109. Iqbal, S.; Nguyen, T.-H.; Nguyen, T. T.; Maischberger, T.; Haltrich, D., β -Galactosidase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1: biochemical characterization and formation of prebiotic galacto-oligosaccharides. *Carbohydrate Research* **2010**, *345*, 1408-1416.
110. Maischberger, T.; Leitner, E.; Nitisinprasert, S.; Juajun, O.; Yamabhai, M.; Nguyen, T.-H.; Haltrich, D., β -Galactosidase from *Lactobacillus pentosus*: Purification, characterization and formation of galacto-oligosaccharides. *Biotechnology Journal* **2010**, *5*, 838-847.
111. Lu, L.; Gu, G.; Xiao, M.; Wang, F., Separation and structure analysis of trisaccharide isomers produced from lactose by *Lactobacillus bulgaricus* L3 β -galactosidase. *Food Chemistry* **2010**, *121*, 1283-1288.
112. Splechna, B.; Nguyen, T.-h.; Steinböck, M.; Kulbe, K. D.; Lorenz, W.; Haltrich, D., Production of Prebiotic Galacto-Oligosaccharides from Lactose Using β -Galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 4999-5006.

113. Han, Y. R.; Youn, S. Y.; Ji, G. E.; Park, M. S., Production of α - and β -galactosidases from *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* RD47. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **2014**, *24*, 675-682.
114. Goulas, T.; Goulas, A.; Tzortzis, G.; Gibson, G. R., Comparative analysis of four β -galactosidases from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB41171: Purification and biochemical characterisation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2009**, *82*, 1079-1088.
115. Park, A. R.; Kim, H. J.; Lee, J. K.; Oh, D. K., Hydrolysis and transglycosylation activity of a thermostable recombinant β -glycosidase from *Sulfolobus acidocaldarius*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2010**, *160*, 2236-2247.
116. Ghatak, A.; Guha, A. K.; Ray, L., Immobilization of β -galactosidase from *Enterobacter cloacae*: Characterization and its use in the continuous production of low lactose milk. *Indian Journal of Biotechnology* **2013**, *12*, 523-530.
117. Vieira, D. C.; Lima, L. N.; Mendes, A. A.; Adriano, W. S.; Giordano, R. C.; Giordano, R. L. C.; Tardioli, P. W., Hydrolysis of lactose in whole milk catalyzed by β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* immobilized on chitosan-based matrix. *Biochemical Engineering Journal* **2013**, *81*, 54-64.
118. Bernal, C.; Urrutia, P.; Illanes, A.; Wilson, L., Hierarchical meso-macroporous silica grafted with glyoxyl groups: opportunities for covalent immobilization of enzymes. *New Biotechnology* **2013**, *30*, 500-506.
119. Cardelle-Cobas, A.; Villamiel, M.; Olano, A.; Corzo, N., Study of galacto-oligosaccharide formation from lactose using Pectinex Ultra SP-L. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2008**, *88*, 954-961.
120. Rico-Díaz, A.; Vizoso Vázquez, A.; Cerdán, M. E.; Becerra, M.; Sanz-Aparicio, J., Crystallization and preliminary X-ray diffraction data of β -galactosidase from *Aspergillus niger*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications* **2014**, *70*, 1529-1531.
121. Nizamuddin, S.; Sridevi, A.; Narasimha, G., Production of β -galactosidase by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. *African Journal of Biotechnology* **2008**, *7*, 1096-1100.

122. Budriene, S.; Gorochovceva, N.; Romaskevici, T.; Yugova, L. V.; Miezeliene, A.; Dienys, G.; Zubriene, A., β -Galactosidase from *Penicillium canescens*. Properties and immobilization. *Central European Journal of Chemistry* **2005**, *3*, 95-105.
123. El-Gindy, A.; Ibrahim, Z.; Aziz, H., Improvement of extracellular β -galactosidase production by thermophilic fungi *Chaetomium thermophile* and *Thermomyces lanuginosus*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* **2009**, *3*, 1925-1932.
124. Gomez, A.; Castillo, F. J., Production of biomass and β -D-galactosidase by *Candida pseudotropicalis* grown in continuous culture on whey. *Biotechnology and Bioengineering* **1983**, *25*, 1341-1352.
125. Hsu, C. A.; Yu, R. C.; Chou, C. C., Production of β -galactosidase by *Bifidobacteria* as influenced by various culture conditions. *International Journal of Food Microbiology* **2005**, *104*, 197-206.
126. Tari, C.; Ustok, F. I.; Harsa, S., Optimization of the associative growth of novel yoghurt cultures in the production of biomass, β -galactosidase and lactic acid using response surface methodology. *International Dairy Journal* **2009**, *19*, 236-243.
127. Dagbagli, S.; Goksungur, Y., Optimization of β -galactosidase production using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 by response surface methodology. *Electronic Journal of Biotechnology* **2008**, *11*.
128. Li, M.; Zhu, H.; Qin, H.; Zhang, Y.; Yang, H., Optimization of a Whey Containing Medium for β -Galactosidase Production by *Lactobacillus reuteri*. In *Advances in Applied Biotechnology: Proceedings of the 2nd International Conference on Applied Biotechnology (ICAB 2014)-Volume II*, Zhang, T.-C.; Nakajima, M., Eds. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2015; 10.1007/978-3-662-46318-5_62pp 599-608.
129. Citti, J. E.; Sandine, W. E.; Elliker, P. R., Beta-Galactosidase of *Streptococcus lactis*. *Journal of bacteriology* **1965**, *89*, 937-942.
130. Laxmi, N. P.; Mutamed, M. A.; Nagendra, P. S., Effect of carbon and nitrogen sources on growth of *Bifidobacterium animalis* Bb12 and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC 11842 and production of β -Galactosidase under different culture conditions. *International Food Research Journal* **2011**, *18*, 373-380.

131. Nath, A.; Mondal, S.; Chakraborty, S.; Bhattacharjee, C.; Chowdhury, R., Production, purification, characterization, immobilization, and application of β -galactosidase: A review. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering* **2014**, *9*, 330-348.
132. Inchaurreondo, V. A.; Flores, M. V.; Voget, C. E., Growth and β -galactosidase synthesis in aerobic chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **1998**, *20*, 291-298.
133. Murad, H. A.; Refaea, R. I.; Aly, E. M., Utilization of UF-permeate for production of β -galactosidase by lactic acid bacteria. *Polish Journal of Microbiology* **2011**, *60*, 139-144.
134. Ismai, S. A. A.; El-Mohamady, Y.; Helmy, W. A.; Abou-Romia, R.; Hashem, A. M., Cultural condition affecting the growth and production of a β -galactosidase by *Lactobacillus acidophilus* NRRL 4495. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* **2010**, *4*, 5051-5058.
135. Jokar, A.; Karbassi, A., Determination of proper conditions for the production of crude beta-galactosidase using *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Journal of Agricultural Science and Technology* **2009**, *11*, 301-308.
136. Kumari, S.; Panesar, P. S.; Panesar, R., Production of β -galactosidase using novel yeast isolate from whey. *International Journal of Dairy Science* **2011**, *6*, 150-157.
137. Rech, R.; Ayub, M. A. Z., Simplified feeding strategies for fed-batch cultivation of *Kluyveromyces marxianus* in cheese whey. *Process Biochemistry* **2007**, *42*, 873-877.
138. Pinheiro, R.; Belo, I.; Mota, M., Growth and β -galactosidase activity in cultures of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure. *Letters in Applied Microbiology* **2003**, *37*, 438-442.
139. Braga, A. R. C.; Gomes, P. A.; Kalil, S. J., Formulation of Culture Medium with Agroindustrial Waste for β -Galactosidase Production from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045. *Food and Bioprocess Technology* **2012**, *5*, 1653-1663.
140. Dağbağlı, S.; Göksungur, Y., Optimization of β -Galactosidase production in stirred tank bioreactor using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279. *Food Science and Biotechnology* **2009**, *18*, 1342-1350.

