



UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET



Radoslava N. Pravić

**INTENZIFIKACIJA PROCESA KONTINUALNE
PROIZVODNJE PREBIOTSKIH
OLIGOSAHARIDA**

doktorska disertacija

Beograd, 2024



UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND
METALLURGY



Radoslava N. Pravić

**INTENSIFICATION OF THE CONTINUOUS
PREBIOTIC OLIGOSACCHARIDE
PRODUCTION PROCESS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024

Mentor kandidata

Dr Nikola Nikačević, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

ČLANOVI KOMISIJE ZA PREGLED, OCENU I ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

Dr Branislav Todić, docent,
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

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

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

Dr Mihal Đuriš, viši naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Institut od nacionalnog značaja
za Republiku Srbiju, Beograd

DATUM ODBRANE DOKTORSKE DISERTACIJE

Ova doktorska disertacija urađena je u okviru istraživanja predloženih u projektu IDEJE (broj 7750109) pod nazivom "Prebiotici za funkcionalnu hranu i bioaktivnu kozmetiku proizvedeni u intenziviranim enzimskim procesima", (PrIntPrEnzy), koji finansira Fond za nauku Republike Srbije u periodu od 2022. do 2025. godine, kao i u okviru Horizon projekta (ID 101060130) pod nazivom „Twining za intenzivirane enzimске procese za proizvodnju funkcionalne hrane koja sadrži prebiotike i bioaktivne kozmetičke proizvode - TwinPrebioEnz”, u periodu od 2021. do 2027. godine.

Eksperimentalni deo rada ove doktorske disertacije izveden je u laboratorijama za Hemijsko inženjersvo i Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Zahvalnica

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru, dr Nikoli Nikačeviću, redovnom profesoru Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, koji mi je pružio priliku da budem deo njegovog istraživačkog tima. Svojim korisnim savetima, znanjem, stručnošću, velikom podrškom i angažovanjem omogućio je da ova doktorska disertacija bude zaokružena celina.

Želela bih posebno da se zahvalim dr Branislavu Todiću, docentu Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, koji je nesebično delio svoja znanja sa mnom, uvek bio spreman da pomogne i da pruži iskrenu podršku. Veliko hvala na stručnim primedbama, pomoći pri pisanju naučnih radova i savetima u toku istraživanja.

Veliko hvala dr Dejanu Bezbradici, redovnom profesoru Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, koji mi je omogućio da kroz rad na projektu nastane ova doktorska disertacija. Hvala za korisne savete i ideje kako tokom eksperimentalnog rada, tako i tokom tumačenja rezultata.

Dr Milici Simović, višem naučnom saradniku Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, zahvaljujem na vremenu i naporu koji je nesebično izdvojila kako bi se eksperimentalni deo realizovao, kao i korisnim savetima prilikom pisanja naučnih radova.

Dr Mihalu Đurišu, višem naučnom saradniku Univerziteta u Beogradu, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, zahvaljujem se na učešću u Komisiji za pregled, ocenu i odbranu doktorske disertacije.

Dr Katarini Banjanac, višem naučnom saradniku Univerziteta u Beogradu, Inovacioni centar Tehnološko-metalurškog fakulteta i Milici Veljković, istraživaču saradniku Univerziteta u Beogradu, Inovacioni centar Tehnološko-metalurškog fakulteta, hvala na pomoći prilikom izrade eksperimenata, kao i prilikom analize uzoraka na HPLC-u.

Iskreno se zahvaljujem doktorandu Aleksandri, kao i diplomcima i mastercima Tamari, Đorđu, Cristhianu, Pavlu, Marti, Mini i Martinu koji su pomogli u izradi eksperimentalnog dela i doprineli da rad u laboratoriji bude zanimljiv i manje naporan.

Mojim dragim kolegicama i drugaricama Verici, Bojani, Radi, Neni, Dani, Ankici i Radi hvala na podršci i savetima tokom svih ovih godina, a posebno hvala na iskrenom prijateljstvu.

Svim mojim kolegama i saradnicima veliko hvala zato što ste bili tu da se zajedno radujemo, što ste imali odgovore na sva moja pitanja i što ste uvek bili spremni da pomognete i da me posavetujete.

Mojoj porodici, suprugu Iliji i deci Borisu i Nataliji želim da se zahvalim za bezrezervnu podršku, razumevanje, ljubav, brižnost i ohrabrenja. Svi izazovi i problemi su bili lako rešivi uz njih. Beskrajno hvala za sve što ste učinili za mene!

INTENZIFIKACIJA PROCESA KONTINUALNE PROIZVODNJE PREBIOTSKIH OLIGOSAHARIDA

Sažetak

Predmet ove teze je intenzifikacija procesa proizvodnje prebiotika i u radu je dokazano da se enzimska sinteza prebiotskih oligosaharida može prevesti sa šaržnog na kontinualni proces, uz povećanje produktivnosti.

U radu je predložen novi mehanistički kinetički model za sintezu galakto-oligosaharida (GOS) sa β -galaktozidazom iz *Aspergillus oryzae*. Eksperimenti su izvedeni u šaržnom laboratorijskom sistemu. Ispitano je nekoliko kinetičkih modela sa različitim reakcionim mehanizmima, koji pokrivaju širok opseg početnih koncentracija laktoze (200-400 g/l) i enzima (0,5-2 mg/ml). Kinetički parametri su određeni istovremeno za sve eksperimentalne podatke korišćenjem hibridnog genetskog algoritma. Izvršena je detaljna analiza uticaja parametara procesa na koncentracije laktoze i GOS. Predloženi model je pokazao veoma dobro kvantitativno slaganje sa eksperimentalnim rezultatima, sa srednjom greškom od 9,34 %. Što je još važnije, kvalitativni trendovi promene koncentracije laktoze i proizvoda (glukoze, galaktore i GOS-a) u vremenu se odlično predviđaju, posebno ako se uzme u obzir da su koncentracije enzima i laktoze varirane u širem opsegu nego što je do sada objavljeno u literaturi. Takođe, analiza između dve uporedne reakcije, transglikozilacije i hidrolize laktoze, potvrdila je pozitivan efekat povećanja koncentracije laktoze na proizvodnju GOS. S druge strane, koncentracija enzima je odredila reakciono vreme u kome se postiže maksimalna koncentracija GOS.

U ovom radu je zatim razvijen novi mehanistički kinetički model enzimski katalizovane sinteze frukto-oligosaharida (FOS), koji pripadaju grupi etabliranih prebiotika, kao i GOS. Korišćena je komercijalna mešavina enzima Pectinex® Ultra SP¹L dobijena od *Aspergillus aculeatus*. Različite početne koncentracije enzima (1-5 zap%) i koncentracije saharoze (400–600 g/l) su korišćene u eksperimentima, a rezultati su korišćeni za određivanje kinetičkih konstanti. Ispitano je više kinetičkih modela (analogan pristup kao za GOS), a usvojen je model koji je dao srednju grešku od 13,34 % i dobro kvalitativno slaganje promena koncentracija komponenti sa vremenom. Pokazalo se, kao i kod GOS, da početna koncentracija supstrata, u ovom slučaju saharoze, značajno utiče na maksimalno postignutu koncentraciju FOS, dok je koncentracija enzima odredila vreme u kome se dostiže maksimum FOS.

U trećem delu ove teze je predložen inovativni spiralni reaktor sa pregradama (SORP) i oscilatornim tokom za kontinualnu proizvodnju prebiotika. Prikazan je dizajn SORP, prototip (dužine 4 m, i prečnika 10 mm) izrađen pomoću 3D štampe, u kome su izvedeni prvo eksperimenti za ispitavanje strujanja, a zatim sa enzimskom reakcijom. Na primeru sinteze GOS sa slobodnim enzimom je pokazano da se kontinualna proizvodnja može uspešno ostvariti, uz visoku koncentraciju željenog proizvoda. Takođe je pokazano da se sa povećanjem protoka kroz SORP, mešanje intenzivira, a vreme zadržavanja skraćuje, pa se stacionarne koncentracije laktoze i proizvoda dostižu za vreme koje odgovara dvostrukoj vrednosti srednjeg vremena zadržavanja.

Nezavisni eksperimenti sa obeleženom supstancom su izvedeni kako bi se kvantifikovalo mešanje u SORP. Rezultati su pokazali da je strujanje tečnosti u SORP relativno blisko klipnom, uz određena odstupanja koja zavise od protoka oscilatornog, kao i normalnog (nesocilatornog) toka. U radu je korišćen model kaskade idealno izmešanih sudova u nizu, koji dobro opisuje strujanje, uz

adekvatno određen broj sudova N . Predložena je i nova bezdimenziona korelacija koja daje vezu između broja sudova N i Rejnoldsovih brojeva oscilatornog (Re_o) i normalnog toka (Re_n).

U eksperimentima u SORP je ispitana i mogućnost korišćenja recikla, kako bi se intenzifikovalo mešanje i obezbedila velika vremena zadržavanja, što je povoljno za spore biohemijske reakcije. Međutim, pokazano je da recikl nije neophodan, u slučaju da je dužina reaktora 4 m. U eksperimentima je analizirano i ponašanje enzima u SORP, koji se u toku reakcije ne troši. Rezultati eksperimenata su pokazali razliku unete i izlazne mase enzima, odnosno da se određena, a ne mala, količina enzima zadržava u reaktoru.

Numeričkom optimizacijom su dobijeni optimalni protoci i ulazne koncentracije enzima. Korišćene su dve funkcije cilja, jedna koja daje maksimalnu proizvodnost GOS u datoj zapremini u odnosu na konverziju laktoze, i druga koja daje maksimalnu proizvodnost GOS, ali u odnosu na ulaznu koncentraciju enzima. U oba slučaja optimizacija je potvrdila da nije potrebno uvoditi recikl, kao i da treba koristiti maksimalno moguću koncentraciju laktoze. Za aktivniji enzim optimizacija je dala veliku produktivnost GOS od 17 mmol/min u kratkom vremenu zadržavanja od samo 2,4 min i uz upotrebu maksimalne koncentracije enzima. Druga funkcija cilja je dala manju produktivnost GOS od oko 9 mmol/min u dužem vremenu zadržavanja od oko 4,3 min, ali uz uštedu enzima, jer je koncentracija duplo manja, a potrošnja (protok) enzima za 73,2 % manja u odnosu na prvu funkciju cilja.

U ovoj tezi je pokazano da je prelazak sa šaržnog na kontinualni način proizvodnje prebiotika pokazao bolje rezultate u vrednostima konverzije laktoze, selektivnosti i proizvodnosti. SORP se pokazao kao atraktivno rešenje za intenzifikaciju procesa proizvodnje etabliranih prebiotika.

Ključne reči: prebiotici, enzimaska reakcija, kinetički model, intenzifikacija procesa, optimizacija procesa, spiralni reaktor sa pregradama i oscilatornim tokom, model neidealnog strujanja

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Hemijsko inženjerstvo

UDK broj:

INTENSIFICATION OF THE CONTINUOUS PREBIOTIC OLIGOSACCHARIDE PRODUCTION PROCESS

SUMMARY

The subject of this dissertation is the intensification of the prebiotic production process, and it has been demonstrated that batch-to-continuous prebiotic oligosaccharide enzymatic production can be achieved with a significant increase in productivity.

In this thesis, a new mechanistic model for the synthesis of galacto-oligosaccharides (GOS) with β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* is proposed. The experiments were performed in a laboratory batch system. Several kinetic models with different reaction mechanisms were tested, covering a wide range of initial concentrations of lactose (200–400 g/l) and enzyme (0.5–2 mg/ml). Kinetic parameters were estimated simultaneously for all experimental data using a hybrid genetic algorithm. A detailed analysis of the influence of process parameters on lactose and GOS concentrations was performed. The proposed model showed a very good quantitative agreement with the experimental data, with a mean error of 9.34 %. More importantly, the qualitative trends of change in lactose and product concentration (glucose, galactose and GOS) over time are excellently predicted, especially considering enzyme and lactose concentrations over a wider range than previously reported in the literature. Also, the analysis between two comparative reactions, transglycosylation and lactose hydrolysis, confirmed the positive effect of increasing lactose concentration on GOS production. On the other hand, the enzyme concentration determined the reaction time at which the maximum GOS concentration was reached.

Then, a new mechanistic model of enzyme-catalyzed synthesis of fructo-oligosaccharides (FOS), which belong to the group of established prebiotics as well as GOS, was also developed. A commercial Pectinex® Ultra SPL enzyme mixture obtained from *Aspergillus aculeatus* was used. Different initial enzyme concentrations (1–5 vol.%) and sucrose concentrations (400–600 g/l) were used in the experiments, and the kinetic constants were determined from the results. Several kinetic models were examined (analogous approach as for GOS), and the most favorable model was adopted, which gave a mean error of 13.34 % and a good qualitative agreement of changes in component concentrations with time. Similar to GOS, it was demonstrated that the maximum FOS concentration achieved is greatly influenced by the initial concentration of the substrate—in this case, sucrose—while the enzyme concentration determines the reaction time at which the maximum FOS is reached.

In the third part of this thesis, an innovative spiral reactor with baffles and oscillatory flow (SORP) is proposed for the continuous production of prebiotics. The SORP design is presented using a prototype (4 m long and 10 mm in diameter) made using 3D printing, in which experiments were performed first to test the flow, and then with the enzymatic reaction. Using the example of GOS synthesis with a free enzyme, it was shown that continuous production can be successfully achieved with a high concentration of the desired product. Additionally, it was demonstrated that the stationary concentrations of lactose and product are reached in a time corresponding to double the mean residence time when the flow rate through the SORP increases, intensifying mixing and reducing retention time.

Independent tracer experiments were performed to confirm the well-quantified mixing in SORP. The results showed that flow in SORP is relatively close to plug flow, with some deviations depending on oscillatory flow as well as normal (non-oscillatory) flow. In the study, it was shown

that the cascade model of ideally mixed tanks-in-series describes the flow behavior well, with an adequately determined number of tanks in series N . A new dimensionless correlation was also proposed that gives a connection between the virtual number of tanks in series N and the oscillatory Reynolds numbers (Re_o) and normal flowrate (Re_n).

In the SORP experiments, the possibility of using recycle was examined in order to intensify the mixing and ensure long retention times, which is favorable for slow biochemical reactions. However, it was shown that recycling is not necessary if the length of the reactor is 4 m. The experiments also analyzed the behavior of the enzyme in SORP, which is not consumed during the reaction. The results of the experiments showed a difference between the input and output mass of the enzyme, indicating that a significant amount of enzyme is held in the reactor.

Enzyme initial concentrations and optimal flows were obtained using numerical optimization. Two objective functions were used: one that gives the maximum GOS productivity in a given volume versus lactose conversion, and another that gives the maximum GOS productivity but versus initial enzyme concentration. In both cases, the optimization confirmed that it is not necessary to introduce recycling and that the maximum possible concentration of lactose should be used. For the more active enzyme, the optimization gave a high GOS productivity of 17 mmol/min with a short retention time of only 2.4 min and using the maximum enzyme concentration. The second objective function gave a lower productivity of GOS of about 9 mmol/min in a longer retention time of about 4.3 min, but with a saving of enzymes because the concentration is twice as low and the consumption (flow) of enzymes is 73.2 % lower compared to the first objective function.

The shift from batch to continuous prebiotic production provided better lactose conversion, selectivity, and productivity values, as demonstrated in this dissertation. SORP proved to be an attractive solution for the intensification of the established prebiotic production process.

Keywords: prebiotics, enzymatic reaction, kinetic model, process intensification, process optimization, spiral reactor with baffles and oscillatory flow, model of non-ideal flow

Scientific field: Technological Engineering

Scientific subfield: Chemical Engineering

UDC number:

Sadržaj

1. Pregled dosadašnjih istraživanja	1
1.1. Prebiotici	1
1.1.1. Galakto-oligosaharidi (GOS).....	3
1.1.1.1. Struktura GOS-a.....	3
1.1.1.2. Sinteza GOS-a.....	3
1.1.1.3. Pregled kinetičkih modela sinteze GOS-a	4
1.1.2. Frukto-oligosaharidi (FOS)	8
1.1.2.1. Struktura FOS-a	8
1.1.2.2. Sinteza FOS-a	8
1.1.2.3. Pregled kinetičkih modela sinteze FOS-a	9
1.2. Prelazak sa šaržnog na kontinualni način proizvodnje prebiotika	13
1.2.1. Reaktori sa oscilatornim tokom (ROT) fluida	16
1.2.2. Spiralni reaktori (SR).....	19
1.3. Upotreba matematičkog modelovanja i optimizacije u razvoju procesa sinteze prebiotika ...	22
2. Kinetički modeli i estimacija kinetičkih parametara sinteze prebiotika	24
2.1. Galakto-oligosaharidi (GOS)	24
2.1.1. Eksperimenti sinteze GOS-a.....	24
2.1.2. Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC).....	25
2.1.3. Kinetički modeli sinteze GOS-a	26
2.1.4. Estimacija parametara modela	29
2.1.5. Odabir najboljeg kinetičkog modela enzimske sinteze GOS-a	30
2.1.6. Analiza brzine sinteze GOS i brzine hidrolize	37
2.2. Frukto-oligosaharidi (FOS)	40
2.2.1. Eksperimentalna sinteza FOS-a	40
2.2.2. Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC).....	41
2.2.3. Kinetički modeli sinteze FOS-a.....	41
2.2.4. Estimacija parametara modela	44
2.2.5. Odabir najboljeg kinetičkog modela enzimske sinteze FOS-a	44
2.2.6. Analiza brzine sinteze FOS i brzine hidrolize	54
3. Dizajn intenzifikovanog reaktora za kontinualnu proizvodnju prebiotika i eksperimentalni rezultati	57
3.1. Karakteristike i prednosti novog spiralnog oscilatornog reaktora sa pregradama i oscilacijama toka	57
3.1.1. Prednosti upotrebe SORP za sintezu prebiotika	59

3.2. 3D štampanje spiralnog oscilatornog reaktora sa pregradama	59
3.3. Eksperimentalni uslovi za kontinualnu proizvodnju prebiotika.....	63
3.3.1. Spajanje i puštanje sistema u rad	63
3.3.2. Eksperimentalni uslovi i postupak izvođenja eksperimenata	64
3.3.3. Analitičko određivanje koncentracije jedinjenja	66
3.4. Eksperimentalni rezultati kontinualne proizvodnje GOS.....	67
3.5. Ispitivanje aktivnosti enzima u šaržnom reaktoru	79
3.6. Poređenje rezultata u kontinualnom i šaržnom reaktoru	86
4. Modelovanje i optimizacija sinteze prebiotika u kontinualnim reaktorima	91
4.1. Matematički model spiralnog reaktora sa pregradama - kaskada idealno izmešanih sudova .	91
4.1.1. Jednačine materijalnog bilansa za svaki protočni reaktor sa idealnim mešanjem.....	92
4.1.2. Proračun zapremine reaktora	92
4.1.3. Proračun protoka i vremena zadržavanja.....	93
4.2. Modelovanje i optimizacija reaktorskog sistema u softverskom paketu gPROMS	94
4.2.2. Način izvođenja optimizacija sistema u softverskom paketu gPROMS	95
4.3. Određivanje korelacije koja definiše neidealno strujanje u spiralnom reaktoru sa pregradama	98
4.3.1. Eksperimenti sa obeleženom supstancom	98
4.3.2. Estimacija parametara korelacije za broj sudova u kaskadi N	101
4.4. Korekcija kinetike za različite aktivnosti enzima i validacija modela (enzim E1 i E2).....	103
4.5. Dinamičke simulacije reaktora za sintezu prebiotika.....	108
4.6. Numerička optimizacija spiralnog reaktora sa pregradama za sintezu prebiotika	111
5. ZAKLJUČAK.....	114
LITERATURA.....	117
Prilog	124
Biografski podaci	126
Sadržaj slika	128
Sadržaj tabela	132
Изјава о ауторству	133
Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада	134
Изјава о коришћењу	135
Оцена извештаја о провери оригиналности докторске дисертације	137

1. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

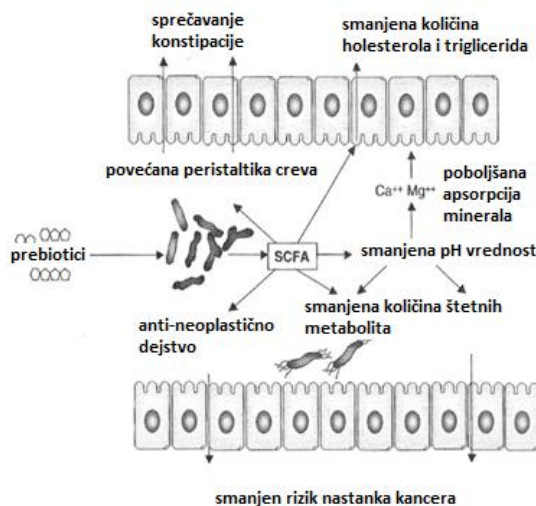
1.1. Prebiotici

U čovekovom digestivnom traktu se nalaze brojne vrste mikroorganizama koje imaju izuzetno važnu ulogu u sveopštem zdravlju čoveka. Prema nekim istraživanjima, po jednom gramu creva ima oko 10^{10} - 10^{12} mikroorganizama, od kojih su većina anaerobni i žive u debelom crevu (Louis i sar. 2006). Neophodni izvor energije za njihovo preživljavanje i rast predstavljaju hranljiva jedinjenja koja čovek unosi ishranom, pri čemu su najznačajniji nesvarljivi ugljeni hidrati koji se nazivaju prebiotici.

Koncept prebiotika je uveden prvi put 1995. godine zbog važnosti ljudskog mikrobioma za sveukupno zdravlje. Ova jedinjenja su definisana kao: „nesvarljivi sastojci hrane koji blagotvorno utiču na domaćina selektivno stimulišući rast i/ili aktivnost jedne ili ograničenog broja bakterija koje već žive u crevima”. Ova definicija je ostala nepromenjena više od 15 godina, ali se zatim menjala više puta. Godine 2017. prebiotike je redefinisalo Međunarodno naučno udruženje za probiotike i prebiotike (*International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics - ISAPP*) kao: „supstrati koji se selektivno koriste od strane mikroorganizama i koji doprinose boljem zdravlju“.

Međutim, savremena istraživanja pokazuju da postoje veoma složene interakcije između prebiotika i organizma koji im je domaćin, tako da će se definicija prebiotika verovatno još menjati u budućnosti. Jedinjenja koja su klasifikovana kao prebiotici imaju sledeće osobine: ne podležu hidrolizi pod dejstvom enzima sisara, nisu osetljiva na pH u digestivnom traktu, ne mogu biti apsorbovana u organizam varenjem, bakterije u crevnom traktu mogu da ih metabolišu i mogu stimulisati rast i/ili aktivnost korisnih crevnih bakterija (Markowiak i sar. 2017.)

Korisni mikroorganizmi crevne mikrobiote dobijaju energiju razgrađivanjem veza u molekulima prebiotika pri čemu nastaju karboksilne kiseline kratkog lanca, kao što su mlečna, buterna i propionska kiselina. Ove kiseline doprinose sveopštem zdravlju čoveka tako što snižavaju pH u crevima i na taj način poboljšavaju apsorpciju nutritijenata, kao i jona kalcijuma (Ca^{2+}) i magnezijuma (Mg^{2+}) što je veoma bitno kod ljudi koji boluju od osteroporoze. Takođe, prebiotici imaju pozitivan uticaj na razne upalne procese u organizmu, kao i na sprečavanje nastanka različitih vrsta kancera, a pogotovo raka debelog creva. Mehanizmi delovanja još uvek nisu dovoljno istraženi, ali je poznato da buterna kiselina utiče na razvoj zdravih ćelija dok sprečava razvoj modifikovanih ćelija i da potpomaže apoptozu ćelija tumora, a sprečava apoptozu zdravih ćelija. Produkt fermentacije zavisi od strukture prebiotika i od sastava crevne mikrobiote. Jedan od produkata fermentacije prebiotika je peptidoglikan koji stimuliše imunski sistem u borbi protiv različitih vrsta patogenih mikroorgaizama. Na slici 1.1 su prikazani neki od pozitivnih uticaja prebiotika (Davani-Davari i sar. 2019.).



Slika 1.1. Načini delovanja prebiotika (adaptirano iz Crittenden i Playne 2006.)

Najpoznatija jedinjenja sa prebiotskim svojstvima su galakto-oligosaharidi (GOS) i frukto-oligosaharidi (FOS). Ova jedinjenja imaju malu kalorijsku vrednost, nizak glikemijski indeks, nisu kariogena i sprečavaju konstipaciju (Brownawell i sar. 2012.).

Prebiotici su prirodno prisutni u različitim biljkama kao što su špargla, šećerna repa, beli luk, crni luk, artičoka, banana, paradajz, cikorija, soja, grašak, pasulj i mnoge druge. Međutim koncentracija prebiotika u ovim biljkama je relativno mala tako da danas postoji praksa industrijske proizvodnje prebiotika i dodavanja u različite prehrambene proizvode. Najčešće se dodaju u različite mlečne proizvode (mleko, mleko u prahu i sladoled), pića (voćni sokovi, čaj, kafa, kakao i neka alkoholna pića), džemove i veštačko mleko za bebe (Ibrahim 2008).

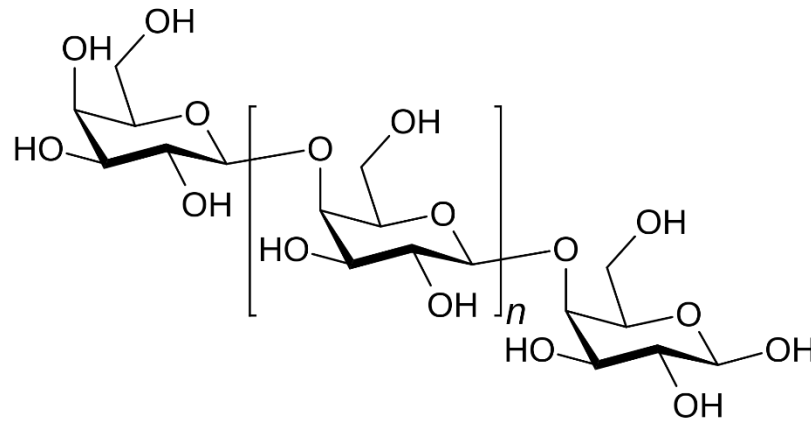
U poslednje vreme postoji težnja da se proizvodi hrana koja, osim svoje nutritivne vrednosti, blagotvorno deluje na ljudsko zdravlje. Termin funkcionalna hrana je prvi put uveden za hranu koja se koristi u određene zdravstvene svrhe. Prema Evropskoj komisiji za usaglašeno delovanje nauke o funkcionalnoj hrani u Evropi (*European Commission for concerted action Functional Food Science in Europe – FUFLOSE*) „hrana se može klasifikovati kao funkcionalna ako je pokazano da ima blagotvorno dejstvo na jednu ili više ciljnih funkcija u organizmu, izvan nutritivnih efekata, na način koji je relevantan bilo za poboljšanje zdravstvenog stanja ili za smanjenje rizika od bolesti”. Takođe je naglašeno da funkcionalna hrana sve navedene osobine ispoljava u količinama koje se normalnom ishranom mogu uneti, kao i da ne sme biti u obliku pilula ili kapsula. Jedan od načina za proizvodnju funkcionalne hrane je dodavanje prebiotika u prehrambene proizvode (Michel i sar. 2016.). Prebiotici imaju manju kalorijsku vrednost od tradicionalnih šećera, pa je zato njihov veliki značaj kao prirodnih zaslađivača. Ovo je posledica glikozidnih veza u lancima prebiotika koje ne podležu razgradnji u digestivnom traktu čoveka pa prebiotici ne mogu biti korišćeni kao izvor energije. Zbog navedenih povoljnih osobina, FOS i GOS se često dodaju kao zaslađivači u proizvode namenjene dijabetičarima, ali se, u cilju smanjenja kalorijske vrednosti, dodaju i u druge namirnice kao što su slatkiši, jogurt, sokovi i pekarski proizvodi.

Prebiotici utiču na metabolizam lipida smanjujući količinu holesterola i triglicerida u krvi što utiče na smanjenje rizika od gojaznosti i dijabetesa (Silk i sar. 2009, Vulevic i sar. 2013). Prebiotici su izuzetno stabilni na niskim temperaturama pa se dodaju sladoledu u cilju sprečavanja pojave kristala, a mogu se koristiti i kao emulgatori u proizvodnji margarina. Pored toga, ova jedinjenja se mogu dodavati konvencionalnim prehrambenim proizvodima u cilju povećanja količine vlakana, pa su česti sastojci majoneza i nemasnog sira. Ishrana bogata vlaknima je bitna za čuvanje crevne mikroflore, kao i za smanjenje vremena boravka hrane u digestivnom traktu i smanjenje rizika od oboljenja organa za varenje (Mussatto i sar. 2007, Macfarlane i sar. 2008, Sharma i sar. 2012.).

1.1.1. Galakto-oligosaharidi (GOS)

1.1.1.1. Struktura GOS-a

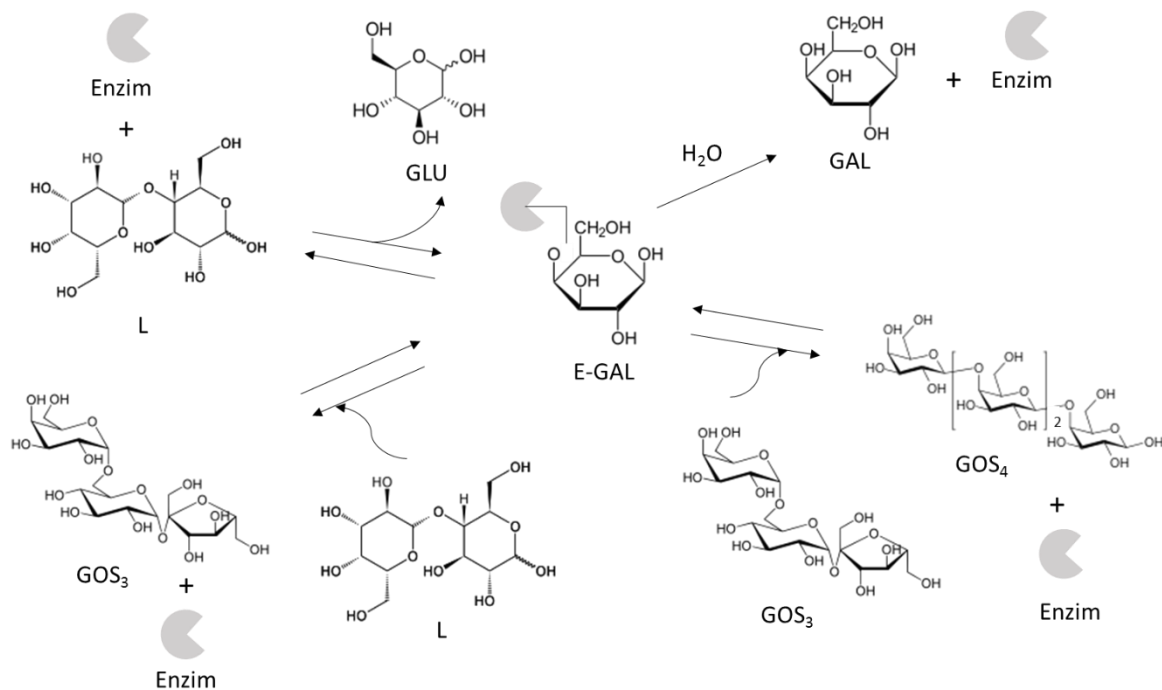
Galakto-oligosaharidi (GOS) su prirodni, funkcionalni oligosaharidi sastavljeni od jednog do sedam molekula galaktoze vezanih za terminalni molekul galaktoze ili glukoze (Gao i sar. 2019, Tzortzis i sar. 2009.). Molekuli GOS su prirodno prisutni u biljkama ili se mogu dobiti enzimskom sintezom iz laktoze. Tip veze između monomera zavisi od načina nastanka GOS, pri čemu GOS dobijeni iz biljaka odlikuje α -glikozidna veza, dok GOS nastale iz laktoze odlikuje β -glikozidna veza (Martins i sar. 2019). Struktura molekula GOS je prikazana na slici 1.2. Vrlo su česte $\beta(1\rightarrow4)$ i $\beta(1\rightarrow6)$ glikozidne veze, dok su $\beta(1\rightarrow2)$ i $\beta(1\rightarrow3)$ glikozidne veze nešto ređe. Tip veze između monomera zavisi od mehanizma sinteze.



Slika 1.2. Struktura GOS-a

1.1.1.2. Sinteza GOS-a

Sinteza GOS je najčešće enzimski katalizovana reakcija u kojoj se raskida veza između glukoze i galaktoze u molekulu laktoze i dolazi do transfera molekula galaktoze na drugi molekul laktoze i nastanka molekula trisaharida GOS₃. Nakon toga se novi molekuli galaktoze mogu dodati na već formirane molekule GOS, pri čemu u svakom stupnju nastaju sve duži molekuli GOS. Paralelno sa reakcijama transgalaktozilacije odvija se i hidroliza, kao što je prikazano na slici 1.3.