141. Antov, M., *Bioseparaciono inženjerstvo*. Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu: Novi Sad, 2010.
142. Geciova, J.; Bury, D.; Jelen, P., Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry - A review. *International Dairy Journal* **2002**, *12*, 541-553.
143. Brown, L.; Wolf, J. M.; Prados-Rosales, R.; Casadevall, A., Through the wall: Extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews Microbiology* **2015**, *13*, 620-630.
144. Bury, D.; Jelen, P.; Kaláb, M., Disruption of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842 cells for lactose hydrolysis in dairy products: a comparison of sonication, high-pressure homogenization and bead milling. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2001**, *2*, 23-29.
145. Choonia, H. S.; Saptarshi, S. D.; Lele, S. S., Release of intracellular β -galactosidase from *Lactobacillus acidophilus* and l-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* by high-pressure homogenization. *Chemical Engineering Communications* **2013**, *200*, 1415-1424.
146. Garrido, F.; Banerjee, U. C.; Chisti, Y.; Moo-Young, M., Disruption of a recombinant yeast for the release of beta-galactosidase. *Bioseparation* **1994**, *4*, 319-328.
147. Numanoglu, Y.; Sungur, S., β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose-gelatin carrier system. *Process Biochemistry* **2004**, *39*, 705-711.
148. Braga, A. R. C.; Manera, A. P.; Ores, J. C.; Sala, L.; Maugeri, F.; Kalil, S. J., Kinetics and thermal properties of crude and purified β -galactosidase with potential for the production of galactooligosaccharides. *Food Technology and Biotechnology* **2013**, *51*, 45-52.
149. Farkade, V. D.; Harrison, S. T. L.; Pandit, A. B., Improved cavitation cell disruption following pH pretreatment for the extraction of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochemical Engineering Journal* **2006**, *31*, 25-30.
150. Choonia, H. S.; Lele, S. S., β -Galactosidase release kinetics during ultrasonic disruption of *Lactobacillus acidophilus* isolated from fermented *Eleusine coracana*. *Food and Bioproducts Processing* **2011**, *89*, 288-293.

151. Hsu, C. A.; Yu, R. C.; Chou, C. C., Purification and characterization of a sodium-stimulated β -galactosidase from *Bifidobacterium longum* CCRC 15708. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2006**, *22*, 355-361.
152. Akolkar, S. K.; Sajgure, A. D.; Lele, S. S., β -galactosidase from *Lactobacillus acidophilus* isolated from fermented ragi (*Eleusine coracana*). *Indian Journal of Biotechnology* **2006**, *5*, 184-188.
153. Montanari, G.; Zambonelli, C.; Grazia, L.; Benevelli, M.; Chiavari, C., Release of β -galactosidase from *Lactobacilli*. *Food Technology and Biotechnology* **2000**, *38*, 129-133.
154. Pinho, J. M. R.; Passos, F. M. L., Solvent extraction of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* yields a stable and highly active enzyme preparation. *Journal of Food Biochemistry* **2011**, *35*, 323-336.
155. Banerjee, G.; Ray, A.; Das, S. K.; Kumar, R.; Ray, A. K., Chemical extraction and optimization of intracellular β -galactosidase production from the bacterium *Arthrobacter oxydans* using Box-Behnken design of response surface methodology. *Acta Alimentaria* **2016**, *45*, 93-103.
156. Bansal, S.; Oberoi, H. S.; Dhillon, G. S.; Patil, R. T., Production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* MTCC 1388 using whey and effect of four different methods of enzyme extraction on β -galactosidase activity. *Indian Journal of Microbiology* **2008**, *48*, 337-341.
157. Mahoney, R. R.; Nickerson, T. A.; Whitaker, J. R., Selection of strain, growth conditions, and extraction procedures for optimum production of lactase from *Kluyveromyces fragilis*. *Journal of dairy science* **1975**, *58*, 1620-1629.
158. Becerra, M.; Rodríguez-Belmonte, E.; Cerdán, M. E.; González Siso, M. I., Extraction of Intracellular Proteins from *Kluyveromyces lactis*. *Food Technology and Biotechnology* **2001**, *39*, 135-139.
159. Gobinath, D.; Prapulla, S. G., Transgalactosylating β -galactosidase from probiotic *Lactobacillus plantarum* MCC2156: production and permeabilization for use as whole cell biocatalyst. *Journal of Food Science and Technology* **2014**, *52*, 6003-6009.

160. Srivastava, A.; Mishra, S.; Chand, S., Transgalactosylation of lactose for synthesis of galacto-oligosaccharides using *Kluyveromyces marxianus* NCIM 3551. *New Biotechnology* **2015**, *32*, 412-418.
161. De Faria, J. T.; Moraes, M. L.; Del Borghi, A.; Converti, A.; Passos, F. M. L.; Minim, L. A.; De Vanzela, A. P. F. C.; Sampaio, F. C., Use of response surface methodology to predict optimal conditions of *Kluyveromyces lactis* permeabilization by a physical method. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* **2012**, *26*, 119-125.
162. Somkuti, G. A.; Steinberg, D. H., Permeabilization of *Streptococcus thermophilus* and the expression of beta-galactosidase. *Enzyme and Microbial Technology* **1994**, *16*, 573-576.
163. Flores, M. V.; Voget, C. E.; Ertola, R. J. J., Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces lactis*) with organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology* **1994**, *16*, 340-346.
164. Panesar, P. S.; Panesar, R.; Singh, R. S.; Bera, M. B., Permeabilization of yeast cells with organic solvents for β -galactosidase activity. *Research Journal of Microbiology* **2007**, *2*, 34-41.
165. Gobinath, D.; Prapulla, S. G., Permeabilized probiotic *Lactobacillus plantarum* as a source of β -galactosidase for the synthesis of prebiotic galactooligosaccharides. *Biotechnology Letters* **2014**, *36*, 153-157.
166. Yadav, J. S. S.; Bezawada, J.; Yan, S.; Tyagi, R. D.; Surampalli, R. Y., Permeabilization of *Kluyveromyces marxianus* with mild detergent for whey lactose hydrolysis and augmentation of mixed culture. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2014**, *172*, 3207-3222.
167. Somkuti, G. A.; Dominiacki, M. E.; Steinberg, D. H., Permeabilization of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* with Ethanol. *Current Microbiology* **1998**, *36*, 202-206.
168. Becerra, M.; Baroli, B.; Fadda, A. M.; Blanco Méndez, J.; González Siso, M. I., Lactose bioconversion by calcium-alginate immobilization of *Kluyveromyces lactis* cells. *Enzyme and Microbial Technology* **2001**, *29*, 506-512.

169. Manera, A. P.; De Almeida Costa, F. A.; Rodrigues, M. I.; Kalil, S. J.; Maugeri Filho, F., Galacto-oligosaccharides production using permeabilized cells of *Kluyveromyces marxianus*. *International Journal of Food Engineering* **2010**, *6*.
170. Yu, L.; O'Sullivan, D. J., Production of galactooligosaccharides using a hyperthermophilic β -galactosidase in permeabilized whole cells of *Lactococcus lactis*. *Journal of Dairy Science* **2014**, *97*, 694-703.
171. Makkar, H. P. S.; Sharma, O. P.; Negi, S. S., Immobilization and properties of β -D-galactosidase from *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Biosciences* **1981**, *3*, 7-16.
172. Saad, R. R., Purification and some properties of β -galactosidase from *Aspergillus japonicus*. *Annals of Microbiology* **2004**, *54*, 299-306.
173. Chang, W. J.; Koo, Y. M., Recovery of β -galactosidase from *E. coli* double lysogen using aqueous two phase system. *Biotechnology Techniques* **1998**, *12*, 455-457.
174. Da Silva, M. E.; Franco, T. T., Purification of microbial β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* by bioaffinity partitioning. *Revista de Microbiologia* **1999**, *30*, 324-331.
175. Lemes, A. C.; Machado, J. R.; Brites, M. L.; Luccio, M. D.; Kalil, S. J., Design strategies for integrated β -galactosidase purification processes. *Chemical Engineering and Technology* **2014**, 10.1002/ceat.201300433.
176. Wallenfels, K., Enzymatische Synthese von Oligosacchariden aus Disacchariden. *Die Naturwissenschaften* **1951**, *38*, 306-307.
177. Torres, D. P.; Gonçalves, M.; Teixeira, J. A.; Rodrigues, L. R., Galacto-Oligosaccharides: Production, properties, applications, and significance as prebiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2010**, *9*, 438-454.
178. <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-galacto-oligosaccharides-gos-market>
179. Huh, K. T.; Toba, T.; Adachi, S., Oligosaccharide formation during the hydrolysis of lactose with hydrochloric acid and cation exchange resin. *Food Chemistry* **1990**, *38*, 305-314.