Slika 1.3. Pojednostavljen mehanizam sinteze GOS

Enzimi koji katalizuju sintezu GOS pripadaju grupi β -galaktozidaza (Albayrak i sar. 2002, Martínez-Villaluenga i sar. 2008, Guerrero i sar. 2011, Vera i sar. 2011, Adlercreutz 2017.). Generalno, β -galaktozidaza je enzim koji katalizuje hidrolizu terminalnih β -D-galaktozidnih ostataka u različitim β -D-galaktozidima. Ovaj enzim se u industriji koristi za hidrolizu laktoze na molekule glukoze i galaktoze, što je naročito bitno za smanjenje koncentracije laktoze za ljude koji su netolerantni.

Osim za hidrolizu, β -galaktozidaza se može koristiti za reakciju transgalaktozilacije. Ovaj proces podrazumeva sintezu lanaca GOS prenosom molekula galaktoze na hidroksilnu grupu jedinjenja koje je akceptor, umesto na molekul vode. Ponavljanjem ovog postupka više puta nastaju novi GOS koji su duži za jednu galaktoznu jedinicu od molekula akceptora (Carević 2016.).

Osim vrste enzima, sinteza GOS-a zavisi i od različitih parametara reakcije. U literaturi se navodi da je optimizacija različitih parametara, kao što su početna koncentracija laktoze i enzima, vreme reakcije, pH i temperatura, ključna za poboljšanje sinteze GOS (Palai i sar. 2012, Palai i sar. 2013, Vera i sar. 2011, Gonzalez-Catano i sar. 2017, Pham 2015, Di Serio i sar. 2003, Jenab i sar. 2018, Mueller i sar. 2018, González-Delgado i sar. 2016.). Prema istraživanjima, pokazalo se da je uticaj temperature i pH, u radnom opsegu enzima, neznan u poređenju sa uticajem početne koncentracije supstrata i koncentracije enzima na proizvodnju GOS-a (Vera i sar. 2011, Jenab i sar. 2018, Mueller i sar. 2018, Boon i sar. 2000.). Zato je za projektovanje i optimizaciju procesa biohemijskih reaktora potrebno detaljno razumevanje kinetike reakcije i razvoj modela koji bi odgovarali eksperimentalnim podacima, dobijenim u širokom opsegu uslova.

1.1.1.3. Pregled kinetičkih modela sinteze GOS-a

Bilo je brojnih pokušaja da se opiše reakcioni mehanizam sinteze GOS-a i u svim radovima je istaknuta njegova složenost zbog postojanja nekoliko paralelnih reakcija i istovremenih procesa transgalaktozilacije i hidrolize laktoze (Rios-Solis i sar. 2015, Oberlintner i sar. 2021, Cajnko i sar. 2021, Rojahn i sar. 2022.). Većina kinetičkih modela koji se mogu naći u literaturi zasnovani su na Mihaelis – Mentenovom pristupu. Predloženi modeli se razlikuju po stepenu složenosti u pogledu

sastava GOS-a, broja reakcionih koraka i konstanti. Sledeći paragraf će pokazati neke od modela koji se mogu naći u literaturi, a koji opisuju proizvodnju GOS-a iz laktoze pomoću enzima β -galaktozidaze.

Modeli iz literature su zasnovani na reakcionom mehanizmu koji opisuje istovremenu sintezu GOS-a i hidrolizu laktoze sa centralnom ulogom kompleksa enzim- galaktoza (EGAL). Ovaj kompleks se zatim može razgraditi i formirati galaktozu u hidrolizi ili može reagovati sa različitim šećerima i formirati GOS. Predloženi modeli se razlikuju po stepenu složenosti u pogledu sastava GOS-a, broja reakcionih koraka i konstanti ili po pojavi inhibicije proizvoda. Tako su Zhou i sar. 2003. predložili reakcioni mehanizam koji opisuje istovremenu sintezu GOS-a i hidrolizu laktoze kao i inhibiciju proizvoda (tabela 1.1). Kim i sar. 2004. su predložili mehanizam kojim se laktoza ponaša i kao supstrat i kao akceptor glikozila. Galaktoza se vezuje za slobodni enzim i gradi kompleks galaktoza-enzim koji je dalje uključen u reakciju transgalaktozilacije sa glukozom ili laktozom kao akceptorom. Na osnovu mehanizma reakcije koji su predložili Kim i sar. 2004, Palai i sar. 2012. su razvili model koji uzima u obzir sve kompetitivne reakcije (inhibiciju glukozom i hidrolizu GOS) i uključuje odvojene formacije glukoze i galaktoze. Model sa šest koraka i jedanaest parametara takođe predlaže disocijaciju kompleksa enzim-laktoza u kompleks enzim-galaktoza kao reverzibilne reakcije. Pham 2015. je predložio mehanizam koji uključuje kompetitivnu inhibiciju proizvoda galaktozom i enzimom reakcije deaktivacije (reakcija prvog reda). Prema ovom mehanizmu reakcije, laktoza deluje i kao supstrat i kao akceptor, enzim se inhibira galaktozom, dok se glukoza ne smatra akceptorom i njen efekat na kinetiku reakcije se smatra zanemarljivim. Nedavno su Cinar i sar. 2020. prilagodili kinetički model koji je korišćen u radu Kim i sar. i modifikovali ga zanemarivanjem nastajanja alolaktoze i dodavanjem inhibicije galaktoze i glukoze u model. Modifikovani model uključuje reakcioni mehanizam koji čini šest koraka i 11 kinetičkih konstanti. Kinetika uočena u istraživanjima Gonzales-Catano i sar. 2017. razlikuje se od izveštaja u radu Kim i sar. 2004. koji su prikazali nastajanje GOS do trisaharida, dok je u ovom istraživanju imobilisani enzim mogao da sintetiše proizvode do tetrasaharida. Model predstavljen u radu Jenab i sar. 2018. je uključivao i transgalaktozilaciju i hidrolizu laktoze, kao i nastajanje GOS, ali je omogućio modelu da predvidi formiranje GOS, hidrolizu laktoze i formiranje glukoze i galaktoze u svim uslovima.

Tabela 1.1. Mehanizmi reakcije sinteze GOS-a korišćeni u literaturi.

Literatura	Mehanizam reakcije	Jednačine modela
Zhou i sar. 2003.	$S + E \xrightleftharpoons{k_1, k_{-1}} ES \xrightarrow{k_2} EP + Q$ $EP \xrightleftharpoons{k_3, k_{-3}} E + P$ $S + EP \xrightleftharpoons{k_4, k_{-4}} ET \xrightleftharpoons{k_5, k_{-5}} E + T$	$\frac{dS}{dt} = \frac{-V_m[S]}{K_m \left(1 + \frac{[P]}{K_i} + \frac{[T]}{K_T} + [S] \right)}$
Kim i sar. 2004.	$S + E \xrightleftharpoons{k_1, k_{-1}} ES \xrightarrow{k_2} EP + Q$ $EP \xrightleftharpoons{k_3, k_{-3}} E + P$ $Q + EP \xrightleftharpoons{k_4, k_{-4}} E + D$ $S + EP \xrightleftharpoons{k_5, k_{-5}} E + T$	$\frac{d[E]}{dt} = k_{-1}[ES] - k_1[E][S] + \{k_3 + k_4[G] + k_5[S]\}[EP] - \{k_{-3}[P] + k_{-4}[D] + k_{-5}[T][E]\}$ $\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES]$ $\frac{d[EP]}{dt} = k_2[ES] + \{k_{-3}[P] + k_{-4}[D] + k_{-5}[T]\}[E] - \{k_3 + k_4[G] + k_5[S]\}[EP]$ $-\frac{d[S]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] + k_5[EP][S] - k_{-5}[T][E]$ $\frac{d[P]}{dt} = k_3[EP] - k_{-3}[E][P]$

		$\frac{d[D]}{dt} = k_4[EP][G] - k_{-4}[E][D]$ $\frac{d[T]}{dt} = k_5[EP][S] - k_{-5}[E][T]$ $\frac{d[G]}{dt} = k_2[ES] + k_{-4}[E][D] - k_4[EP][G]$
Palai i sar. 2012.	$S + E \xrightleftharpoons{k_1, k_{-1}} ES$ $ES \xrightleftharpoons{k_2, k_{-2}} EP + Q$ $EP \xrightleftharpoons{k_3, k_{-3}} E + P$ $S + EP \xrightleftharpoons{k_4, k_{-4}} EGOS$ $EGOS \xrightarrow{k_5} E + GOS$ $Q + E \xrightleftharpoons{k_6, k_{-6}} EQ$	nije prikazano u radu
Pham 2015.	$L + E \xrightleftharpoons{k_1, k_{-1}} EL \xrightarrow{k_{cat}} EGal + Glc$ $E + Gal \xrightleftharpoons{k_2, k_{-2}} EGal$ $E + EGal \xrightleftharpoons{k_3, k_{-3}} EGOS \xrightleftharpoons{k_4, k_{-4}} E + GOS$ $E \xrightarrow{k_d} Ed$	$\frac{d[L]}{dt} = -k_{-1}[E][L] + k_1[EL]$ $-k_3[EGal][L] + k_{-3}[EGOS]$ $\frac{d[Glc]}{dt} = k_{cat}[EL]$ $\frac{d[Gal]}{dt} = -k_2[E][Gal] + k_{-2}[EGal]$ $\frac{d[GOS]}{dt} = k_4[EGOS] - k_{-4}[E][GOS]$ $\frac{d[E]}{dt} = -k_1[E][L] + k_{-1}[EL]$ $+k_{-2}[EGal] - k_2[E][Gal] + k_4[EGOS]$ $-k_{-4}[E][GOS] - k_d[E]$ $\frac{d[EL]}{dt} = k_1[E][L] - k_{-1}[EL]$ $-k_{cat}[EL] - k_d[EL]$ $\frac{d[EGal]}{dt} = k_{cat}[EL] - k_{-2}[EGal]$ $+k_2[E][Gal] - k_3[EGal][L]$ $+k_{-3}[EGOS] - k_d[EGal]$ $\frac{d[EGOS]}{dt} = k_3[EGal][L] - k_{-3}[EGOS]$ $-k_4[EGOS] + k_{-4}[E][GOS] - k_d[EGOS]$
Cinar i sar. 2020.	$E + Lac \xrightleftharpoons{k_1, k_{-1}} E:Lac$ $E:Lac \xrightarrow{k_2} E:Gal + Glu$ $E:Gal \xrightleftharpoons{k_3, k_{-3}} E + Gal$ $E:Gal + Lac \xrightleftharpoons{k_4, k_{-4}} E + GOS$ $E + Glu \xrightleftharpoons{k_5, k_{-5}} E:IGlu$ $E + Gal \xrightleftharpoons{k_6, k_{-6}} E:IGal$	$\frac{d[Lac]}{dt} = -k_1[E][Lac] + k_{-1}[E:Lac]$ $-k_4[EGal][Lac] + k_{-4}[E][GOS]$ $\frac{d[E]}{dt} = -k_1[E][Lac] + k_{-1}[E:Lac]$ $+k_3[E:Gal] - k_{-3}[E][Gal]$ $+k_4[E:Gal][Lac]$ $-k_{-4}[E][GOS]$ $-k_5[E][Glu]$ $+k_{-5}[E:IGlu] - k_6[E][Gal]$ $+k_{-6}[E:IGal]$ $\frac{d[E:Gal]}{dt} = k_2[ELac] - k_3[E:Gal]$ $+k_{-3}[E][Gal] - k_4[E:Gal][Lac]$

		$+k_{-4}[E][GOS]$ $\frac{d[Glu]}{dt} = k_2[E:Lac] - k_5[E][Glu]$ $+ k_{-5}[E:IGlu]$ $\frac{d[Gal]}{dt}$ $= k_3[E:Gal] - k_{-3}[E][Gal] - k_6[E][Gal]$ $+ k_{-6}[E:IGal]$ $\frac{d[GOS]}{dt} = k_4[E:Gal][Lac] - k_{-4}[E][GOS]$ $\frac{d[ELac]}{dt} = k_1[E][Lac] - k_{-1}[E:Lac]$ $- k_2[E:Lac]$ $\frac{d[E:IGlu]}{dt} = k_5[E][Glu] + k_{-5}[E:IGlu]$ $\frac{d[E:IGal]}{dt} = k_6[E][Gal] - k_{-6}[E:IGal]$
Gonzales-Catano i sar. 2017.	$L + E \xrightleftharpoons[k_3, k_{-3}]{k_1, k_{-1}} EL \xrightarrow{k_2} EGal + Glu$ $EGal \xrightleftharpoons[k_4, k_{-4}]{k_3, k_{-3}} E + Gal$ $EGal + L \xrightleftharpoons[k_6, k_{-6}]{k_4, k_{-4}} E + G_3$ $EGal + Glu \xrightleftharpoons[k_8, k_{-8}]{k_5, k_{-5}} E + G_2$ $EGal + G_2 \xrightleftharpoons[k_9, k_{-9}]{k_6, k_{-6}} E + G_3$ $E + G_2 \xrightleftharpoons[k_9, k_{-9}]{k_7, k_{-7}} EG_3 \xrightarrow{k_8} E + G_2$ $+ Glu$ $EGal + G_3 \xrightleftharpoons[k_9, k_{-9}]{k_9, k_{-9}} E + G_4$	$\frac{d[E]}{dt} = k_{-1}[EL] - (k_1[L] + k_{-3}[Gal]$ $+ k_{-4}[G_3][E]$ $+ (k_3 + k_4[L])[EGal]$ $\frac{d[L]}{dt} = k_{-1}[EL] - (k_1[L] - k_{-4}[G_3])[E]$ $- k_4[EGal][L]$ $\frac{d[Glu]}{dt} = k_2[EL]$ $\frac{d[Gal]}{dt} = k_3[EGal] - k_{-3}[E][Gal]$ $\frac{d[G_3]}{dt} = k_4[E][EGal] - k_{-4}[G_3][E]$ $\frac{d[EL]}{dt} = k_1[E][L] - (k_{-1} + k_2)[EL]$ $\frac{d[EGal]}{dt} = k_2[EL] - (k_3 +$ $k_4[L])[EGal] + (k_{-3} + k_4[L])[EGal] +$ $(k_{-3}[Gal] + k_{-4}[G_3])[E]$
Jenab i sar. 2018.	$E + Lac \xrightarrow{k_1} E - Gal + Glu$ $E + Gal + H_2O \xrightarrow{k_2} E + Gal$ $E + Gal + Lac \xrightleftharpoons[k_5, k_6]{k_3, k_4} GOS + E$ $E + Gal \xrightleftharpoons[k_5, k_6]{k_5, k_6} E - Inhibitor$	$\frac{d[Lac]}{dt} = (-k_1 k_2 \frac{1}{k_4} [Lac][H_2O]$ $- 2k_1 \frac{k_3}{k_4} [Lac]^2$ $+ k_2 [GOS][H_2O])Y$ $\frac{d[Glu]}{dt} = (-k_1 k_2 \frac{1}{k_4} [Lac][H_2O]$ $+ k_1 \frac{k_3}{k_4} [Lac]^2)Y$ $\frac{d[Gal]}{dt} = (-k_1 k_2 \frac{1}{k_4} [Lac][H_2O]$ $+ k_2 [GOS][H_2O])Y$ $\frac{d[GOS]}{dt} = -k_1 \frac{k_3}{k_4} [Lac]^2$ $- k_2 [GOS][H_2O])Y$

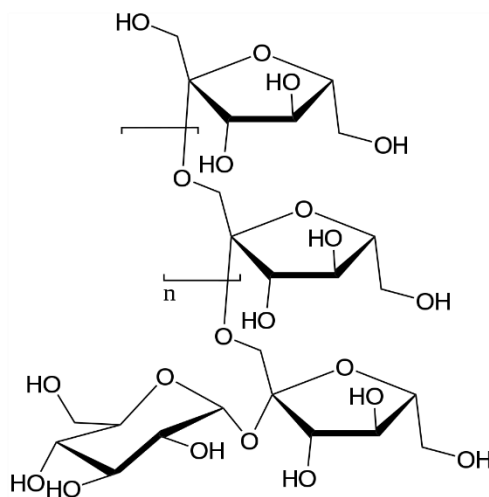
		$\frac{1}{Y} = (K_2 \frac{1}{k_4} [H_2O] + \frac{k_3}{k_4} [Lac] + K_1 \frac{1}{k_4} [Lac]$ $+ [GOS]$ $+ K_2 \frac{1}{k_4} \frac{k_5}{k_6} [Gal][H_2O]$ $+ \frac{k_3 k_5}{k_4 k_6} [Lac][Gal])$
--	--	---

1.1.2. Frukto-oligosaharidi (FOS)

1.1.2.1. Struktura FOS-a

Frukto-oligosaharidi (FOS) su grupa prebiotika koja se sastoje od linearnih lanaca sastavljenih od molekula *D*-fruktoze međusobno povezanih $\beta(2 \rightarrow 1)$ glikozidnim vezama pri čemu se na neredukujućem kraju lanca nalazi molekul *D*-glukoze koji je povezan $\alpha(2 \rightarrow 1)$ glikozidnom vezom sa molekulom fruktoze (slika 1.4). Prema dužini lanca mogu se razlikovati tri grupe FOS:

- Inulin je heterogena smeša polimera koji sadrže do 60 fruktoznih jedinica u lancu.
- Oligofruktoza su oligosaharidi koji nastaju hidrolizom inulina i sadrže do 10 fruktoznih jedinica.
- Frukto-oligosaharidi kratkog lanca (scFOS) su oligosaharidi koji sadrže do pet monosaharidnih jedinica.