180. Huh, K. T.; Toba, T.; Adachi, S., Oligosaccharide structures formed during acid hydrolysis of lactose. *Food Chemistry* **1991**, *39*, 39-49.
181. Coutinho, P. M.; Deleury, E.; Davies, G. J.; Henrissat, B., An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *Journal of Molecular Biology* **2003**, *328*, 307-317.
182. Lairson, L. L.; Henrissat, B.; Davies, G. J.; Withers, S. G., Glycosyl transferases: Structures, functions, and mechanisms. In *Annual Review of Biochemistry*, 2008; Vol. 77, pp 521-555.
183. Neri, D. F. M. Immobilization of β -galactosidase ontp different water insoluble matrices Universidade do Minho, 2008.
184. Park, H.-Y.; Kim, H.-J.; Lee, J.-K.; Kim, D.; Oh, D.-K., Galactooligosaccharide production by a thermostable β -galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2007**, *24*, 1553-1558.
185. Mahoney, R. R., Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: A review. *Food Chemistry* **1998**, *63*, 147-154.
186. Lamsal, B. P., Production, health aspects and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2012**, *92*, 2020-2028.
187. Schwab, C.; Lee, V.; Sørensen, K. I.; Gänzle, M. G., Production of galactooligosaccharides and heterooligosaccharides with disrupted cell extracts and whole cells of lactic acid bacteria and bifidobacteria. *International Dairy Journal* **2011**, *21*, 748-754.
188. Warmerdam, A.; Benjamins, E.; de Leeuw, T. F.; Broekhuis, T. A.; Boom, R. M.; Janssen, A. E. M., Galacto-oligosaccharide production with immobilized β -galactosidase in a packed-bed reactor vs. free β -galactosidase in a batch reactor. *Food and Bioproducts Processing* **2014**, *92*, 383-392.
189. Hsu, C. A.; Lee, S. L.; Chou, C. C., Enzymatic production of galactooligosaccharides by β -galactosidase from *Bifidobacterium longum* BCRC 15708. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 2225-2230.
190. Albayrak, N.; Yang, S. T., Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase on tosylated cotton cloth. *Enzyme and Microbial Technology* **2002**, *31*, 371-383.

191. Huerta, L. M.; Vera, C.; Guerrero, C.; Wilson, L.; Illanes, A., Synthesis of galacto-oligosaccharides at very high lactose concentrations with immobilized β -galactosidases from *Aspergillus oryzae*. *Process Biochemistry* **2011**, *46*, 245-252.
192. Akiyama, K.; Takase, M.; Horikoshi, K.; Okonogi, S., Production of galactooligosaccharides from lactose using a β -glucosidase from *Thermus sp.* Z-1. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **2001**, *65*, 438-441.
193. Hansson, T.; Adlercreutz, P., Optimization of galactooligosaccharide production from lactose using β -glycosidases from hyperthermophiles. *Food Biotechnology* **2001**, *15*, 79-97.
194. Ji, E. S.; Park, N. H.; Oh, D. K., Galacto-oligosaccharide production by a thermostable recombinant β -galactosidase from *Thermotoga maritima*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2005**, *21*, 759-764.
195. Boon, M. A.; Janssen, A. E. M.; Van 't Riet, K., Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology* **2000**, *26*, 271-281.
196. Iwasaki, K. I.; Nakajima, M.; Nakao, S. I., Galacto-oligosaccharide production from lactose by an enzymic batch reaction using β -galactosidase. *Process Biochemistry* **1996**, *31*, 69-76.
197. Mozaffar, Z.; Nakanishi, K.; Matsuno, R., Formation of Oligosaccharides During Hydrolysis of Lactose in Milk Using β -Galactosidase from *Bacillus circulans*. *Journal of Food Science* **1985**, *50*, 1602-1606.
198. Lu, L.; Xiao, M.; Xu, X.; Li, Z.; Li, Y., A novel β -galactosidase capable of glycosyl transfer from *Enterobacter agglomerans* B1. *Biochemical and biophysical research communications* **2007**, *356*, 78-84.
199. Placier, G.; Watzlawick, H.; Rabiller, C.; Mattes, R., Evolved β -galactosidases from *Geobacillus stearothermophilus* with improved transgalactosylation yield for galacto-oligosaccharide production. *Applied and Environmental Microbiology* **2009**, *75*, 6312-6321.
200. Tzortzis, G.; Goulas, A. K.; Gibson, G. R., Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides using whole cells of a novel strain, *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171. *Applied microbiology and biotechnology* **2005**, *68*, 412-416.

201. Rabiou, B. A.; Jay, A. J.; Gibson, G. R.; Rastall, R. A., Synthesis and Fermentation Properties of Novel Galacto-Oligosaccharides by β -Galactosidases from *Bifidobacterium* Species. *Applied and Environmental Microbiology* **2001**, *67*, 2526-2530.
202. Bruins, M.; Strubel, M.; Van Lieshout, J.; Janssen, A.; Boom, R., Oligosaccharide synthesis by the hyperthermostable β -glucosidase from *Pyrococcus furiosus*: kinetics and modelling. *Enzyme and Microbial Technology* **2003**, *33*, 3-11.
203. Park, H.-Y.; Kim, H.-J.; Lee, J.-K.; Kim, D.; Oh, D.-K., Galactooligosaccharide production by a thermostable β -galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2008**, *24*, 1553-1558.
204. Ji, E.-S.; Park, N.-H.; Oh, D.-K., Galacto-oligosaccharide production by a thermostable recombinant β -galactosidase from *Thermotoga maritima*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2005**, *21*, 759-764.
205. Akiyama, K.; Takase, M.; Horikoshi, K.; Okonogi, S., Production of galactooligosaccharides from lactose using a β -glucosidase from *Thermus* sp. Z-1. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **2001**, *65*, 438-441.
206. Nakao, M.; Harada, M.; Kodama, Y.; Nakayama, T.; Shibano, Y.; Amachi, T., Purification and characterization of a thermostable β -galactosidase with high transgalactosylation activity from *Saccharopolyspora rectivirgula*. *Applied microbiology and biotechnology* **1994**, *40*, 657-663.
207. Chockchaisawasdee, S.; Athanasopoulos, V. I.; Niranjana, K.; Rastall, R. A., Synthesis of galacto-oligosaccharide from lactose using β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Studies on batch and continuous UF membrane-fitted bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering* **2005**, *89*, 434-443.
208. Onishi, N.; Yokozeki, K., Gluco-oligosaccharide and galacto-oligosaccharide production by *Rhodotorula minuta* IF0879. *Journal of fermentation and bioengineering* **1996**, *82*, 124-127.
209. Onishi, N.; Tanaka, T., Purification and properties of a novel thermostable galacto-oligosaccharide-producing beta-galactosidase from *Sterigmatomyces elviae* CBS8119. *Applied and environmental microbiology* **1995**, *61*, 4026-4030.