Slika 1.4. Struktura FOS-a

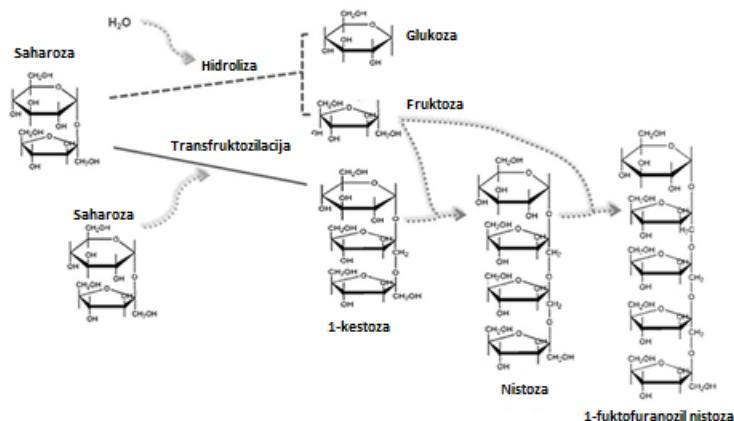
Najčešće zastupljeni scFOS su 1-kestoza (GF₂), nistoza (GF₃) i 1- β -fruktofuranozil nistoza (GF₄), u kojima je broj monomernih jedinica, odnosno stepen polimerizacije (eng. „*degree of polymerisation*” - DP) respektivno jednak 3 (DP₃), 4 (DP₄) i 5 (DP₅).

1.1.2.2. Sinteza FOS-a

Prirodni izvori FOS-a su različite biljke. Međutim, zbog nedovoljnih koncentracija u ovim izvorima, danas postoji praksa industrijske proizvodnje FOS-a od saharoze (Sánchez-Martínez i sar.

2020.). Sinteza FOS-a je najčešće enzimski katalizovana reakcija u kojoj se raskida $\beta(2\rightarrow1)$ glikozidna veza i dolazi do transfera molekula fruktoze sa jedinjenja koje je donor na jedinjenje koje je akceptor. Ovu reakciju katalizuju različite vrste enzima. Enzimi koji katalizuju proizvodnju FOS su klasifikovani u dve grupe: fruktoziltransferaze (eng. „*fructosyltransferase*”—FTaze) i β -fruktofuranozidaze (eng. „ *β -fructofuranosidase*”—FFaze) (Antošová i sar. 2001.). Navedeni enzimi često katalizuju i reakciju hidrolize što dodatno usložnjava mehanizam sinteze FOS. Kao supstrat za reakciju sinteze FOS uglavnom se koristi saharoza (Sah).

FOS koji su nastali u prvim koracima sinteze postaju donori i akceptori za fruktoznu jedinicu pri čemu simultano nastaju novi FOS sa stepenom polimerizacije za jedan veći (DP_{n+1}) i za jedan manji (DP_{n-1}) od početnog FOS (DP_n). Paralelno sa ovim reakcijama dolazi i do hidrolize (Martins i sar. 2019.). Na slici 1.5 je dat grafički prikaz pojednostavljenog mehanizma sinteze.



Slika 1.5. Pojednostavljen mehanizam sinteze FOS (preuzeto iz Martins i sar. 2019.)

Dobijanje FOS-a zavisi od različitih parametara reakcije, kao i od vrste korišćenog enzima. Prethodna istraživanja su pokazala da optimizacija brojnih faktora, uključujući vreme reakcije, pH, temperaturu, početnu koncentraciju saharozu i koncentraciju enzima, može poboljšati selektivnost enzima prema sintezi FOS-a. Najveći uticaj imaju početna koncentracija saharoze i početna koncentracija enzima (Khandekar i sar. 2014, Kashyap i sar. 2015, Alvarado-Huallanco i sar. 2010, Caicedo i sar. 2008, Vega i sar. 2014.). Zato je za dizajn i optimizaciju procesa biohemijskih reaktora vrlo važno temeljno poznavanje kinetike reakcije, kao i kinetičkog modela.

1.1.2.3. Pregled kinetičkih modela sinteze FOS-a

Bilo je dosta pokušaja da se objasni hemijski mehanizam sinteze FOS-a i u svim radovima je naglašeno koliko je reakcija složena zbog postojanja paralelnih reakcija i istovremenih procesa transfruktozilacije i hidrolize saharoze. U literaturi se može naći nekoliko kinetičkih modela, uključujući različite empirijske mehanizme ili mehanizme zasnovane na jednačinama tipa Michaelis-Mentena (Jung i sar. 1989, Kashyap i sar. 2015, Duan i sar. 1994, Schorsch i sar. 2018.). Skoro svi predloženi modeli su zasnovani na reakcionom mehanizmu koji opisuje istovremenu sintezu FOS-a i hidrolizu saharoze. Zbog pretpostavke da ista supstanca služi i kao donor i kao akceptor molekula fruktoze, svi pristupi samo delimično objašnjavaju sintezu FOS-a.

Prvi model sinteze FOS su predložili Jung i saradnici 1989. godine (tabela 1.2). Ovaj model je baziran na pretpostavci da se reakcije disproporcionalisanja saharoze (Sah), 1-kestoze (GF_2) i nistoze (GF_3) odvijaju lančano, dok se reakcije hidrolize zanemaruju. Na samom početku saharoza predstavlja akceptor i donor pri čemu nastaje molekul 1-kestoze i molekul glukoze. Nadalje, 1-kestoza predstavlja supstrat u reakciji u kojoj nastaju saharoza i nistoza, a nistoza supstrat u reakciji u kojoj nastaju 1-kestoza i 1- β -fruktofuranozil nistoza (GF_4). Pretpostavljena je Mihaelis-Mentenova

kinetika i kompetitivna inhibicija glukozom ukoliko je supstrat saharoza. Ovaj model uključuje ukupno 13 parametara. Naredni korak u razvoju učinili su Duan i sar. 1994, koji su Jungov model modifikovali tako da se uzima u obzir reakcija hidrolize nistoze. Takođe je pretpostavljena Mihaelis-Mentenova kinetika, ali se kompetitivna inhibicija glukoze razmatra i za 1-kestoza i nistoza kao supstrate. Nadalje su razvijani različiti matematički modeli za opis mehanizma sinteze FOS. Rocha i sar. 2009. su predložili najdetaljniji model koji pored reakcija transfruktozilacije i hidrolize, uzima u obzir i nastanak biomase. Po ovom modelu, sintezu FOS ne katalizuju enzimi, već mikroorganizmi iz grupe gljiva *Aspergillus sp.* Za razliku od enzima koji nakon reakcije ostaju nepromenjeni, mikroorganizmi imaju sposobnost reprodukcije, tako da se u kinetičkom modelu moraju uzeti u obzir i reakcije rasta biomase. Ovaj model detaljno opisuje dešavanja tokom sinteze FOS ali sadrži čak 41 parametar. Guio i sar. 2012. su razvili model zasnovan na modelu Juan i sar. 1989. Model je imao pet povratnih reakcija i poslednja reakcija je predstavljala varijaciju originalnog modela koji pretpostavlja da se reakcije hidrolize GF, GF₂, GF₃ i GF₄ ne dešavaju, a formiranje GF₅ je zanemarljivo.

Dalje su Vaga i Zuniga-Hasen 2014. došli do saznanja da na aktivnom mestu na enzimu postoji deo za koji može da se veže molekul saharoze, tako da dolazi do interakcije između molekula saharoze, FOS i enzima pri čemu nastaje više mogućih proizvoda. Stoga su predložili model zasnovan na ping-pong mehanizmu. Prema ovom mehanizmu kada je supstrat saharoza, dolazi do raskidanja veze između glukoze (G) i fruktoze (F) i do formiranja kompleksa enzim-fruktoza (EF). Formirani kompleks može da se razloži, pri čemu nastaje slobodan enzim (E) i oslobađa se molekul fruktoze. Takođe može doći do reakcije sa 1-kestoza (GF₂) ili nistoza (GF₃) pri čemu nastaju nistoza i 1-β-fruktofuranozil nistoza (GF₄) respektivno. Pored toga što su akceptori fruktoze, 1-kestoza i nistoza mogu biti i donori fruktozne jedinice. U ovom mehanizmu se posmatra uticaj kompetitivne inhibicije glukoze i nekompetitivne inhibicije saharoze pri visokim koncentracijama (Vaga i Zuniga-Hasen 2014.). Kashyap i sar. 2015. su razvili model sa pet povratnih reakcija, od kojih su prve tri uključivale hidrolizu saharoze i formiranje kompleksa enzim-fruktoza (EF). Nastajanje FOS-a je predstavljeno kao zbir tri-, tetra- i penta- oligosaharida. Model takođe uzima u obzir uzeti u obzir inhibiciju enzima glukozom. Schorsch i sar. 2018. su pojednostavili model Rocha i sar. 2009. tako što su zanemarili uticaj rasta biomase i hidrolize svih jedinjenja osim 1-β-fruktofuranozil nistoze. Tako pojednostavljen model ima 14 parametara.

Tabela 1.2. Mehanizmi reakcije sinteze FOS-a korišćeni u literaturi.

Literatura	Mehanizam reakcije	Jednačine modela
Jung i sar. 1989.	$GF \xrightarrow{r_1} v_1 GF_2 + v_2 G$ $GF_2 \xrightarrow{r_2} v_3 GF + v_4 GF_3$ $GF_3 \xrightarrow{r_3} v_5 GF_2 + v_6 GF_4$	$\frac{d[GF]}{dt} = -r_1 + v_3 r_2 + \frac{F}{V}([GF]_{in} - [GF])$ $\frac{d[GF_2]}{dt} = -r_2 + v_1 r_1 + v_5 r_3 - \frac{F}{V}[GF_2]$ $\frac{d[GF_3]}{dt} = -r_3 + v_4 r_2 - \frac{F}{V}[GF_3]$ $\frac{d[GF_4]}{dt} = v_6 r_3 - \frac{F}{V}[GF_4]$ $\frac{d[G]}{dt} = v_2 r_1 - \frac{F}{V}[G]$ $\frac{d[V]}{dt} = Q$

		$r_1 = Vmt_{GF} \frac{[GF]}{Kmt_{GF}(1 + \frac{[G]}{Kit_G}) + [GF]}$ $r_2 = Vmt_{GF_2} \frac{[GF_2]}{Kmt_{GF_2} + [GF_2]}$ $r_3 = Vmt_{GF_3} \frac{[GF_3]}{Kmt_{GF_3} + [GF_3]}$
Duan i sar. 1994.	$2GF \xrightarrow{r_1} GF_2 + G$ $2GF_2 \xrightarrow{r_2} GF_3 + GF$ $2GF_3 \xrightarrow{r_3} GF_4 + GF_2$ $GF_3 \xrightarrow{r_4} GF_2 + F$	$\frac{d[G]}{dt} = \frac{180}{2 * 342} r_1$ $\frac{d[GF]}{dt} = -r_1 + \frac{342}{2 * 504} r_2$ $\frac{d[GF_2]}{dt} = -r_2 + \frac{504}{2 * 342} r_1 + \frac{504}{2 * 666} r_3 + \frac{504}{666} r_4$ $\frac{d[GF_3]}{dt} = -r_3 - r_4 + \frac{666}{2 * 504} r_2$ $\frac{d[GF_4]}{dt} = \frac{828}{2 * 666} r_3$ $\frac{d[F]}{dt} = \frac{180}{666} r_4$
Rocha i sar. 2009.	<p><u>Hidroliza</u></p> $GF \xrightarrow{r_1} v_1 G + v_2 F$ $GF_2 \xrightarrow{r_2} v_3 GF + v_4 F$ $GF_3 \xrightarrow{r_3} v_5 GF_2 + v_6 F$ $GF_4 \xrightarrow{r_4} v_7 GF_3 + v_8 F$ <p><u>Transfruktolizacija</u></p> $2GF \xrightarrow{r_5} v_9 GF_2 + v_{10} G$ $2GF_2 \xrightarrow{r_6} v_{11} GF_3 + v_{12} GF$ $2GF_3 \xrightarrow{r_7} v_{13} GF_4 + v_{14} GF_2$ <p><u>Nastanak biomase</u></p> $Y_G G \xrightarrow{r_8} X$ $Y_F F \xrightarrow{r_9} X$	$\frac{d[GF]}{dt} = \left(-r_1 + v_3 r_2 - r_5 + \frac{v_{12}}{2} r_6\right) + \frac{F}{V} ([GF]_{in} - [GF])$ $\frac{d[G]}{dt} = \left(v_1 r_1 + \frac{v_{10}}{2} r_5 - Y_G r_8\right) - \frac{F}{V} [G]$ $\frac{d[F]}{dt} = \left(v_2 r_1 + v_4 r_2 + v_6 r_3 + v_8 r_4 - Y_F r_9\right) - \frac{F}{V} [F]$ $\frac{d[GF_2]}{dt} = \left(-r_2 + v_5 r_3 + \frac{v_9}{2} r_5 - r_6 + \frac{v_{14}}{2} r_7\right) - \frac{F}{V} [GF_2]$ $\frac{d[GF_3]}{dt} = \left(-r_3 + v_7 r_4 + \frac{v_{11}}{2} r_6 - r_7\right) - \frac{F}{V} [GF_3]$ $\frac{d[GF_4]}{dt} = \left(-r_4 + \frac{v_{13}}{2} r_7\right) - \frac{F}{V} [GF_4]$ $\frac{d[X]}{dt} = (r_8 + r_9) - \frac{F}{V} [X]$ $r_1 = \frac{Vmh_{GF} * [GF]}{Kmh_{GF} + [GF]}$ $r_i = \frac{Vmh_{GF_i} * [GF_i]}{Kmh_{GF_i} + [GF_i] \left(1 + \frac{[GF_i]}{Kih_{GF_i}}\right)} \quad i = 2, 3, 4$ $r_5 = \frac{Vmt_{GF} * [GF]}{Kmt_{GF} \left(1 + \frac{[G]}{Kit_{GF}}\right) + [GF] \left(1 + \frac{[GF]}{Kst_{GF}}\right)}$

		$r_l = \frac{Vmt_{GF_i} * [GF_i]}{[GF_i] + Kmt_{GF_i}(1 + \frac{[G]}{Kt_{GF_i}})} \quad l = 7, 8$ $r_j = \frac{\mu_{j,max} * [S_j] * [X]}{[S_j] + KS_j} \quad j = 9, 10$
Guio i sar. 2012.	$2GF \xrightleftharpoons{k_1, k_{-1}} GF_2 + G$ $2GF_2 \xrightleftharpoons{k_2, k_{-2}} GF_3 + GF$ $2GF_3 \xrightleftharpoons{k_3, k_{-3}} GF_4 + GF_2$ $GF + H_2O \xrightleftharpoons{k_4, k_{-4}} G + F$ $G \xrightleftharpoons{k_5, k_{-5}} F$	$\frac{d[GF]}{dt} = -k_1[GF]^2 + 2k_{-1}[GF_2][G] + \frac{k_2}{2}[GF_2]^2 - k_{-2}[GF_3][GF] - k_4[GF] + k_{-4}[G][F]$ $\frac{d[GF_2]}{dt} = \frac{k_1}{2}[GF]^2 - k_{-1}[GF_2][G] - k_2[GF_2]^2 + 2k_{-2}[GF_3][GF] + \frac{k_3}{2}[GF_3] - k_{-3}[GF_4][GF_2]$ $\frac{d[GF_3]}{dt} = \frac{k_2}{2}[GF_2]^2 - k_{-2}[GF_3][GF] - k_3[GF_3]^2 + 2k_{-3}[GF_4][GF_2]$ $\frac{d[GF_4]}{dt} = \frac{k_3}{2}[GF_3] - k_{-3}[GF_4][GF_2]$ $\frac{d[G]}{dt} = \frac{k_1}{2}[GF]^2 - k_{-1}[GF_2][G] + k_4[GF][H_2O] - k_{-4}[G][F] - k_5[G] + k_{-5}[F]$ $\frac{d[F]}{dt} = k_4[GF][H_2O] - k_{-4}[G][F] + k_5[G] - k_{-5}[F]$ $\frac{d[H_2O]}{dt} = -k_4[GF][H_2O] + k_{-4}[G][F]$
Kashyap i sar. 2015.	$E + GF \xrightleftharpoons{k_1, k_{-1}} EGF$ $EGF \xrightleftharpoons{k_2, k_{-2}} EF + G$ $EF \xrightleftharpoons{k_3, k_{-3}} E + F$ $EF + GF \xrightleftharpoons{k_4, k_{-4}} E + FOS$ $E + G \xrightleftharpoons{k_5, k_{-5}} EG$	$\frac{d[E]}{dt} = -k_1[E][GF] + k_{-1}[EGF] + k_3[EF] - k_{-3}[E][F] + k_4[EF][GF] - k_{-4}[E][FOS] - k_5[E][G] + k_{-5}[EG]$ $\frac{d[EGF]}{dt} = k_1[E][GF] - k_{-1}[EGF] - k_2[EGF] + k_{-2}[EF][G]$ $\frac{d[EF]}{dt} = k_2[EGF] + k_{-2}[EF][G] - k_3[EF] + k_{-3}[E][F] - k_4[EF][GF] + k_{-4}[E][FOS]$ $\frac{d[EG]}{dt} = k_5[E][G] - k_{-5}[EG]$ $\frac{d[GF]}{dt} = -k_1[E][GF] + k_{-1}[EGF] - k_4[EF][GF] + k_{-4}[E][FOS]$ $\frac{d[G]}{dt} = k_2[EGF] - k_{-2}[EF][G] - k_5[E][G] + k_{-5}[EG]$