210. Onishi, N.; Kira, I.; Yokozeki, K., Galacto-oligosaccharide production from lactose by *Sirobasidium magnum* CBS6803. *Letters in applied microbiology* **1996**, *23*, 253-256.
211. Ozawa, O.; Ohtsuka, K.; Uchida, T., Production of 4'-galactosyllactose by Mixed Cells of *Cryptococcus laurentii* and Baker's Yeast. *NIPPON SHOKUHIN KOGYO GAKKAISHI* **1989**, *36*, 898-902.
212. Sako, T.; Matsumoto, K.; Tanaka, R., Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *International Dairy Journal* **1999**, *9*, 69-80.
213. In MJ, C. H., Characterization of β -galactosidase with high transgalactosylation activity produced by *Penicillium* sp. KFCC 10888. *Korean J Appl Microbiol Biothechnol* **1998**, *26*, 40-44.
214. Cruz, R.; Cruz, V. c. D. A.; Belote, J. G.; de Oliveira Khenayfes, M.; Dorta, C.; dos Santos Oliveira, L. z. H.; Ardiles, E.; Galli, A., Production of transgalactosylated oligosaccharides (TOS) by galactosyltransferase activity from *Penicillium simplicissimum*. *Bioresource technology* **1999**, *70*, 165-171.
215. Nakkharat, P.; Kulbe, K. D.; Yamabhai, M.; Haltrich, D., Formation of galacto-oligosaccharides during lactose hydrolysis by a novel β -galactosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*. *Biotechnology journal* **2006**, *1*, 633-638.
216. Shin, H.-J.; Yang, J.-W., Enzymatic production of galactooligosaccharide by *Bullera singularis* β -galactosidase. *Journal of microbiology and biotechnology* **1998**, *8*, 484-489.
217. Shin, H. J.; Yang, J. W., Galacto-oligosaccharide production by β -galactosidase in hydrophobic organic media. *Biotechnology Letters* **1994**, *16*, 1157-1162.
218. Yang, S. T.; Bednarcik, J. A., Production of galacto-oligosaccharides from lactose by immobilized β -galactosidase. In *ACS Symposium Series*, 2001; Vol. 776, pp 131-154.
219. Wang, K.; Lu, Y.; Liang, W. Q.; Wang, S. D.; Jiang, Y.; Huang, R.; Liu, Y. H., Enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides in an organic-aqueous biphasic system by a novel β -galactosidase from a metagenomic library. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60*, 3940-3946.

220. Kaftzik, N.; Neumann, S.; Kula, M. R.; Kragl, U., Enzymatic condensation reactions in ionic liquids. In *ACS Symposium Series*, 2003; Vol. 856, pp 206-211.
221. Klewicki, R., Effect of selected parameters of lactose hydrolysis in the presence of β -galactosidase from various sources on the synthesis of galactosyl-polyol derivatives. *Engineering in Life Sciences* **2007**, *7*, 268-274.
222. del-Val, M. I.; Otero, C., Biphasic aqueous media containing polyethylene glycol for the enzymatic synthesis of oligosaccharides from lactose. *Enzyme and Microbial Technology* **2003**, *33*, 118-126.
223. Cheng, C. C.; Yu, M. C.; Cheng, T. C.; Sheu, D. C.; Duan, K. J.; Tai, W. L., Production of high-content galacto-oligosaccharide by enzyme catalysis and fermentation with *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Letters* **2006**, *28*, 793-797.
224. Guerrero, C.; Vera, C.; Novoa, C.; Dumont, J.; Acevedo, F.; Illanes, A., Purification of highly concentrated galacto-oligosaccharide preparations by selective fermentation with yeasts. *International Dairy Journal* **2014**, *39*, 78-88.
225. Onishi, N.; Tanaka, T., Galacto-oligosaccharide production using a recycling cell culture of *Sterigmatomyces elviae* CBS8119. *Letters in Applied Microbiology* **1998**, *26*, 136-139.
226. Sharp, K.; Kay, G.; Lilly, M. D., The kinetics of beta-galactosidase attached to porous cellulose sheets. *Biotechnology and Bioengineering* **1969**, *11*, 363-380.
227. Grosová, Z.; Rosenberg, M.; Rebroš, M., Perspectives and applications of immobilised β -galactosidase in food industry - A review. *Czech Journal of Food Sciences* **2008**, *26*, 1-14.
228. Di Serio, M.; Maturo, C.; De Alteriis, E.; Parascandola, P.; Tesser, R.; Santacesaria, E., Lactose hydrolysis by immobilized β -galactosidase: The effect of the supports and the kinetics. *Catalysis Today* **2003**, *79-80*, 333-339.
229. Husain, Q.; Ansari, S. A.; Alam, F.; Azam, A., Immobilization of *Aspergillus oryzae* β galactosidase on zinc oxide nanoparticles via simple adsorption mechanism. *International Journal of Biological Macromolecules* **2011**, *49*, 37-43.

230. Selvarajan, E.; Mohanasrinivasan, V.; Subathra Devi, C.; George Priya Doss, C., Immobilization of β -galactosidase from *Lactobacillus plantarum* HF571129 on ZnO nanoparticles: characterization and lactose hydrolysis. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **2015**, *38*, 1655-1669.
231. Atyaksheva, L. F.; Dobryakova, I. V.; Pilipenko, O. S., Adsorption of β -galactosidase on silica and aluminosilicate adsorbents. *Russian Journal of Physical Chemistry A* **2015**, *89*, 497-501.
232. Gaur, R.; Pant, H.; Jain, R.; Khare, S. K., Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Food Chemistry* **2006**, *97*, 426-430.
233. Poletto, M.; Saracino, I.; Parascandola, P.; Cifarelli, G., Hydrolysis of lactose in a fluidized bed of zeolite pellets supporting adsorbed β -galactosidase. *International Journal of Chemical Reactor Engineering* **2005**, *3*.
234. Klein, M. P.; Hackenhaar, C. R.; Lorenzoni, A. S. G.; Rodrigues, R. C.; Costa, T. M. H.; Ninow, J. L.; Hertz, P. F., Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and β -d-galactosidase immobilization. *Carbohydrate Polymers* **2016**, *137*, 184-190.
235. Prieto, L. M.; Ricordi, R. G.; Kuhn, R. C.; Foletto, E. L.; Mazutti, M. A.; Burkert, C. A. V., Evaluation of β -galactosidase adsorption into pre-treated carbon. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **2014**, *3*, 26-29.
236. Gürdaş, S.; Güleç, H. A.; Mutlu, M., Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -Galactosidase onto Duolite A568 Resin via Simple Adsorption Mechanism. *Food and Bioprocess Technology* **2010**, *5*, 904-911.
237. Fischer, J.; Guidini, C. Z.; Santana, L. N. S.; de Resende, M. M.; Cardoso, V. L.; Ribeiro, E. J., Optimization and modeling of lactose hydrolysis in a packed bed system using immobilized β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2013**, *85-86*, 178-186.
238. Maugard, T.; Gaunt, D.; Legoy, M. D.; Besson, T., Microwave-assisted synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose with immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnology Letters* **2003**, *25*, 623-629.

239. Guidini, C. Z.; Fischer, J.; Resende, M. M. D.; Cardoso, V. L.; Ribeiro, E. J., β -Galactosidase of *Aspergillus oryzae* immobilized in an ion exchange resin combining the ionic-binding and crosslinking methods: Kinetics and stability during the hydrolysis of lactose. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2011**, *71*, 139-145.
240. Ansari, S. A.; Husain, Q., Lactose hydrolysis by β galactosidase immobilized on concanavalin A-cellulose in batch and continuous mode. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2010**, *63*, 68-74.
241. Liu, J.-F.; Liu, H.; Tan, B.; Chen, Y.-H.; Yang, R.-J., Reversible immobilization of *K. fragilis* β -galactosidase onto magnetic polyethylenimine-grafted nanospheres for synthesis of galacto-oligosaccharide. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2012**, *82*, 64-70.
242. Engel, L.; Schneider, P.; Ebrahimi, M.; Czermak, P., Immobilization of β -galactosidase in adsorptive membranes for the continuous production of galacto-oligosaccharides from lactose. *The Open Food Science Journal* **2007**, *1*, 17-23.
243. Jovanovic-Malinovska, R.; Fernandes, P.; Winkelhausen, E.; Fonseca, L., Galacto-oligosaccharides Synthesis from Lactose and Whey by β -Galactosidase Immobilized in PVA. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2012**, *168*, 1197-1211.
244. Sen, P.; Nath, A.; Bhattacharjee, C.; Chowdhury, R.; Bhattacharya, P., Process engineering studies of free and micro-encapsulated β -galactosidase in batch and packed bed bioreactors for production of galactooligosaccharides. *Biochemical Engineering Journal* **2014**, *90*, 59-72.
245. Sakai, T.; Tsuji, H.; Shibata, S.; Hayakawa, K.; Matsumoto, K., Repeated-batch production of galactooligosaccharides from lactose at high concentration by using alginate-immobilized cells of *Sporobolomyces singularis* YIT 10047. *Journal of General and Applied Microbiology* **2008**, *54*, 285-293.
246. Pociđiđova, K.; Ćurda, L.; Miřun, D.; Dryakova, A.; Diblıkova, L., Preparation of galacto-oligosaccharides using membrane reactor. *Journal of Food Engineering* **2010**, *99*, 479-484.
247. Homaei, A. A.; Sariri, R.; Vianello, F.; Stevanato, R., Enzyme immobilization: an update. *Journal of Chemical Biology* **2013**, *6*, 185-205.