		$\frac{d[F]}{dt} = k_3[EF] - k_{-3}[E][F]$ $\frac{d[FOS]}{dt} = k_4[EF][GF] - k_{-4}[E][FOS]$
Schorsch i sar. 2018.	$GF \xrightarrow{r_1} \nu_1 GF_2 + \nu_2 G$ $GF_2 \xrightarrow{r_2} \nu_3 GF_3$ $GF_3 \xrightarrow{r_3} \nu_4 GF_4$ $GF_4 \xrightarrow{r_4} \nu_5 GF + \nu_6 F$	$\frac{d[GF]}{dt} = -r_1 + \nu_5 r_4 + \frac{F}{V}([GF]in - [GF])$ $\frac{d[GF_2]}{dt} = -r_2 + \nu_1 r_1 - \frac{F}{V}[GF_2]$ $\frac{d[GF_3]}{dt} = -r_3 + \nu_3 r_2 - \frac{F}{V}[GF_3]$ $\frac{d[GF_4]}{dt} = -r_4 + \nu_4 r_3 - \frac{F}{V}[GF_4]$ $\frac{d[F]}{dt} = \nu_6 r_4 - \frac{F}{V}[F]$ $\frac{d[G]}{dt} = \nu_2 r_1 - \frac{F}{V}[G]$ $\frac{d[V]}{dt} = F$ $r_i = Vmt_{GF_i} \frac{[GF_i]}{Kmt_{GF_i} + [GF_i]} \quad i = 1, 2, 3$ $r_4 = Vmh_{GF_4} \frac{[GF_4]}{Kmt_{GF_4} + [GF_4]}$

1.2. Prelazak sa šaržnog na kontinualni način proizvodnje prebiotika

Prema dinamici rada, kretanju materijala i organizaciji strukture tehnološki procesi se mogu podeliti na kontinualne i diskontinualne. Diskontinualne – šaržne sisteme karakteriše uvođenje određene količine sirovina u sistem i boravak u sistemu sve dok se ne dostigne zahtevana konverzija sirovina u proizvode. Nakon toga je potrebno isprazniti sistem, očistiti, ponovo napuniti i pustiti u rad. Dakle, kod diskontinualnih sistema mora doći do prekida rada, tj. Unosi se čekanje u proces proizvodnje čime se znatno smanjuje efikasnost i efektivnost procesa proizvodnje. Iz ekonomskih i ekoloških razloga procesna industrija teži nalaženju novih alternativa tehnoloških procesa koje podrazumevaju radikalne promene, kao što su prelazak sa konvencionalno šaržnih na kontinualne režime proizvodnje.

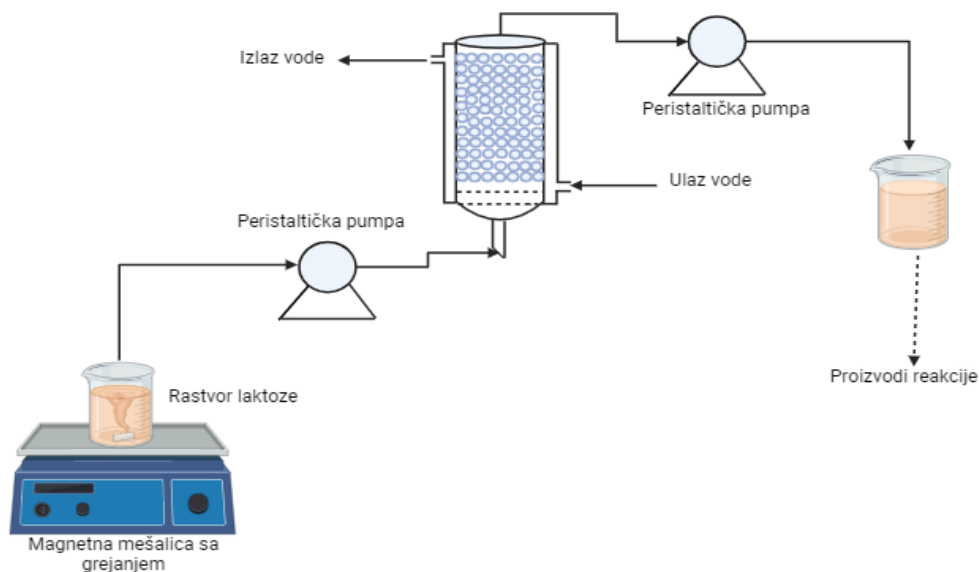
Kod kontinualnih – neprekidnih procesa postoji kontinualan dotok sirovina u sistem i kontinualno isticanje iz sistema. Prednosti kontinualnog režima ogledaju se u tome što ne dolazi do periodičnog zaustavljanja sistema čime se dobija na uštedi vremena. Bolja postojanost uspostavljenih uslova za odigravanje reakcije kod kontinualnih sistema omogućava i ujednačenost kvaliteta proizvoda. Moguće je i racionalnije korišćenje sirovina uvođenjem recirkulacionih struja kojima će se neiskorišćene sirovine vraćati na početak sistema. Racionalnije korišćenje sirovina, manje dimenzije uređaja, smanjivanje količine otpada, ušteda vremena i sirovina i smanjivanje troškova

predstavljaju glavne razloge zašto se teži prelasku sa šaržnog režima na kontinualni režim proizvodnje. Štaviše, kod kontinualnih sistema je moguće uvesti sisteme kontrole i upravljanja koji će detektovati promene i interaktivno ispravljati greške u cilju održavanja kvaliteta proizvoda, dok se kod šaržnih sistema u slučaju pojave greške najčešće mora odbaciti čitava šarža tog ciklusa.

Kada je u pitanju proizvodnja prebiotika, najčešće se obavlja po konvencionalnom režimu, u šaržnim reaktorima sa mešanjem. U pojedinim slučajevima se prilikom mešanja javljaju veliki smicajni naponi koji mogu oštetiti aktivacione centre enzima. Jedan on načina da se proces intenzifikuje, jeste prelazak sa šaržnog na kontinualni režim rada, s obzirom da je u pogledu produktivnosti i ekonomičnosti, kao i drugih prethodno navedenih prednosti kontinualno izvođenje procesa bolja opcija. Zamena šaržnog kontinualnim procesnom biće utoliko izazovnije ukoliko reakcija zahteva duža vremena zadržavanja, što je čest slučaj za biohemijske reakcije, uključujući sintezu prebiotika. Intenzifikacija procesa proizvodnje prebiotika podrazumeva dizajn reaktora optimalne konfiguracije koja će zadovoljiti uslove odigravanja reakcije. Na osnovu znanja o mehanizmu i uslovima za odigravanje reakcije, vršena su ispitivanja efikasnosti upotrebe različitih reaktora kao što su bioreaktori sa pakovanim slojem, protočni reaktori sa pakovanim slojem, membranski reaktori i reaktori sa oscilatornim tokom fluida (Vera i sar. 2016.).

Reaktori sa pakovanim slojem za kontinualnu proizvodnju predstavljaju dobru alternativu, jer je moguće zadržavanje enzima u sistemu, te produžena upotreba katalizatora. Bioreaktori sa pakovanim slojem koriste imobilisane enzime čija aktivnost može biti veća nego u šaržnim reaktorima sa rastvorenim enzimima. Dobar rezultat postignut je u protočnom reaktoru sa pakovanim slojem u radu Shin i sar. 1998. (slika 1.6), koji su koristeći imobilisanu β -galaktozidazu prostom adsorpcijom na hitozanske čestice postigli prinos GOS-a od 55 % i uspeli da održe kontinualnu proizvodnju u toku 15 dana. Warmerdam i sar. su 2014. godine uočili da je u reaktoru sa pakovanim slojem prinos GOS-a kao i u šaržnim uslovima sa rastvorenim enzimom, ali da je volumetrijska produktivnost u ovom slučaju šest puta veća. Zapreminska produktivnost se kod ovih reaktora može povećati nalaženjem alternativa za imobilizaciju enzima. Na primer, ukoliko se enzim β -galaktozidaza imobilise na pamučnu tkaninu velike poroznosti koja je modifikovana polietileniminom i umrežena glutaraldhidom, dobiće se uslovi za ostvarivanje i do 50 puta većeg prinosa u reaktoru (Warmerdam i sar. 2014.).

Značajno istraživanje kada su u pitanju protočni reaktori sa pakovanim slojem, sproveo je Mozaffar još 1986. godine (Mozaffar i sar. 1986.). On je ustanovio da se upotrebom imobilisanih enzima produktivnost povećava od 20 do 40 % u odnosu na tada korišćen, rastvoren enzim. Lorenzoni i sar. 2015. su u svom radu prikazali kontinualnu proizvodnju FOS-a pomoću reaktora sa pakovanim slojem i reaktora sa fluidizovanim slojem. Dobijen je sličan prinos FOS-a, 59 % u reaktoru sa pakovanim slojem i 54 % u reaktoru sa fluidizovanim slojem. Međutim, kada je u pitanju stabilnost enzima te dobijenog FOS-a, reaktor sa pakovanim slojem se pokazao kao bolji i za 40 dana nije uočeno smanjenje prinosa. Reaktori sa fluidizovanim slojem i reciklom gde je enzim imobilisan na površinu čestica jonoimenjivačke smole ispitivali su Carević i sar. 2016. Ovaj reaktor je korišćen za proizvodnju GOS i upoređivan je sa performansama šaržnog reaktora. Za početnu koncentraciju rastvora laktoze od 400 g/l na temperaturi od 40 °C i pH od 4,5 prinos reakcije u reaktoru sa fluidizovanim slojem i recirkulacijom bio je veći u odnosu na šaržni i iznosio je 100 g/l, odnosno 87 g/l, respektivno. U radu Zambelli i sar. 2016. kontinualna proizvodnja FOS-a je ostvarena u koloni sa pakovanim slojem alginatnih čestica. Produktivnost FOS-a je upoređena sa uslovima šaržne proizvodnje i dobijena je oko 1,7 puta veća produktivnost nego u šaržnom reaktoru. Takođe, u ovom radu je dobijena koncentracija FOS-a od oko 48 % u oba slučaja, ali je vreme zadržavanja u slučaju kontinualne proizvodnje bilo 10h, dok je u slučaju šaržne proizvodnje vreme iznosilo čak 72 sata.

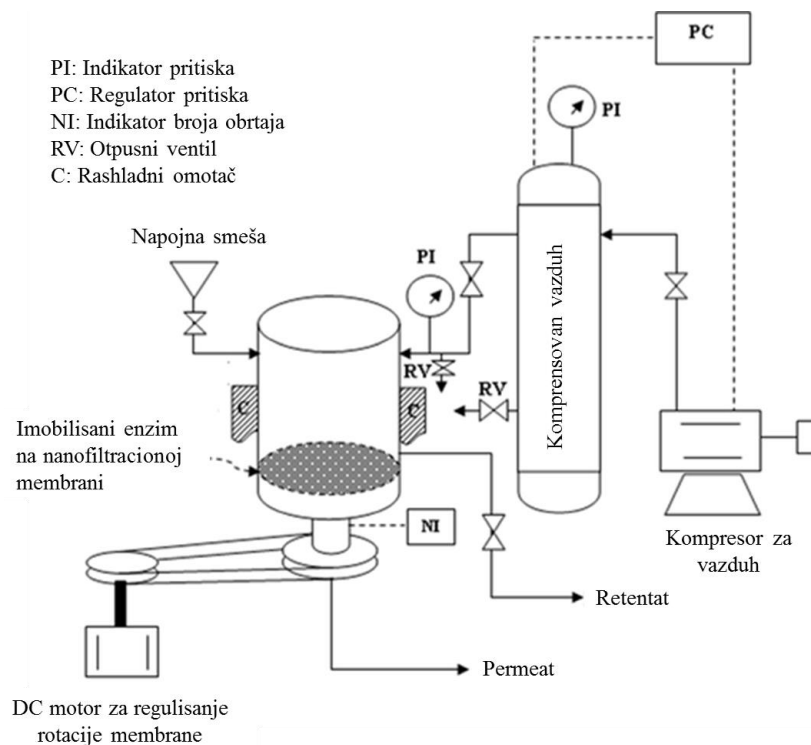


Slika 1.6. Šematski prikaz kontinualne proizvodnje GOS pomoću reaktora sa pakovanim slojem (preuzeto i modifikovano iz Shin i sar. 1998.)

Membranski reaktori su, takođe, često korišćeni tip reaktora za sintezu prebiotika. Međusobno se razlikuju po materijalu, obliku i stepenu poroznosti membrane. Prednost membranskih reaktora ogleda se u tome da je moguće izvršiti razdvajanje prebiotika, supstrata, drugih proizvoda i enzima, paralelno sa odigravanjem reakcije nastajanja prebiotika i to podešavanjem karakteristika membrane. Petzelbauer i sar. 2002. su koristili membranski reaktor sa reciklom za proizvodnju GOS-a. Dobijena je koncentracija GOS-a koja je 3 do 4 puta veća od koncentracije dobijene u šaržnom reaktoru pod istim uslovima. U radu Ebrahimi i sar. 2010. za kontinualnu proizvodnju GOS-a je korišćen keramički membranski reaktor. Varirane su početne koncentracije supstrata (10 do 30 %) i vremena zadržavanja (13 do 24 min) i postignut je prinos od 38 %. Cordova i sar. su 2016. godine dizajnirali i optimizovali ultrafiltracioni membranski bioreaktor. Koristeći velike koncentracije laktoze ovaj sistem je omogućio povećavanje količine nastalog GOS-a po jedinici mase katalizatora 2,44 puta u odnosu na šaržne sisteme. Istraživanje koje su sproveli Cao i sar. 2020. je pokazalo povećanje prinosa u membranskom reaktoru u odnosu na šaržni sa 24 % na 36 %. Ovo istraživanje takođe navodi da je u membranskom reaktoru stabilnost enzima višestruko veća nego u šaržnom. Pottratz i sar. 2022. su ispitivali proizvodnju GOS tako što je enzim β -galaktozidaza imobilisan na metakrilni makroporozni monolit koji je korišćen kao membranski reaktor. Kroz ovakav reaktor fluid neometano struji kroz pore čime se umanjuju ograničenja vezana za prenos mase koja se javljaju kada se na konvencionalne nosače imobilise enzim. Rezultati eksperimenata su pokazali da je pri kontinualnoj proizvodnji prinos GOS bio veći i do 60 % u poređenju sa šaržnim reaktorom. Ovi reaktori su pogodni za industrijsku proizvodnju zbog jednostavnog uvećanja razmera procesa koja se postiže dodavanjem monolita.

Sen i sar. 2012. su poredili rotacioni disk membranski bioreaktor sa šaržnim reaktorom u pogledu proizvodnje GOS (slika 1.7). Glavni nedostatak ovih reaktora može da bude zapušavanje pora membrane proizvodima reakcije, što bi potencijalno dovelo do nižih vrednosti prinosa i čistoće proizvoda. Istraživanje je pokazalo da su prinos i čistoća proizvoda veći u rotacionom disk membranskom bioreaktoru nego u šaržnom reaktoru, a vrednosti prinosa su iznosile 80,2 % i 77 %, respektivno. Kada se poredi čistoća proizvoda dobijena čistoća je duplo veća kada se koristi rotacioni disk membranski bioreaktor (67,4 %) nego kada se koristi šaržni reaktor praćen membranskom filtracijom (32,4 %). Mane membranskih reaktora su upotreba visokih pritisaka koji smanjuju aktivnost enzima oštećujući njegove aktivacione centre i upotreba imobilisanih enzima u kojima se

javlja otpor prenosu mase, a samim tim i dobijanje manjih prinosa nego što bi bilo moguće da je enzim rastvoren. Korišćenjem velikih koncentracija supstrata pri sintezi GOS-a se problem smanjenja prinosa može svesti na minimum i zanemariti.



Slika 1.7. Šematski prikaz kontinualne proizvodnje GOS pomoću membranskog bioreaktora (preuzeto i modifikovano iz Sen i sar. 2012.)

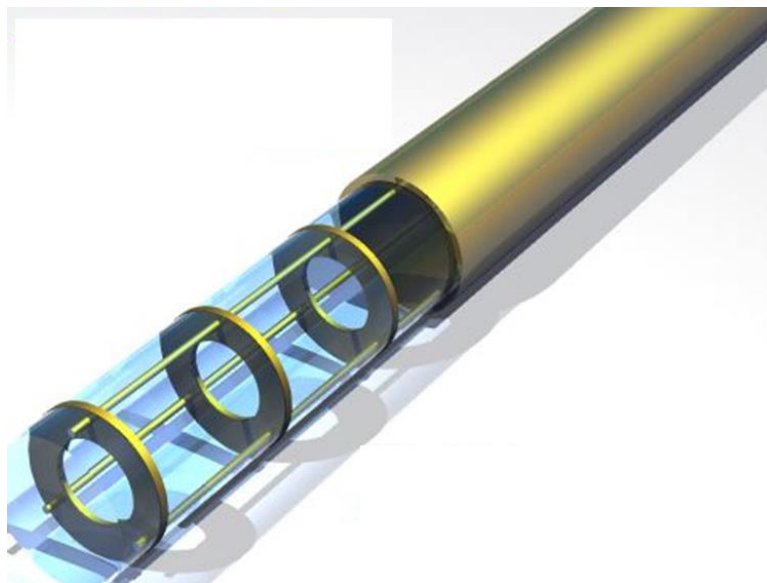
Reaktori sa oscilatornim tokom (ROT) fluida imaju vrlo dobar potencijal za sintezu prebiotika, jer obezbeđuju poboljšano i uniformnije mešanje za niske vrednosti smicajnih napona u odnosu na konvencionalne reaktore. Kada su u pitanju ROT u kojima postoje suspendovane čestice mora se obezbediti uslov da maksimalna aksijalna oscilatorna brzina toka bude dovoljno velika da ne dođe do taloženja čestica, ali da ne bude ni prevelika jer bi došlo do odnošenja čestica tokom tečnosti (Slavnić 2020). Shodno tome, u slučaju dvofaznih sistema u ROT-u je potrebno više oscilatorne energije (kako bi se postiglo efikasno suspendovanje čestica) nego u slučaju jednofaznih sistema (Slavnić 2020). D. Slavnić je u svojoj tezi pokazala da se ostvaruje približan stepen konverzije u reakciji sa imobilisanim enzimom u ROT kao u šaržnom pneumatskom reaktoru sa spoljašnjom recirkulacijom. Takođe je prikazano da je dobijen veći prinos sinteze GOS pomoću slobodnih i imobilisanih enzima u kontinualnom ROT, u odnosu na šaržni reaktor. Pored toga, pokazano je da, zahvaljujući stabilnosti imobilisanog enzima, ne dolazi do smanjenja njegove aktivnosti te da se mogu koristiti u više uzastopnih ciklusa (Slavnić 2020).

U sledećem delu će detaljnije biti opisana konfiguracija ROT-a, kao i njegove osnovne karakteristike, jer je u ovoj tezi korišćena modifikacija ROT-a.

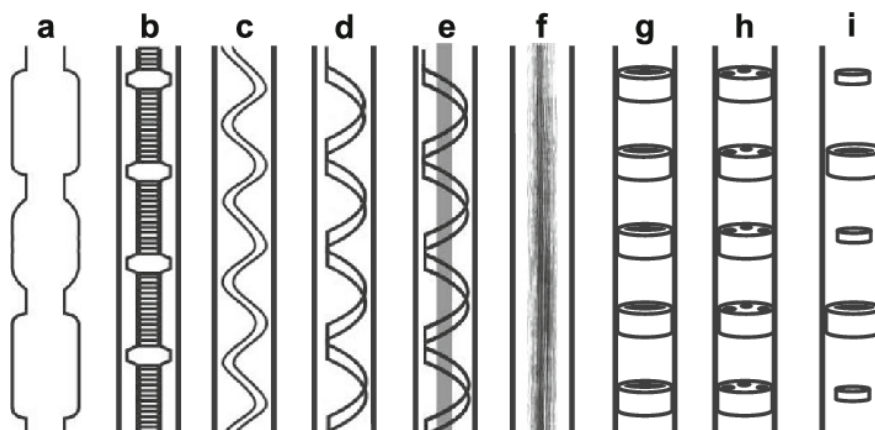
1.2.1. Reaktori sa oscilatornim tokom (ROT) fluida

Kako bi se dobio proizvod željenog kvaliteta i homogen sastav smeše potrebno je da se obezbedi dobro mešanje u sistemu. Mešanje se u tradicionalnim šaržnim reaktorima postiže ugradnjom mešalica i odbojnika, ili se cela reakciona smeša pomera, tj. Reaktor se tresse (tresilice). U

kontinualnim reaktorima se nasipaju pakovani slojevi u slučaju heterogene katalize, ili se u slučaju homogenih reakcija fluid kreće kroz reaktor, sa ili bez ugrađenih pregrada. Rezultati ranijih istraživanja pokazuju da se mešanje može intenzifikovati korišćenjem oscilatornog toka fluida, odnosno kontrolisanog stvaranja cikličnih vrtloga (Slavnić 2020.). Ovaj tip reaktora ima oblik cevi sa ugrađenim pregradama (slika 1.8). Različiti reaktori mogu imati različite vrste pregrada kao što su spiralne pregrade, pregrade u obliku žica, pregrade sa jednim otvorom, pregrade sa više otvora i druge. Na slici 1.9. mogu se uočiti varijacije pregrada koje su ispitivane. Oscilacije u ovim uređajima se najčešće indukuju pomoću klipova ili mehova na jednom ili oba kraja reaktora, ili mehaničkim pomeranjem pregrada. Ovi reaktori se mogu primeniti i u kontinualnim i u šaržnim procesima (Paul i sar. 2004, Slavnić 2020.). Cilj ovakve vrste reaktora jeste da se obezbedi strujanje koje će biti blisko idealnom klipnom strujanju, a pri niskom ukupnom protoku.



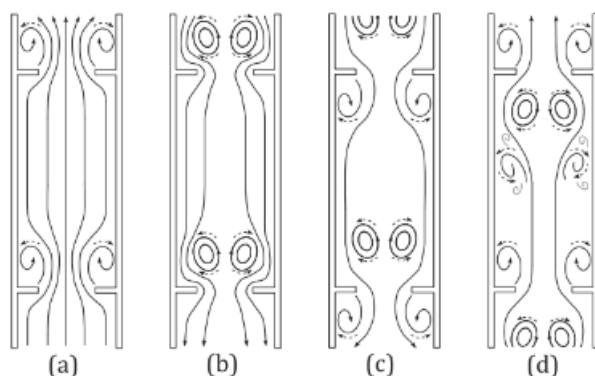
Slika 1.8. Reaktor sa oscilatornim tokom fluida (preuzeto i modifikovano iz Zheng i sar. 2018.)



Slika 1.9. Različite konfiguracije pregrada unutar ROT (preuzeto iz Bianchi i sar. 2020.)

Dodavanjem pregrada u reaktor za posledicu ima stvaranje periodičnih vrtloga pri oscilatornom toku tečnosti. Oblik i dužina vrtloga koji se javljaju u reaktoru direktno zavise od rastojanja između pregrada, a širina vrtloga određena je prečnikom pregrada. Oscilacije toka se u reaktor uvode uglavnom pomoću klipnih ili membranskih pumpi, gde se vrtlozi formiraju u prostoru između pregrada. Prvo se stvaraju udarni talasi iza pregrada (slika 1.10.a i 1.10.b), zatim dolazi do njihovog rasta i širenja po celoj dužini jednog segmenta reaktora (između dve pregrade). Ovaj proces se dešava kod svake pregrade u reaktoru i tako dolazi do uniformnog mešanja. Do nestajanja vrtloga dolazi kada krenu da se formiraju povratni talasi (slika 1.10.c i 1.10.d). Posle izvesnog vremena kreće ponovno formiranje udarnih talasa i do ponavljanja celog procesa. Sa pravilnim definisanjem

geometrije reaktora može se postići kontrolisano mešanje, a na slici 1.10. je prikazana pojava udarnih i povratnih talasa.



Slika 1.10. Faze u formiranju vrtloga u reaktoru sa pregradama: (a) početak udarnog talasa (b) dostizanje maksimalne brzine udarnog talasa (c) početak dejstva povratnog talasa (d) maksimalno izraženo dejstvo povratnog talasa (preuzeto iz McDonough i sar. 2018.)

Reaktori sa oscilatornim tokom imaju brojne prednosti u poređenju sa konvencionalnim reaktorima. Najpre, u ovom tipu reaktora se postiže uniformno mešanje, bolji prenosi mase i toplote, što omogućava kraće vreme zadržavanja reakcione smeše u reaktoru, čak do 90 % u poređenju sa konvencionalnim reaktorima. To dalje podrazumeva upotrebu značajno manjih zapremina odnosno dimenzija reaktora, te uštede u kapitalnim troškovima do 50 %, a za isti kapacitet i produktivnost kao u šaržnom. Osim toga, pokazano je da za određene primene, u odnosu na reaktore sa mehaničkim mešanjem, ROT zahteva do 50 % manje uložene energije (Ni i sar. 2003.). Harvey i sar. 2001. su u svom istraživanju prikazali kontinualnu proizvodnju sterola u reakciji saponifikacije estra i dokazali da je potrebna zapremina kontinualnog ROT 10 puta manja u poređenju sa konvencionalnim šaržnim reaktorom. Takođe su pokazali da je potrebno vreme odigravanja reakcije u ROT samo 12 minuta, dok je u šaržnom reaktoru potrebno 2 sata. Bolja kontrola rada reaktora i same hemijske reakcije rezultuje smanjenjem količine nastalih neželjenih sporednih proizvoda, odnosno većim prinosom do 20 % u odnosu na konvencionalne reaktore. Takođe je moguće potpuno uklanjanje katalizatora iz procesa, što može da predstavlja veliku uštedu. Zheng i sar. 2018. su ispitivali reakciju acetilacije kamfena katalizovanu katjonskom jonoizmenjivačkom smolom koja je suspendovana u reaktoru i izvedena u kontinualnom ROT. Dobijeno je strujanje blisko klipnom, veća brzina reakcije, prinos i selektivnost u odnosu na šaržni reaktor, kao i manje vreme reakcije i količina sporednih proizvoda.

Glavna karakteristika ovog tipa reaktora predstavlja formiranje vrtloga, te uniformno mešanje i kretanje, što je opisano iznad. Ovo je osnovni razlog što je, u odnosu na konvencionalne cevne reaktore bez pregrada i oscilatornog toka, u ovom tipu reaktora poboljšan prenos toplote. Pokazalo se da se prenos toplote poveća 1,7 puta uvođenjem oscilatornog toka, dok uvođenjem pregrada može se uvećati i do 5 puta (Slavnić i sar. 2017.). Zbog pojave vrtloga u reaktorima sa oscilatornim tokom fluida, koeficijent prenosa mase je приметно veći nego kod klasičnih cevnih reaktora i to pri istim nominalnim protocima. Rastojanje između pregrada najviše utiče na to kakvi će se vrtlozi formirati. Ukoliko su pregrade previše blizu jedna druge dolazi do prigušenja vrtloga i njihovog ograničenog rasta. U ovom slučaju zabeleženi su mali koeficijent prenosa mase. Sa druge strane, ukoliko su pregrade previše udaljene jedna od druge vrtlozi koji se formiraju kao udarni talasi ne mogu pokriti kompletnu zapreminu između pregrada. To dovodi do formiranja „slobodnih“ zona gde može doći do nestajanja vrtloga i manje efektivnog mešanja (Slavnić i sar. 2017.).

Kao što je već spomenuto, kod šaržnih sistema uvođenje većeg broja obrtaja mešalice izaziva negativnu posledicu po mikroorganizme ili enzim usled oštećenja i deaktivacije aktivnog centra enzima. Kod ROT tipa reaktora smicajni napon je uniformniji i manji, pri čemu se ne stvaraju zone u kome je smicajni napon izuzetno velik, kao što je to slučaj kod ivice propelera kod reaktora sa mehaničkim mešanjem (Ikwebe i sar. 2015.). Intenzivno mešanje u ROT je pogodno za reakcione

smeše koje sadrže čvrste čestice budući da se nakon svake oscilacije formira vrtlog koji zahvata čestice i na taj način ih održava u suspendovanom stanju. Prilikom vrtloženja dolazi do formiranja fluksa i u pravcu strujanja i u suprotnom pravcu, što obezbeđuje mešanje čestica u svakom segmentu između pregrada. Ukupan tok fluida u aksijalnom pravcu ipak omogućava kretanje čestica iz jednog u drugi segment, pri čemu broj čestica koji pređe u naredni segment zavisi od koncentracije čvrste faze i od parametara oscilatornog toka. Periodična promena smera fluida povećava silu trenja i omogućava da čestice budu u suspendovanom stanju. Međutim, postoji opasnost od začepljenja ROT, tako da udeo čestica mora biti ograničen (Slavnić i sar. 2019.).

Osim pomenutih brojnih prednosti, postoje i određeni nedostaci upotrebe ROT. Prvo ograničenje je složenost konstrukcije u poređenju sa konvencionalnim cevnim reaktorima (prisustvo pregrada). Takođe su neophodni posebni uređaji koji generišu i kontrolišu oscilacije. Iz ovoga proističe da su investicioni troškovi veći, ali oni se mogu nadoknaditi ekonomičnijim radom reaktora (Fogler 1999.). Ograničavajući faktor za primenu ROT je viskoznost reakcione smeše, koja ne sme da bude veća od 0,5 Pa s. Prisustvo gasovite faze dovodi do prigušivanja oscilacija fluida, tako da zapreminski udeo gasa ne sme da prelazi 15%. Kao posledica ovog ograničenja, ROT ne može da se koristi ukoliko je jedan od reaktanata ili proizvod u gasovitoj fazi. Veća količina čvrste faze takođe negativno utiče na oscilacije i intenzitet mešanja, tako da je udeo čestica ograničen na oko 30 % (Slavnić i sar. 2019, Slavnić 2020.).

Ključni parametar koji treba obezbediti pri kontinualnoj proizvodnji prebiotika je odgovarajuće vreme zadržavanja uz dobro mešanje, koje obezbeđuje rastvorljivost većih koncentracija supstrata i efikasan kontakt sa slobodnim (ili imobilisanim enzimom). Treba napomenuti da mešanje u sistemu mora da bude pri malim vrednostima smicajnog napona da ne bi došlo do deaktivacije enzima. Zbog dobrih karakteristika u ovom radu su korišćeni modifikovani reaktori sa oscilatornim tokom i pregradama izrađeni pomoću 3D štampe, što je detaljno opisano u poglavlju 3

Za dobro projektovanje reaktora, takođe je važno odrediti model strujanja fluida unutar ROT. Poželjno strujanje u ROT je idealno klipno. Međutim, u realnosti je nemoguće u potpunosti ostvariti idealno klipno strujanje, pa je potrebno dobro opisati neidealnost strujanja pomoću modela (Phan i sar. 2011.).

Modeli neidealnog strujanja dele se na jednoparametarske, u koje spadaju kaskadni i disperzioni model, i dvo- i više-parametarske u koje se, između ostalih, ubrajaju reaktor sa mrtvim zonama i recirkulacionim tokom. Koji će model biti izabran za opisivanje strujanja zavisi od samog reaktora koji je predmet ispitivanja pri čemu je cilj naći kompromis između toga da primenjeni model bude maksimalno uprošćen, a da istovremeno dovoljno detaljno i adekvatno opisuje posmatrani sistem (Fogler 1999.).

U ovoj tezi je za potrebe opisivanja neidealnog strujanja korišćen jednoparametarski kaskadni model zasnovan na N protočnih reaktora sa idealnim mešanjem (PRIM-ova) u nizu, o čemu će detaljnije biti reči u poglavlju 4.