248. Urrutia, P.; Mateo, C.; Guisan, J. M.; Wilson, L.; Illanes, A., Immobilization of *Bacillus circulans* β -galactosidase and its application in the synthesis of galacto-oligosaccharides under repeated-batch operation. *Biochemical Engineering Journal* **2013**, *77*, 41-48.
249. Albayrak, N.; Yang, S. T., Immobilization of β -galactosidase on fibrous matrix by polyethyleneimine for production of galacto-oligosaccharides from lactose. *Biotechnology Progress* **2002**, *18*, 240-251.
250. Pan, C.; Hu, B.; Li, W.; Sun, Y.; Ye, H.; Zeng, X., Novel and efficient method for immobilization and stabilization of β -d-galactosidase by covalent attachment onto magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2009**, *61*, 208-215.
251. Neri, D. F. M.; Balcão, V. M.; Cardoso, S. M.; Silva, A. M. S.; Domingues, M. D. R. M.; Torres, D. P. M.; Rodrigues, L. R. M.; Carvalho, L. B.; Teixeira, J. A. C., Characterization of galactooligosaccharides produced by β -galactosidase immobilized onto magnetized Dacron. *International Dairy Journal* **2011**, *21*, 172-178.
252. Neri, D. F. M.; Balcão, V. M.; Dourado, F. O. Q.; Oliveira, J. M. B.; Carvalho Jr, L. B.; Teixeira, J. A., Galactooligosaccharides production by β -galactosidase immobilized onto magnetic polysiloxane-polyaniline particles. *Reactive and Functional Polymers* **2009**, *69*, 246-251.
253. Benavente, R.; Pessela, B. C.; Curiel, J. A.; De Las Rivas, B.; Muñoz, R.; Guisán, J. M.; Mancheño, J. M.; Cardelle-Cobas, A.; Ruiz-Matute, A. I.; Corzo, N., Improving properties of a novel β -galactosidase from *Lactobacillus plantarum* by covalent immobilization. *Molecules* **2015**, *20*, 7874-7889.
254. Selvarajan, E.; Mohanasrinivasan, V.; Subathra Devi, C.; George Priya Doss, C., Immobilization of β -galactosidase from *Lactobacillus plantarum* HF571129 on ZnO nanoparticles: characterization and lactose hydrolysis. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **2015**, *38*.
255. Li, L.; Li, G.; Cao, L.-c.; Ren, G.-h.; Kong, W.; Wang, S.-d.; Guo, G.-s.; Liu, Y.-H., Characterization of the Cross-Linked Enzyme Aggregates of a Novel β -Galactosidase, a Potential Catalyst for the Synthesis of Galacto-Oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2015**, *63*, 894-901.

256. Van Leusen, E.; Torringa, E.; Groenink, P.; Kortleve, P.; Geene, R.; Schoterman, M.; Klarenbeek, B., Industrial Applications of Galactooligosaccharides. In *Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity*, 2014; 10.1002/9781118817360.ch25pp 470-491.
257. Otieno, D. O., Synthesis of β -Galactooligosaccharides from Lactose Using Microbial β -Galactosidases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2010**, *9*, 471-482.
258. Palai, T.; Kumar, A.; Bhattacharya, P. K., Kinetic studies and model development for the formation of galacto-oligosaccharides from lactose using synthesized thermo-responsive bioconjugate. *Enzyme and Microbial Technology* **2015**, *70*, 42-49.
259. Vera, C.; Guerrero, C.; Illanes, A.; Conejeros, R., Fed-batch synthesis of galacto-oligosaccharides with *Aspergillus oryzae* β -galactosidase using optimal control strategy. *Biotechnology Progress* **2014**, *30*, 59-67.
260. Albayrak, N.; Yang, S. T., Production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase immobilized on cotton cloth. *Biotechnology and Bioengineering* **2002**, *77*, 8-19.
261. Shin, H. J.; Park, J. M.; Yang, J. W., Continuous production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Bullera singularis* β -galactosidase immobilized in chitosan beads. *Process Biochemistry* **1998**, *33*, 787-792.
262. Srivastava, A.; Mishra, S.; Chand, S., Synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose using immobilized cells of *Kluyveromyces marxianus* NCIM 3551. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2016**, *123*, 147-153.
263. Nath, A.; Bhattacharjee, C.; Chowdhury, R., Synthesis and separation of galacto-oligosaccharides using membrane bioreactor. *Desalination* **2013**, *316*, 31-41.
264. Czermak, P.; Ebrahimi, M.; Grau, K.; Netz, S.; Sawatzki, G.; Pfromm, P. H., Membrane-assisted enzymatic production of galactosyl-oligosaccharides from lactose in a continuous process. *Journal of Membrane Science* **2004**, *232*, 85-91.
265. Foda, M. I.; Lopez-Leiva, M., Continuous production of oligosaccharides from whey using a membrane reactor. *Process Biochemistry* **2000**, *35*, 581-587.

266. Splechna, B.; Nguyen, T. H.; Haltrich, D., Comparison between discontinuous and continuous lactose conversion processes for the production of prebiotic galacto-oligosaccharides using β -galactosidase from *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 6772-6777.
267. Matella, N. J.; Dolan, K. D.; Lee, Y. S., Comparison of galactooligosaccharide production in free-enzyme ultrafiltration and in immobilized-enzyme systems. *Journal of Food Science* **2006**, *71*, C363-C368.
268. Sangwan, V.; Tomar, S. K.; Singh, R. R. B.; Singh, A. K.; Ali, B., Galactooligosaccharides: Novel Components of Designer Foods. *Journal of Food Science* **2011**, *76*, R103-R111.
269. Macfarlane, G. T.; Steed, H.; Macfarlane, S., Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology* **2008**, *104*, 305-344.
270. Pourabedin, M.; Zhao, X., Prebiotics and gut microbiota in chickens. *FEMS Microbiology Letters* **2015**, *362*.
271. Bruno-Barcena, J. M.; Azcarate-Peril, M. A., Galacto-oligosaccharides and colorectal cancer: Feeding our intestinal probiome. *Journal of Functional Foods* **2015**, *12*, 92-108.
272. Haarman, M.; Knol, J., Quantitative real-time PCR analysis of fecal *Lactobacillus* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Applied and Environmental Microbiology* **2006**, *72*, 2359-2365.
273. Moro, G. E.; Mosca, F.; Miniello, V.; Fanaro, S.; Jelinek, J.; Stahl, B.; Boehm, G., Effects of a new mixture of prebiotics on faecal flora and stools in term infants. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics, Supplement* **2003**, *91*, 77-79.
274. Silk, D. B. A.; Davis, A.; Vulevic, J.; Tzortzis, G.; Gibson, G. R., Clinical trial: The effects of a trans-galactooligosaccharide prebiotic on faecal microbiota and symptoms in irritable bowel syndrome. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **2009**, *29*, 508-518.

275. Depeint, F.; Tzortzis, G.; Vulevic, J.; I'Anson, K.; Gibson, G. R., Prebiotic evaluation of a novel galactooligosaccharide mixture produced by the enzymatic activity of *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171, in healthy humans: A randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled intervention study. *American Journal of Clinical Nutrition* **2008**, *87*, 785-791.
276. Cardelle-Cobas, A.; Corzo, N.; Olano, A.; Peláez, C.; Requena, T.; Ávila, M., Galactooligosaccharides derived from lactose and lactulose: Influence of structure on *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* growth. *International Journal of Food Microbiology* **2011**, *149*, 81-87.
277. Shoaf, K.; Mulvey, G. L.; Armstrong, G. D.; Hutkins, R. W., Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells. *Infection and Immunity* **2006**, *74*, 6920-6928.
278. Sangwan, V.; Tomar, S. K.; Ali, B.; Singh, R. R. B.; Singh, A. K., Galactooligosaccharides reduce infection caused by *Listeria monocytogenes* and modulate IgG and IgA levels in mice. *International Dairy Journal* **2015**, *41*, 58-63.
279. Sinclair, H. R.; De Slegte, J.; Gibson, G. R.; Rastall, R. A., Galactooligosaccharides (GOS) inhibit *Vibrio cholerae* toxin binding to its GM1 receptor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57*, 3113-3119.
280. Vulevic, J.; Drakoularakou, A.; Yaqoob, P.; Tzortzis, G.; Gibson, G. R., Modulation of the fecal microflora profile and immune function by a novel trans-galactooligosaccharide mixture (B-GOS) in healthy elderly volunteers. *American Journal of Clinical Nutrition* **2008**, *88*, 1438-1446.
281. Intanon, M.; Arreola, S. L.; Pham, N. H.; Kneifel, W.; Haltrich, D.; Nguyen, T. H., Nature and biosynthesis of galacto-oligosaccharides related to oligosaccharides in human breast milk. *FEMS Microbiology Letters* **2014**, *353*, 89-97.
282. Kunz, C.; Rudloff, S., Potential anti-inflammatory and anti-infectious effects of human milk oligosaccharides. *Advances in experimental medicine and biology* **2008**, *606*, 455-465.
283. Boehm, G.; Stahl, B.; Knol, J.; Garsen, J., Carbohydrates in Human Milk and Infant Formulas. In *Carbohydrate Chemistry, Biology and Medical Applications*, 2008; 10.1016/B978-0-08-054816-6.00012-4pp 275-291.

284. Krutmann, J., Pre- and probiotics for human skin. *Journal of Dermatological Science* **2009**, *54*, 1-5.
285. Biggs, P.; Parsons, C. M.; Fahey, G. C., The effects of several oligosaccharides on growth performance, nutrient digestibilities, and cecal microbial populations in young chicks. *Poultry Science* **2007**, *86*, 2327-2336.
286. Jung, S. J.; Houde, R.; Baurhoo, B.; Zhao, X.; Lee, B. H., Effects of galacto-oligosaccharides and a *Bifidobacteria lactis*-based probiotic strain on the growth performance and fecal microflora of broiler chickens. *Poultry Science* **2008**, *87*, 1694-1699.
287. Varasteh, S.; Braber, S.; Akbari, P.; Garssen, J.; Fink-Gremmels, J., Differences in susceptibility to heat stress along the chicken intestine and the protective effects of galacto- oligosaccharides. *PLoS ONE* **2015**, *10*.
288. Tzortzis, G.; Goulas, A. K.; Gee, J. M.; Gibson, G. R., A novel galactooligosaccharide mixture increases the bifidobacterial population numbers in a continuous in vitro fermentation system and in the proximal colonic contents of pigs in vivo. *Journal of Nutrition* **2005**, *135*, 1726-1731.
289. Hoseinifar, S. H.; Khalili, M.; Khoshbavar Rostami, H.; Esteban, M. T., Dietary galactooligosaccharide affects intestinal microbiota, stress resistance, and performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Fish and Shellfish Immunology* **2013**, *35*, 1416-1420.
290. Zhou, Q. C.; Buentello, J. A.; Gatlin, D. M., Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* **2010**, *309*, 253-257.
291. Adamczak, M.; Charubin, D.; Bednarski, W., Influence of reaction medium composition on enzymatic synthesis of galactooligosaccharides and lactulose from lactose concentrates prepared from whey permeate. *Chemical Papers* **2009**, *63*, 111-116.
292. Mu, W.; Chen, Q.; Wang, X.; Zhang, T.; Jiang, B., Current studies on physiological functions and biological production of lactosucrose. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2013**, *97*, 7073-7080.

293. Qiao, Y.; Huang, Y.; Feng, F.; Chen, Z.-G., Efficient enzymatic synthesis and antibacterial activity of andrographolide glycoside. *Process Biochemistry* **2016**, *51*, 675-680.
294. Porciúncula González, C.; Castilla, A.; Garófalo, L.; Soule, S.; Irazoqui, G.; Giacomini, C., Enzymatic synthesis of 2-aminoethyl β -d-galactopyranoside catalyzed by *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Carbohydrate Research* **2013**, *368*, 104-110.
295. González, C. P.; Rodríguez, E.; Soule, S.; Fraguas, L. F.; Brena, B. M.; Giacomini, C.; Irazoqui, G., Enzymatic synthesis of 3-aminopropyl-1- O - β - D - galactopyranoside catalyzed by *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Biocatalysis and Biotransformation* **2015**, *33*, 197-207.
296. Zeuner, B.; Jers, C.; Mikkelsen, J. D.; Meyer, A. S., Methods for Improving Enzymatic Trans-glycosylation for Synthesis of Human Milk Oligosaccharide Biomimetics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, *62*, 9615-9631.
297. Bridiau, N.; Taboubi, S.; Marzouki, N.; Legoy, M. D.; Maugard, T., β -galactosidase catalyzed selective galactosylation of aromatic compounds. *Biotechnology Progress* **2006**, *22*, 326-330.
298. Lee, J. H.; Yoo, H. Y.; Jung, D. U.; Park, C.; Song, Y. S.; Park, C.; Kim, S. W., Research trend of lactulose production from lactose. *Korean Chemical Engineering Research* **2014**, *52*, 407-412.
299. Giacomini, C.; Irazoqui, G.; Gonzalez, P.; Batista-Viera, F.; Brena, B. M., Enzymatic synthesis of galactosyl-xylose by *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2002**, *19-20*, 159-165.
300. Yang, J.; Chen, X.; Yu, D.; Gao, R., Microwave-assisted synthesis of butyl galactopyranoside catalyzed by β -galactosidase from *Thermotoga naphthophila* RKU-10. *Process Biochemistry* **2016**, *51*, 53-58.
301. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **1976**, *72*, 248-254.
302. Bezbradica, D., *Sinteza estara katalizovana slobodnim lipazama i lipazama imobilisanim na polimernim nosačima*. Tehnološko-metalurški fakultet: Beograd, 2007.

303. Tari, C.; Ustok, F. I.; Harsa, S., Production of food grade β -galactosidase from artisanal yogurt strains. *Food Biotechnology* **2010**, *24*, 78-94.
304. Alves, F. G.; Filho, F. M.; De Medeiros Burkert, J. F.; Kalil, S. J., Maximization of β -Galactosidase production: A simultaneous investigation of agitation and aeration effects. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2010**, *160*, 1528-1539.
305. Choonia, H. S.; Lele, S. S., RELEASE OF β -GALACTOSIDASE FROM INDIGENOUS *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* BY ULTRASONICATION: PROCESS OPTIMIZATION. *Chemical Engineering Communications* **2011**, *198*, 668-677.
306. Gobinath, D.; Prapulla, S., Transgalactosylating β -galactosidase from probiotic *Lactobacillus plantarum* MCC2156: production and permeabilization for use as whole cell biocatalyst. *Journal of Food Science and Technology* **2015**, *52*, 6003-6009.
307. Prasad, L. N.; Ghosh, B. C.; Sherkat, F.; Shah, N. P., Extraction and characterisation of β -galactosidase produced by *Bifidobacterium animalis* spp. lactis Bb12 and *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842 grown in whey. *International Food Research Journal* **2013**, *20*, 487-494.
308. Schütte, H.; Kula, M. R., Analytical disruption of microorganisms in a mixer mill. *Enzyme and Microbial Technology* **1988**, *10*, 552-558.
309. Schütte, H.; Kroner, K. H.; Hustedt, H.; Kula, M. R., Experiences with a 20 litre industrial bead mill for the disruption of microorganisms. *Enzyme and Microbial Technology* **1983**, *5*, 143-148.
310. Nguyen, T.-T.; Nguyen, H. A.; Arreola, S. L.; Mlynek, G.; Djinović-Carugo, K.; Mathiesen, G.; Nguyen, T.-H.; Haltrich, D., Homodimeric β -Galactosidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081: Expression in *Lactobacillus plantarum* and Biochemical Characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60*, 1713-1721.
311. Juers, D. H.; Jacobson, R. H.; Wigley, D.; Zhang, X. J.; Huber, R. E.; Tronrud, D. E.; Matthews, B. W., High resolution refinement of β -galactosidase in a new crystal form reveals multiple metal-binding sites and provides a structural basis for α -complementation. *Protein Science* **2000**, *9*, 1685-1699.