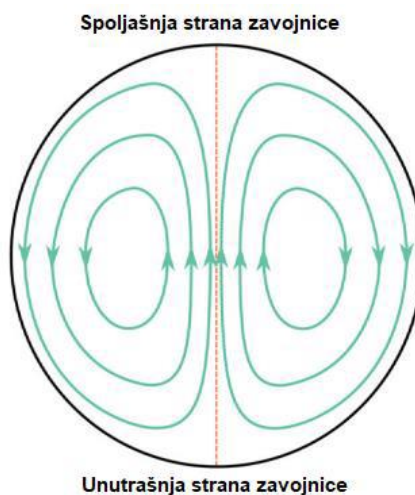
1.2.2. Spiralni reaktori (SR)

Spiralni ili heliks reaktor (SR) je posebna vrsta reaktora koja ima karakterističan oblik spiralno uvijene cevi i prikazan je na slici 1.11. Razlika u geometrijskoj konstrukciji SR u odnosu na obične cevne reaktore obezbeđuje veću kompaktnost SR, s obzirom na to da se za istu dužinu zauzima manji prostor.



Slika 1.11. Spiralni reaktor (preuzeto iz Kumar 2020.)

Ono što je značajnije je da se u spiralnim reaktorima, usled karakterističnog zakrivljenja cevi, pod uticajem centrifugalne i centripetalne sile, formiraju specifični vrtlozi. Ovi vrtlozi se zovu Dean-ovi vrtlozi i dobili su ime po naučniku koji ih je prvi uočio (slika 1.12). Posledica dejstva pomenutih sila je promena raspodele radijalne brzine u poređenju sa pravom cevju, pri čemu se maksimum brzine ne nalazi u osi već bliže spoljašnjem delu cevi, odnosno dalje od ose navoja. Zbog ovog fenomena se formira zona većeg pritiska bliže zidu koji je dalje od ose navoja u odnosu na zid koji je bliži osi. Tada se javlja Dean-ova nestabilnost, odnosno gradijent pritiska koji teži da izbalansira dejstvo sila, što dovodi do formiranja vrtloga koji rotiraju u suprotnom smeru (Gupta i sar. 2018.). Dean-ovi vrtlozi utiču na poboljšanje mešanja u reaktoru. Pravilnim podešavanjem parametara sistema moguće je ostvariti strujanje koje je blisko klipnom pri malim vrednostima Rejnoldsovog broja. Ova osobina pruža veliki potencijal za korišćenje spiralnog reaktora za kontinualno izvođenje sporih reakcija.



Slika 1.12. Šematski prikaz Dean-ovih vrtloga (preuzeto iz McDonough i sar. 2018.)

Upotrebu oscilatornog toka u ovom tipu reaktora su proučavali McDonough i sar. 2018. Oni su uočili da se na ovaj način može postići približno klipno strujanje i formiranje Dean-ovih vrtloga već pri malim vrednostima Rejnoldsovog broja ($Re_n=10-15$). Sa druge strane, ukoliko se koristi samo neoscilatorni tok, Dean-ovi vrtlozi se formiraju pri značajno većim vrednostima Rejnoldsovog broja ($Re_n=70-200$). Na osnovu ovoga sledi da oscilatorni tok u heliks reaktorima dovodi do intenzivnijeg mešanja, a pri manjim nominalnim protocima, odnosno dužim vremenima zadržavanja (McDonough i sar. 2018.). Pored Dean-ovih vrtloga prilikom strujanja kroz zakrivljenu cev se mogu formirati različite složene strujne i vrtložne strukture. Timite i sar. 2010. su ispitivali uticaj oscilatornog toka u cevi koja ima samo jedno zakrivljenje, koleno pod uglom od 90° . Oni su uočili da u ovom slučaju

pored Dean-ovih vrtloga nastaju i Lyne-ovi vrtlozi. Postojanje Lyne-ovih vrtloga je prvi put zabeleženo 1971. godine. Ove strukture se formiraju između zida cevi i Dean-ovih vrtloga prilikom povećanja frekvencije oscilovanja.

Prednosti spiralnih reaktora se ogledaju u smanjenju aksijalne disperzije i poboljšavanju radijalnog mešanja, zbog prisustva Dean-ovih vrtloga. Ukoliko se ostvari ovakvo proticanje fluida kroz SR, moguće je postići usku raspodelu vremena zadržavanja u reaktoru (strujanje blisko klipnom), što je povoljno za izvođenje i kontrolisanje hemijskih reakcija (McDonough i sar. 2018, Nikačević i sar. 2015, Luo i sar. 2016.). Posledica dobrog radijalnog mešanja je intenzivniji prenos toplote i mase, odnosno povećanje koeficijentata prenosa. Uočava se da se prenos toplote pojačava u oblasti uz zid reaktora. Prisutno je i poboljšanje prenosa mase u pravcu ka zidu cevi (Luo i sar. 2016, Rozen i sar. 2020, Gupta i sar. 2018, Luo i sar. 2017.).

Veliki odnos površine cevi reaktora i zapremine fluida unutar cevi doprinosi dobroj termičkoj kontroli, odnosno lakom uspostavljanju željene temperature u SR (Rozen i sar. 2020.). Ovaj tip reaktora može podneti visoke pritiske (Luo i sar. 2016.), smanjena je opasnost od javljanja termičkog šoka i manja je pojava onečišćenja prilikom eksploatacije (Gupta i sar. 2018.). U njima je takođe prisutan manji smicajni napon, u odnosu na sisteme sa mehaničkim mešanjem, što ih čini pogodnim za rad sa osetljivim supstancama (Rozen i sar. 2020.). Još jedna prednost ogleđa se u relativno jednostavnoj izradi ovih reaktora, kao i u kompaktnosti njihovog dizajna (dužina samog reaktora značajno je manja od dužine cevi reaktora, kroz koju prolazi fluid) (Gupta i sar. 2018, Luo i sar. 2017.). Troškovi održavanja SR takođe su relativno niski (Luo i sar. 2016.).

Pored brojnih prednosti, postoje i određeni nedostaci pri radu sa spiralnim reaktorima. Naime, fluid koji se nalazi u centru Dean-ovog vrtloga iz njega može izaći samo ukoliko difunduje, što zapravo znači da je ovaj element fluida „zarobljen“, a samo mešanje i aksijalna disperzija nisu na optimalnom nivou. Da bi se rešio ovaj problem, neophodno je omogućiti periodično formiranje i nestajanje Dean-ovih vrtloga, kako bi se fluid nesmetano mogao osloboditi iz njihovih centara. Postoje dva načina za postizanje ovog cilja (McDonough i sar. 2018.). Prvi način ogleđa se u promeni geometrijske konfiguracije SR, tako da se posle nekoliko navoja menja pravac prostiranja reaktora i samim tim strujanja fluida unutar njega. Prilikom prolaska fluida kroz ovako konfigurisan SR, doći će do ponovnog formiranja Dean-ovih vrtloga pri svakoj promeni pravca. Takođe, moguće je vršiti i promenu prečnika cevi reaktora, sa istim ciljem. Nedostatak ovog pristupa ogleđa se u tome što SR ovakvih konfiguracija gube na svojoj kompaktnosti (McDonough i sar. 2018, Rozen i sar. 2020.). Drugi način postizanja periodičnog formiranja Dean-ovih vrtloga jeste upotrebom oscilatornog toka. Ovo je daleko jednostavniji i prihvatljiviji način, u poređenju sa prethodnim. Uvođenje oscilatornog toka zapravo utiče ne samo na pojavu Dean-ovih vrtloga pri nižim površinskim brzinama, već doprinosi i poboljšanju mešanja eliminacijom stagnantnih zona u centrima Dean-ovih vrtloga. Pri ovom pristupu, neophodno je imati uređaj koji će generisati oscilatorni tok. Takođe, ovaj pristup omogućava da SR ostane u svom kompaktnom obliku (McDonough i sar. 2018.). U ovom radu će se ispitati i primeniti nova konfiguracija, koja kombinuje ROT sa spiralnim reaktorom, a u cilju dodatnog poboljšanja mešanja, i smanjenja negativnih karakteristika pojedinačnih tipova.

1.3. Upotreba matematičkog modelovanja i optimizacije u razvoju procesa sinteze prebiotika

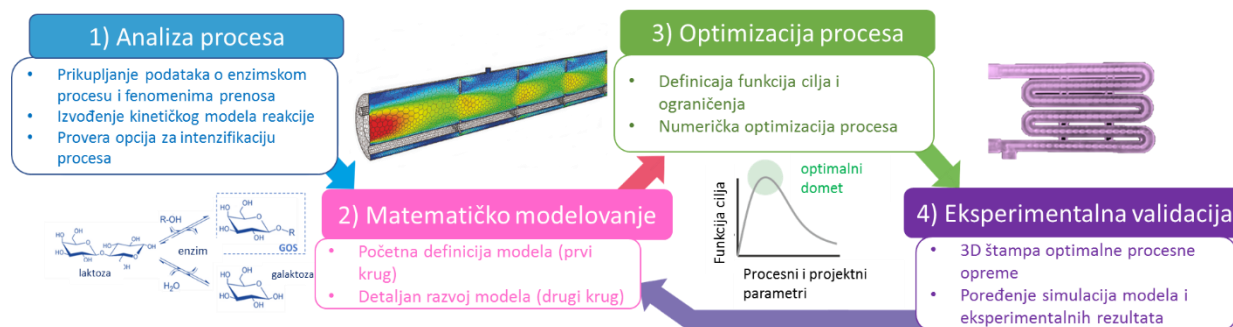
Matematičko modelovanje i optimizacija su u ovoj tezi korišćeni na sistematičan način, a u cilju efikasnog razvoja procesa i uređaja za sintezu prebiotika. Ovo je novi pristup u kome se matematičko modelovanje, optimizacija i koncepti intenzifikacije procesa (PI) koriste integralno, u cilju projektovanja optimalnih reaktora i za odabir odgovarajućih procesnih uslova. Metodologiju je predložio Nikačević i sar. 2012, a zatim je detaljnije razvijena od strane Živkovića i Nikačevića 2016. Metod je primenjen prvo za dobijanje vodonika u intenzifikovanom procesu sa reakcijom vodenog gasa uz upotrebu sorbenta i membrane za in situ separaciju proizvoda reakcije (Živković i sar. 2016, Živković i sar. 2020.). Zatim je predložena metodologija primenjena na intenzifikaciju reaktora za Fišer-Tropš sintezu (mili reaktori sa pakovanim slojem, periodični rad i dr.), što je prikazano u više radova (Stamenić i sar. 2017, Stamenić i sar. 2018, Todić i sar. 2018, Mandić i sar. 2017, Bukur i sar. 2020, Nikačević i sar. 2020.). Navedena metodologije je takođe predložena za sintezu prebiotika, u okviru projekta IDEJE PrintPrEnzy (2022-2025.), opisana je ispod i primenjena u daljem radu teze.

Prva faza metodologije je analiza biohemijske reakcije. To podrazumeva prikupljanje svih potrebnih informacija za kinetiku reakcije i njenu zavisnost od parametara – koncentracija supstrata, enzima, pH, temperature i dr. Osnovni zadatka ove faze je postavljanje adekvatnog mehanizma reakcije i formiranje kinetičkog modela. Na osnovu eksperimenata u šaržnom sistemu se određuju parametri kinetičkog modela. U okviru prve faze se takođe analiziraju mogućnosti za intenzifikaciju procesa, razmatranjem jednog ili više pristupa u PI. Konkretno za proizvodnju prebiotika cilj je bila kontinualna proizvodnja u reaktorima sa intenzivnim mešanjem, zašta su razmotreni ROT i SR.

U drugoj fazi se dizajnira reaktor i ispituje strujanje pomoću detaljnog CFD modela i eksperimenata sa obeleženom supstancom. Nakon analize rezultata se postavlja početni jednostavan matematički model procesa koji opisuje izabrani reaktor, kinetiku reakcije i način strujanja u njemu.

U trećoj fazi se vrši preliminarna numerička optimizacija reaktora za sintezu prebiotika korišćenjem postavljenog matematičkog modela. Cilj je dobijanje optimalne dužine reaktora i uslova za izvođenje eksperimenata a po osnovnim tehno-ekonomskim parametrima Ova preliminarna analiza može dati odgovore na nekoliko važnih pitanja: kako reaktante treba dozirati i mešati i koja geometrija reaktora to može da obezbedi? Da li je korisno dodati recikl?

Četvrti korak je eksperimentalna validacija optimalnog reaktorskog sistema zasnovanog na modelima i eksperimentima na laboratorijskom nivou. Početni optimalni dizajn reaktora se dobija korišćenjem 3D štampe, odnosno izrađuje se 3D crtež i bira odgovarajući materijal za štampanje koji obezbeđuje potrebnu mehaničku žilavost i fizičko-hemijsku otpornost. Eksperimenti se zatim izvode u štampanoj opremi koristeći optimalne uslove za ovu reakciju i dati reaktor. Rezultati eksperimenata, kao što su konverzije reaktanata, prinosi i selektivnost proizvoda, čistoća finalnog proizvoda i oporavak upoređuju se sa rezultatima modela. Nakon poređenja, početni model se poboljšava. Ovo smanjuje jaz između našeg teorijskog modela i stvarnosti i zatvara prvi ciklus ove metode. U drugom ciklusu, poboljšani detaljni model reaktora se koristi u ponovnoj optimizaciji reaktora i uslova procesa, uz moguću modifikaciju parametara optimizacije (funkcija cilja, ograničenja itd.). Ukoliko je povoljnija, nova optimizovana geometrija reaktora se zatim kreira pomoću 3D štampe, tako da se rezultati matematičkog modelovanja mogu još jednom verifikovati. Primenom ove metodologije će se obezbediti postizanje optimalnog dizajna reaktora uz minimalno ulaganje u eksperimentalnu opremu, kao i minimalno potrebno vreme za izvođenje eksperimenata. Šematski prikaz metodologije razvoja procesa sinteze prebiotika (GOS i FOS) koja je korišćena u ovoj tezi je prikazan na slici 1.13.



Slika 1.13. Metodologija za brzi razvoj optimizovanih enzimskih procesa (projekat IDEJE PrintPrEnzi)

U ovoj tezi su za modelovanje i optimizaciju procesa korišćeni softverski paketi MATLAB i gPROMS. U softverskom paketu MATLAB je izvršena estimacija kinetičkih parametara. Najpre je izvršena globalna optimizacija pomoću genetskog algoritma. Rezultat genetskog algoritma su vrednosti parametara koje su korišćene kao početne vrednosti za lokalnu optimizaciju. Algoritam koji se koristi prilikom pretrage je Nelder-Mead-ov algoritam koji rešava problem traženja minimuma nelinearne funkcije bez dodatnih ograničenja, pri čemu se ne koriste izvodi funkcije. Vrednosti parametara dobijene na ovaj način predstavljaju konačne vrednosti koje se usvajaju kao optimalne (Janković 2022). Za rešenje diferencijalnih jednačina koje opisuju brzine hemijskih reakcija korišćena je Runge-Kutta metoda, uključena u MATLAB (funkcija ode45).

U ovoj tezi je gPROMS korišćen za razvijanje dinamičkog modela i simulacije dinamičkog rada reaktora. Pri tom su korišćene metode tipa Runge-Kutta (ode) za rešavanje sistema običnih diferencijalnih jednačina, inkorporiranih u gPROMS. Paket gPROMS je korišćen i za optimizaciju radnih uslova u novom reaktoru, kao i estimaciju parametara korelacije koja opisuje strujanje. Za to je primenjena SQP gradijentna numerička metode optimizacije koja je uključena u gPROMS.

2. KINETIČKI MODELI I ESTIMACIJA KINETIČKIH PARAMETARA SINTEZE PREBIOTIKA

Cilj ovog dela rada je definisanje kinetičkog modela za enzimsku reakciju sinteze etabliranih prebiotika (galaktooligosaharida i fruktooligosaharida) koji opisuje eksperimentalne rezultate i pruža dodatni uvid u mehanizam ove reakcije. Dizajn i optimizacija procesa biohemijskih reaktora zahteva temeljno poznavanje kinetike reakcije i izvođenje mehaničkih modela koji mogu predvideti koncentracije komponenti u širokom opsegu uslova. Takođe, dobro poznavanje kinetičkog modela je važno, jer se može koristiti za analizu, projektovanje i optimizaciju procesa kontinualne proizvodnje prebiotika. Ispitane su mogućnosti za pojednostavljenje modela i smanjenja broja kinetičkih parametara. Na primer, ukoliko je međukorak u kome dolazi do vezivanja supstrata za enzim mnogo brži u poređenju sa drugim reakcijama, moguće je zanemariti ovaj korak i direktno prikazati nastanak aktiviranog enzimskog kompleksa. Takođe, vrlo često koncentracija vode ne figuriše u izrazima za brzinu enzimskih reakcija, jer se voda nalazi u velikom višku u reakcionoj smeši.