312. Jurado, E.; Camacho, F.; Luzón, G.; Vicaria, J. M., A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology* **2002**, *31*, 300-309.
313. Corral, J. M.; Bañuelos, O.; Adrio, J. L.; Velasco, J., Cloning and characterization of a β -galactosidase encoding region in *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2006**, *73*, 640-646.
314. Fernández, M.; Margolles, A.; Suárez, J. E.; Mayo, B., Duplication of the β -galactosidase gene in some *Lactobacillus plantarum* strains. *International Journal of Food Microbiology* **1999**, *48*, 113-123.
315. Obst, M.; Meding, E. R.; Vogel, R. F.; Hammes, W. P., Two genes encoding the β -galactosidase of *Lactobacillus sake*. *Microbiology* **1995**, *141*, 3059-3066.
316. Pan, Q.; Li, J.; Cong, Y.; Liu, L.; Zhu, J.; Hu, F., Cloning, expression and characterization of a heterodimeric beta-galactosidase from *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Wei sheng wu xue bao = Acta microbiologica Sinica* **2008**, *48*, 1339-1343.
317. Guerrero, C.; Vera, C.; Plou, F.; Illanes, A., Influence of reaction conditions on the selectivity of the synthesis of lactulose with microbial β -galactosidases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2011**, *72*, 206-212.
318. Splechna, B.; Nguyen, T. H.; Zehetner, R.; Lettner, H. P.; Lorenz, W.; Haltrich, D., Process development for the production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using β -galactosidase from *Lactobacillus* sp. *Biotechnology Journal* **2007**, *2*, 480-485.
319. Gargova, S.; Pishtijski, I.; Stoilova, I., Purification and properties of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* **1995**, *9*, 47-52.
320. Pilipenko, O. S.; Atyaksheva, L. F.; Poltorak, O. M.; Chukhrai, E. S., The catalytic properties and stability of β -galactosidases from fungi. *Russian Journal of Physical Chemistry A* **2008**, *82*, 2250-2254.
321. Gargova, S.; Pishtijski, I.; Stoilova, I., Purification and Properties of β -Galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **1995**, *9*, 47-51.

322. Toba, T.; Yokota, A.; Adachi, S., Oligosaccharide structures formed during the hydrolysis of lactose by *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Food Chemistry* **1985**, *16*, 147-162.
323. Urrutia, P.; Rodriguez-Colinas, B.; Fernandez-Arrojo, L.; Ballesteros, A. O.; Wilson, L.; Illanes, A.; Plou, F. J., Detailed analysis of galactooligosaccharides synthesis with β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61*, 1081-1087.
324. Wang, Y.; Black, B. A.; Curtis, J. M.; Gänzle, M. G., Characterization of α -galacto-oligosaccharides formed via heterologous expression of α -galactosidases from *Lactobacillus reuteri* in *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2014**, *98*, 2507-2517.
325. Black, B. A.; Lee, V. S. Y.; Zhao, Y. Y.; Hu, Y.; Curtis, J. M.; Gänzle, M. G., Structural identification of novel oligosaccharides produced by *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60*, 4886-4894.
326. McSweeney, P. L. H.; Fox, P. F., Lactose, water, salts and minor constituents. *Advanced Dairy Chemistry* **2009**, *3*.
327. Gosling, A.; Stevens, G. W.; Barber, A. R.; Kentish, S. E.; Gras, S. L., Effect of the substrate concentration and water activity on the yield and rate of the transfer reaction of β -galactosidase from *Bacillus circulans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59*, 3366-3372.
328. Yoon, J. H.; McKenzie, D., A comparison of the activities of three β -galactosidases in aqueous-organic solvent mixtures. *Enzyme and Microbial Technology* **2005**, *36*, 439-446.
329. Li, L.; Li, G.; Cao, L. C.; Ren, G. H.; Kong, W.; Wang, S. D.; Guo, G. S.; Liu, Y. H., Characterization of the cross-linked enzyme aggregates of a novel β -galactosidase, a potential catalyst for the synthesis of galacto-oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2015**, *63*, 894-901.
330. Cruz-Guerrero, A. E.; Gómez-Ruiz, L.; Viniestra-González, G.; Bárzana, E.; García-Garibay, M., Influence of water activity in the synthesis of galactooligosaccharides produced by a hyperthermophilic β -glycosidase in an organic medium. *Biotechnology and Bioengineering* **2006**, *93*, 1123-1129.

331. Lu, L. l.; Xiao, M.; Li, Z. y.; Li, Y. m.; Wang, F. s., A novel transglycosylating β -galactosidase from *Enterobacter cloacae* B5. *Process Biochemistry* **2009**, *44*, 232-236.
332. Arreola, S. L.; Intanon, M.; Suljic, J.; Kittl, R.; Pham, N. H.; Kosma, P.; Haltrich, D.; Nguyen, T. H., Two β -galactosidases from the human isolate *Bifidobacterium breve* DSM 20213: Molecular cloning and expression, biochemical characterization and synthesis of galacto-oligosaccharides. *PLoS ONE* **2014**, *9*.
333. Goulas, T.; Goulas, A.; Tzortzis, G.; Gibson, G. R., Expression of four β -galactosidases from *Bifidobacterium bifidum* NCIMB41171 and their contribution on the hydrolysis and synthesis of galactooligosaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2009**, *84*, 899-907.
334. Osman, A.; Tzortzis, G.; Rastall, R. A.; Charalampopoulos, D., BbgIV is an important *Bifidobacterium* β -galactosidase for the synthesis of prebiotic galactooligosaccharides at high temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60*, 740-748.
335. Yi, S. H.; Alli, I.; Park, K. H.; Lee, B., Overexpression and characterization of a novel transgalactosylic and hydrolytic β -galactosidase from a human isolate *Bifidobacterium breve* B24. *New Biotechnology* **2011**, *28*, 806-813.
336. Tzortzis, G., Development and Evaluation Bimuno®, a Novel Second-Generation Prebiotic Galactooligosaccharide Mixture. In *Nondigestible Carbohydrates and Digestive Health*, Wiley-Blackwell: 2010; 10.1002/9780470958186.ch12pp 295-311.
337. Domon, B.; Costello, C. E., A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate Journal* **1988**, *5*, 397-409.
338. Splechtina, B.; Nguyen, T. H.; Steinböck, M.; Kulbe, K. D.; Lorenz, W.; Haltrich, D., Production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using β -galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 4999-5006.
339. Katchalski-Katzir, E.; Kraemer, D. M., Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2000**, *10*, 157-176.

340. Bezbradica, D., Ćorović, J., Prodanović, R., Milosavić, N., Knežević, Z., Covalent immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit®. *Acta Periodica Technologica* **2005**, *36*, 179-186.
341. Campello Graciella da, S.; Trindade Renata, A.; Rêgo Tatiane, V.; Burkert Janaína Fernandes de, M.; Burkert Carlos André, V., Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on Eupergit® C and Properties of the Biocatalyst. In *International Journal of Food Engineering*, 2012; Vol. 8.
342. Braga, A. R. C.; Silva, M. F.; Oliveira, J. V.; Treichel, H.; Kalil, S. J., A new approach to evaluate immobilization of β -galactosidase on Eupergit® C: Structural, kinetic, and thermal characterization. *Quimica Nova* **2014**, *37*, 796-803.
343. Torres, P.; Batista-Viera, F., Improved biocatalysts based on *Bacillus circulans* β -galactosidase immobilized onto epoxy-activated acrylic supports: Applications in whey processing. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2012**, *83*, 57-64.
344. Mihailović, M.; Stojanović, M.; Banjanac, K.; Carević, M.; Prlainović, N.; Milosavić, N.; Bezbradica, D., Immobilization of lipase on epoxy-activated Purolite® A109 and its post-immobilization stabilization. *Process Biochemistry* **2014**, *49*, 637-646.
345. Guidini, C. Z.; Fischer, J.; Santana, L. N. S.; Cardoso, V. L.; Ribeiro, E. J., Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in ion exchange resins by combined ionic-binding method and cross-linking. *Biochemical Engineering Journal* **2010**, *52*, 137-143.
346. Grimsley, G. R.; Scholtz, J. M.; Pace, C. N., A summary of the measured pK values of the ionizable groups in folded proteins. *Protein Science* **2009**, *18*, 247-251.
347. Pace, C. N.; Grimsley, G. R.; Scholtz, J. M., Protein ionizable groups: pK values and their contribution to protein stability and solubility. *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284*, 13285-13289.
348. Li, H.; Robertson, A. D.; Jensen, J. H., Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values. *Proteins: Structure Function and Bioinformatics* **2005**, *61*, 704-721.

349. Lindman, S.; Bauer, M. C.; Lund, M.; Diehl, C.; Mulder, F. A. A.; Akke, M.; Linse, S., pKa Values for the Unfolded State under Native Conditions Explain the pH-Dependent Stability of PGB1. *Biophysical Journal* **2010**, *99*, 3365-3373.
350. Shan, J.; Mehler, E. L., Calculation of pKa in proteins with the microenvironment modulated-screened coulomb potential. *Proteins: Structure Function and Bioinformatics* **2011**, *79*, 3346-3355.
351. Haider, T.; Husain, Q., Calcium alginate entrapped preparations of *Aspergillus oryzae* β galactosidase: Its stability and applications in the hydrolysis of lactose. *International Journal of Biological Macromolecules* **2007**, *41*, 72-80.
352. Mateo, C.; Torres, R.; Fernández-Lorente, G.; Ortiz, C.; Fuentes, M.; Hidalgo, A.; López-Gallego, F.; Abian, O.; Palomo, J. M.; Betancor, L.; Pessela, B. C. C.; Guisan, J. M.; Fernández-Lafuente, R., Epoxy-amino groups: A new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 772-777.
353. Cipolatti, E. P.; Silva, M. J. A.; Klein, M.; Feddern, V.; Feltes, M. M. C.; Oliveira, J. V.; Ninow, J. L.; De Oliveira, D., Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2014**, *99*, 56-67.
354. Misson, M.; Du, X.; Jin, B.; Zhang, H., Dendrimer-like nanoparticles based β -galactosidase assembly for enhancing its selectivity toward transgalactosylation. *Enzyme and Microbial Technology* **2016**, *84*, 68-77.
355. Verma, M. L.; Barrow, C. J.; Kennedy, J. F.; Puri, M., Immobilization of β -d-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on functionalized silicon dioxide nanoparticles: Characterization and lactose hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules* **2012**, *50*, 432-437.
356. Misson, M.; Zhang, H.; Jin, B., Nanobiocatalyst advancements and bioprocessing applications. *Journal of the Royal Society Interface* **2015**, *12*.
357. Mohy Eldin, M. S.; El-Aassar, M. R.; El Zatahry, A. A.; Al-Sabah, M. M. B., Covalent immobilization of β -galactosidase onto amino-functionalized polyvinyl chloride microspheres: Enzyme immobilization and characterization. *Advances in Polymer Technology* **2014**, *33*.
358. Sen, P.; Bhattacharjee, C.; Bhattacharya, P., Experimental studies and two-dimensional modelling of a packed bed bioreactor used for production of galacto-

oligosaccharides (GOS) from milk whey. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **2016**, 10.1007/s00449-015-1516-2, 1-20.

359. Buma, T. J., Viscosity and density of concentrated lactose solutions and of concentrated cheese whey. *Neth. Milk Dairy J.* **1980**, *34*, 65-68.

360. Ribeiro, A. C. F.; Ortona, O.; Simões, S. M. N.; Santos, C. I. A. V.; Prazeres, P. M. R. A.; Valente, A. J. M.; Lobo, V. M. M.; Burrows, H. D., Binary mutual diffusion coefficients of aqueous solutions of sucrose, lactose, glucose, and fructose in the temperature range from (298.15 to 328.15) K. *Journal of Chemical and Engineering Data* **2006**, *51*, 1836-1840.

361. Chikode, P. P.; Pawar, S. J.; Fulari, V. J.; Dongre, M. B., Determination of Diffusion Coefficient of Lactose Solution. *Journal of Holography and Speckle* **2007**, *4*, 11-17.

362. Büchs, J.; Maier, U.; Milbradt, C.; Zoels, B., Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: I. Power consumption measurement in unbaffled flasks at low liquid viscosity. *Biotechnology and Bioengineering* **2000**, *68*, 589-593.

363. Büchs, J.; Maier, U.; Milbradt, C.; Zoels, B., Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: II. Nondimensional description of specific power consumption and flow regimes in unbaffled flasks at elevated liquid viscosity. *Biotechnology and Bioengineering* **2000**, *68*, 594-601.

364. Henzler, H. J., Particle stress in bioreactors. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* **2000**, *67*, 35-82.

365. Matyka, M.; Khalili, A.; Koza, Z., Tortuosity-porosity relation in porous media flow. *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics* **2008**, *78*.

366. Neri, D. F. M.; Balcão, V. M.; Dourado, F. O. Q.; Oliveira, J. M. B.; Carvalho Jr, L. B.; Teixeira, J. A., Immobilized β -galactosidase onto magnetic particles coated with polyaniline: Support characterization and galactooligosaccharides production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2011**, *70*, 74-80.

367. López-Munguía, A.; Hernández-Romero, Y.; Pedraza-Chaverri, J.; Miranda-Molina, A.; Regla, I.; Martínez, A.; Castillo, E., Phenylpropanoid glycoside analogues: Enzymatic synthesis, antioxidant activity and theoretical study of their free radical scavenger mechanism. *PLoS ONE* **2011**, *6*.

368. Lee, S. E.; Lee, H. Y.; Jung, K. H., Production of chlorphenesin galactoside by whole cells of β -galactosidase-containing *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **2013**, *23*, 826-832.
369. Yan, L. Q.; Li, N.; Zong, M. H., First enzymatic galactosylation of acyclic nucleoside drugs by β -galactosidase: Synthesis of water-soluble β -D-galactosidic prodrugs. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **2014**, *19*, 586-591.
370. Kim, G. E.; Lee, J. H.; Jung, S. H.; Seo, E. S.; Jin, S. D.; Kim, G. J.; Cha, J.; Kim, E. J.; Park, K. D.; Kim, D., Enzymatic synthesis and characterization of hydroquinone galactoside using *Kluyveromyces lactis* lactase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 9492-9497.

BIOGRAFIJA

Milica Carević rođena je u Gornjem Milanovcu, gde je završila Osnovnu školu "Momčilo Nastasijević" i gimnaziju "Takovski ustanak". Studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2005/2006. godine. Diplomirala je na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju 30. 06. 2009. godine sa ocenom 10 na diplomskom radu i prosečnom ocenom u toku studija 9,43. U toku studija, četiri puta joj je dodeljena nagrada „Panta S. Tutundžić“ za postignut izuzetan uspeh. Primila je i priznanje Srpskog hemijskog društva za ukupan izuzetan uspeh u toku studiranja. U periodu od 14. avgusta do 17. novembra 2009. godine pohađala je IAESTE praksu na Institutu za industrijsko mlekarstvo (Santa Fe, Argentina). Po završetku redovnih studija, upisala je doktorske studije na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju (mentor dr Dejan Bezbradica, vanredni profesor).

Od 1.02.2011. godine Milica Carević je kao istraživač pripravnik zaposlena na projektu "Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti" ev. br. III 46010, koji finansira Ministarstvo nauke, prosvete i tehnološkog razvoja Republike Srbije. U zvanje istraživač saradnik izabrana je u februaru 2013. godine. Koautor je 13 (trinaest) radova u međunarodnim časopisima (osam M21, jedan M22 i četiri M23) i 11 (jedanaest) saopštenja na domaćim i međunarodnim skupovima (šest M34, četiri M63 i jedan M64). Od septembra 2013. godine angažovana je u nastavi na studijskom programu Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija na labaratorijskim vežbama iz predmeta Biotehnološki praktikum 1.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Милица Царевик

број индекса 4004/2009

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Производња и имобилизација микробних β -галактозидаза
за примену у трансгалактозилационим реакцијама

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

Потпис докторанда

У Београду, 22.06.2016.

М. Царевик

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милица Царевит

Број индекса 4004/2009

Студијски програм Биохемијско инжењерство и биотехнологија

Наслов рада Производња и имобилизација микробних β -галактозидаза

Ментор Проф. др Дејан Безбрадица
за примену у трансгалактозилационим реакцијама

Потписани/а Милица Царевит

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 22.06.2016

М. Царевит

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Производња и имобилизација микробних β -галактозидаза
за примену у трансгалактозилационим реакцијама

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 22.06.2016.

М. Царевић