Rešavanje kinetičkog modela se vrši pomoću softvera koji ima adekvatne numeričke metode. Kako se reakcije odvijaju u šaržnom eksperimentalnom reaktoru jedina nezavisno promenljiva je vreme, pa se model sastoji od sistema običnih diferencijalnih jednačina. Neophodno je da sistem bude određen, odnosno da broj jednačina bude jednak broju hemijskih vrsta čije koncentracije se određuju. Rešenje ovakvog sistema su koncentracioni profili hemijskih vrsta, koji predstavljaju zavisnost koncentracije od vremena. Da bi sistem bio rešiv, vrednosti svih kinetičkih konstanti moraju da budu poznate. Pošto su enzimski katalizovane reakcije složene i odvijaju se u više koraka, u kinetičkim modelima koji ih opisuju figuriše više konstanti. Stoga je neophodno koristiti optimizacione algoritme za određivanje (estimaciju) parametara, a na osnovu minimizacije razlike (greške) modela u odnosu na eksperimentalne rezultate (Bogdanović 2019).

2.1. Galakto-oligosaharidi (GOS)

2.1.1. Eksperimenti sinteze GOS-a

Kinetika reakcije sinteze GOS-a eksperimentalno je ispitana u šaržnom reaktoru (tj. erlenmajeru) sa enzimom β -galaktozidazom dobijenim iz *A. orizae*. Reaktor, odnosno erlenmajer, se nalazi u orbitalnom šejkeru (IKA® KS 4000i control, Verke GmbH and Co. KG, Staufen, Nemačka) na brzini od 150 o/min. Reakciona smeša na početku se sastojala od 100 ml rastvora laktoze u puferu (koncentracije definisane u tabeli 2.1 za svaki eksperiment), dok je masa enzima bila 50 mg, 100 mg i 200 mg, takođe definisana za svaki eksperiment (tabela 2.1). Temperatura reakcije je bila konstantna (42 °C) za sve eksperimente, dok su ostali uslovi za svaki od osam izvedenih eksperimenata prikazani u tabeli 2.1. Svi eksperimenti su trajali 600 minuta, a uzorci su uzimani u određenim vremenskim intervalima, sa većom učestalošću tokom početnog perioda reakcije (ukupno 21 uzorak). Reakcija je zaustavljena zagrevanjem uzoraka u termo šejkeru (Eppendorf® ThermoMixer® C, Eppendorf,

Hamburg, Nemačka) na 100 °C. Nakon toga, uzorci su razblaženi dejonizovanom vodom, centrifugirani na 12000 rpm tokom 10 minuta, filtrirani pomoću filtera za špric od 0,45 µm i na kraju analizirani tečnom hromatografijom visokih performansi (HPLC) (Thermo Scientific, Valtham, MA, USA).

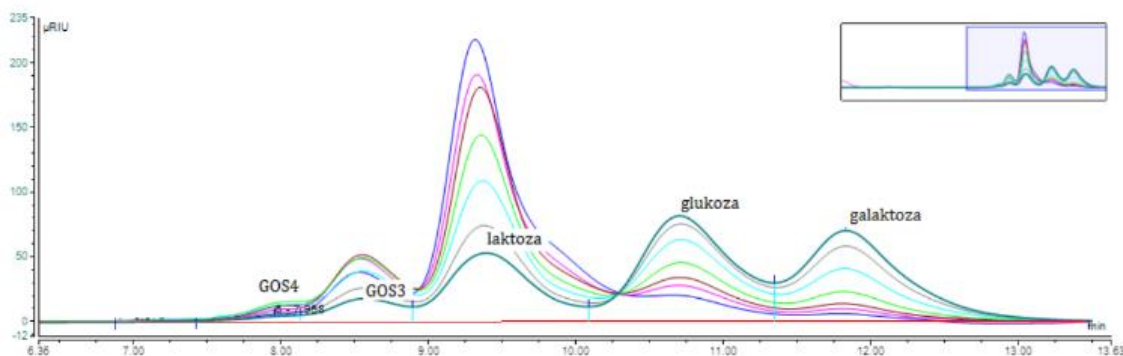
Tabela 2.1. Procesni uslovi izvedenih eksperimenata.

Redni broj eksperimenta	Početna koncentracija laktoze (mas.%)	Početna koncentracija enzima (mg/ml)
1	40	0,5
2	40	1
3	40	2
4	30	0,5
5	30	1
6	30	2
7	20	0,5
8	20	1

2.1.2. Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC)

Određivanje sastava jedinjenja šećera u uzorcima rađeno je hromatografskom metodom, tj. tečnom hromatografijom visokih performansi (HPLC, High-Pressure Liquid Chromatography) na Dionex Ultimate 300 Thermo Scientific. Metoda se zasniva na principu unošenja uzorka u rastvarač (mobilna faza) pod pritiskom kroz kolonu ispunjenom stacionarnom fazom. Adsorpcija jedinjenja iz tečne (mobilne) faze u stacionarnu fazu uslovljavaju različita vremena zadržavanja komponenti u koloni. Dakle, metoda je zasnovana na različitoj raspodeli retencionih vremena (zadržavanja) komponentata. HPLC je precizna metoda, koja može izvršiti identifikaciju čak i jedinjenja koja su u uzorku prisutna u tragovima (Carević 2016). Kontinuiran protok uzorka kroz stacionarnu fazu omogućen je visokim pritiskom pri čemu dolazi do uspostavljanja dinamičke ravnoteže komponenti uzoraka sa stacionarnom fazom u koloni.

HPLC aparat se sastoji od rezervoara za rastvarač uzorka (mobilna faza), pumpe visokog pritiska, kolone napunjene česticama stacionarne faze malih dimenzija, injektora i detektora. Odgovarajuća kvantifikacija je izvršena korišćenjem glukoze, galaktoze, laktoze, maltotrioze i maltotetraoze kao standarda. Analiza je izvedena korišćenjem dejonizovane vode kao mobilne faze sa brzinom eluiranja od 0,6 ml/min na šećernoj koloni (HiperREZ KSP Carbohidrat Ca²⁺, 300 mm k 7,7 mm, 8 mm) inkubiranoj na 80 °C. Detekcija proizvoda je postignuta korišćenjem RI detektora (RefractoMak 520, ERC GmbH, Riemerling, Nemačka) prethodno zagrejanog na 40 °C, a sva akvizicija i obrada podataka je obavljena pomoću Chromeleon 7.2 softvera. Na slici 2.1. je prikazan karakterističan izgled hromatograma (Carević 2016).



Slika 2.1. Tipični izgled hromatograma za sintezu GOS-a korišćenjem HPLC

2.1.3. Kinetički modeli sinteze GOS-a

U ovoj tezi je razvijeno i prikazano nekoliko sličnih modela sinteze GOS-a korišćenjem različitih koraka prikazanih u tabeli 2.2, sa između 5 i 8 kinetičkih parametara. Treba napomenuti da se u ovoj tezi neće razmatrati modeli koji uključuju inhibiciju proizvoda, jer u prethodnim istraživanjima (Carević i sar. 2016, Carević i sar. 2017.) nije primećen inhibitorni efekat.

Model 1 je izveden na osnovu literaturnih podataka i saznanja o stvarnom mehanizmu delovanja β -galaktozidaze (Palai i sar. 2012, Vera i sar. 2011, Zhou i sar. 2003, Kim i sar. 2004.) uključujući i sledeće pretpostavke: (1) formiranje kompleksa enzim-laktoza (EL) je zanemareno pod pretpostavkom da su brzine njegovog formiranja i razlaganja mnogo veće od brzina drugih koraka reakcije i (2) promena koncentracije vode tokom vremena se zanemaruje, jer je voda u višku (osim u modelu 6). Mehanizam modela 1 se sastoji od četiri povratne reakcije. U prvom koraku, enzim E i laktoza (L) formiraju kompleks enzim-galaktoza (EGAL) i glukozu (GLU), gde EGAL služi kao prekursor za druge korake. U drugom koraku, kompleks enzim-galaktoza se razlaže na enzim i galaktozu (GAL). U trećem koraku kompleks EGAL reaguje sa laktozom i formira trisaharide (GOS3). Zaključno, u četvrtom koraku EGAL stupa u interakciju sa GOS3 da bi se formirali tetrasaharidi (GOS4). Prvi i drugi korak reakcije predstavljaju reakcije hidrolize, dok treći i četvrti korak su transgalaktozilacija. U predloženim modelima, ključni intermedijer je kompleks enzim-galaktoza (EGAL) i efikasnost transgalaktozilacije je određena ponašanjem ovog kompleksa, što će detaljnije biti prikazano u delu 2.1.6. Pretpostavljeno je da su svi koraci reakcije za model 1 povratni. U modelima 2, 3, 4 i 5 su isprobane različite kombinacije nepovratnih koraka. Za razliku od prvih 5 modela, mehanizam modela 6 je pretpostavio uključivanje vode kao reaktanta i postojanje EL kompleksa enzima i laktoze. Ovaj model nije pokazao nikakva poboljšanja zbog pretpostavke da su brzine formiranja i razlaganja EL kompleksa mnogo veće od brzina drugih koraka reakcije, pa je izostavljen za dalje analize.

Tabela 2.2. Različiti mehanizmi sinteze GOS-a.

Naziv modela	Mehanizam	Jednačine modela
Model 1	$E + L \xrightleftharpoons{k_1, k_2} EGAL + GLU$ $EGAL \xrightleftharpoons{k_3, k_4} E + GAL$ $EGAL + L \xrightleftharpoons{k_5, k_6} E + GOS3$ $EGAL + GOS3 \xrightleftharpoons{k_7, k_8} E + GOS4$	$\frac{dC_L}{dt} = k_2 C_{EGAL} C_{GLU} - k_1 C_E C_L + k_6 C_E C_{GOS3} - k_5 C_{EGAL} C_L$ $\frac{dC_{EGAL}}{dt} = k_1 C_E C_L - k_2 C_{EGAL} C_{GLU} + k_4 C_E C_{GAL} - k_3 C_{EGAL} - k_5 C_{EGAL} C_L + k_6 C_E C_{GOS3} - k_7 C_{EGAL} C_{GOS3} + k_8 C_E C_{GOS4}$ $\frac{dC_E}{dt} = -\frac{dC_{EGAL}}{dt}$ $\frac{dC_{GLU}}{dt} = k_1 C_E C_L - k_2 C_{EGAL} C_{GLU}$ $\frac{dC_{GAL}}{dt} = k_3 C_{EGAL} - k_4 C_E C_{GAL}$ $\frac{dC_{GOS3}}{dt} = k_5 C_{EGAL} C_L - k_6 C_E C_{GOS3} + k_8 C_E C_{GOS4} - k_7 C_{EGAL} C_{GOS3}$ $\frac{dC_{GOS4}}{dt} = k_7 C_{EGAL} C_{GOS3} - k_8 C_E C_{GOS4}$
Model 2	$E + L \xrightleftharpoons{k_1, k_2} EGAL + GLU$ $EGAL \xrightarrow{k_3} E + GAL$ $EGAL + L \xrightleftharpoons{k_4, k_5} E + GOS3$ $EGAL + GOS3 \xrightleftharpoons{k_6, k_7} E + GOS4$	$\frac{dC_L}{dt} = k_2 C_{EGAL} C_{GLU} - k_1 C_E C_L + k_5 C_E C_{GOS3} - k_4 C_{EGAL} C_L$ $\frac{dC_{EGAL}}{dt} = k_1 C_E C_L - k_2 C_{EGAL} C_{GLU} - k_3 C_{EGAL} - k_4 C_{EGAL} C_L + k_5 C_E C_{GOS3} - k_6 C_{EGAL} C_{GOS3} + k_7 C_E C_{GOS4}$ $\frac{dC_E}{dt} = -\frac{dC_{EGAL}}{dt}$ $\frac{dC_{GLU}}{dt} = k_1 C_E C_L - k_2 C_{EGAL} C_{GLU}$ $\frac{dC_{GAL}}{dt} = k_3 C_{EGAL}$ $\frac{dC_{GOS3}}{dt} = k_4 C_{EGAL} C_L - k_5 C_E C_{GOS3} + k_7 C_E C_{GOS4} - k_6 C_{EGAL} C_{GOS3}$ $\frac{dC_{GOS4}}{dt} = k_6 C_{EGAL} C_{GOS3} - k_7 C_E C_{GOS4}$
Model 3	$E + L \xrightarrow{k_1} EGAL + GLU$ $EGAL \xrightleftharpoons{k_2, k_3} E + GAL$	$\frac{dC_L}{dt} = -k_1 C_E C_L + k_5 C_E C_{GOS3} - k_4 C_{EGAL} C_L$

	$EGAL + L \xrightleftharpoons[k_5]{k_4} E + GOS3$ $EGAL + GOS3 \xrightleftharpoons[k_7]{k_6} E + GOS4$	$\frac{dC_{EGAL}}{dt} = k_1 C_E C_L + k_3 C_E C_{GAL} - k_2 C_{EGAL} - k_4 C_{EGAL} C_L$ $+ k_5 C_E C_{GOS3} - k_6 C_{EGAL} C_{GOS3} + k_7 C_E C_{GOS4}$ $\frac{dC_E}{dt} = -\frac{dC_{EGAL}}{dt}$ $\frac{dC_{GLU}}{dt} = k_1 C_E C_L$ $\frac{dC_{GAL}}{dt} = k_2 C_{EGAL} - k_3 C_E C_{GAL}$ $\frac{dC_{GOS3}}{dt} = k_4 C_{EGAL} C_L - k_5 C_E C_{GOS3} + k_7 C_E C_{GOS4}$ $- k_6 C_{EGAL} C_{GOS3}$ $\frac{dC_{GOS4}}{dt} = k_6 C_{EGAL} C_{GOS3} - k_7 C_E C_{GOS4}$
Model 4	$E + L \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} EGAL + GLU$ $EGAL \xrightarrow{k_3} E + GAL$ $EGAL + L \xrightarrow{k_4} E + GOS3$ $EGAL + GOS3 \xrightleftharpoons[k_6]{k_5} E + GOS4$	$\frac{dC_L}{dt} = k_2 C_{EGAL} C_{GLU} - k_1 C_E C_L - k_4 C_{EGAL} C_L$ $\frac{dC_{EGAL}}{dt} = k_1 C_E C_L - k_2 C_{EGAL} C_{GLU} - k_3 C_{EGAL} - k_4 C_{EGAL} C_L$ $- k_5 C_{EGAL} C_{GOS3} + k_6 C_E C_{GOS4}$ $\frac{dC_E}{dt} = -\frac{dC_{EGAL}}{dt}$ $\frac{dC_{GLU}}{dt} = k_1 C_E C_L - k_2 C_{EGAL} C_{GLU}$ $\frac{dC_{GAL}}{dt} = k_3 C_{EGAL}$ $\frac{dC_{GOS3}}{dt} = k_4 C_{EGAL} C_L + k_6 C_E C_{GOS4} - k_5 C_{EGAL} C_{GOS3}$ $\frac{dC_{GOS4}}{dt} = k_5 C_{EGAL} C_{GOS3} - k_6 C_E C_{GOS4}$
Model 5	$E + L \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} EGAL + GLU$ $EGAL \xrightarrow{k_3} E + GAL$ $EGAL + L \xrightarrow{k_4} E + GOS3$ $EGAL + GOS3 \xrightarrow{k_5} E + GOS4$	$\frac{dC_L}{dt} = k_2 C_{EGAL} C_{GLU} - k_1 C_E C_L - k_4 C_{EGAL} C_L$ $\frac{dC_{EGAL}}{dt} = k_1 C_E C_L - k_2 C_{EGAL} C_{GLU} - k_3 C_{EGAL} - k_4 C_{EGAL} C_L$ $- k_5 C_{EGAL} C_{GOS3}$ $\frac{dC_E}{dt} = -\frac{dC_{EGAL}}{dt}$ $\frac{dC_{GLU}}{dt} = k_1 C_E C_L - k_2 C_{EGAL} C_{GLU}$ $\frac{dC_{GAL}}{dt} = k_3 C_{EGAL}$

		$\frac{dC_{GOS3}}{dt} = k_4 C_{EGAL} C_L - k_5 C_{EGAL} C_{GOS3}$ $\frac{dC_{GOS4}}{dt} = k_5 C_{EGAL} C_{GOS3}$
Model 6	$E + L \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} EL$ $EL \xrightarrow{k_3} EGAL + GLU$ $EGAL + H_2O \xrightarrow{k_4} E + GAL$ $EGAL + L \xrightleftharpoons[k_6]{k_5} E + GOS3$ $EGAL + GOS3 \xrightleftharpoons[k_8]{k_7} E + GOS4$	$\frac{dC_L}{dt} = k_2 C_{EL} - k_1 C_E C_L + k_6 C_E C_{GOS3} - k_5 C_{EGAL} C_L$ $\frac{dC_{EGAL}}{dt} = k_3 C_{EL} - k_4 C_{EGAL} C_{H2O} - k_5 C_{EGAL} C_L + k_6 C_E C_{GOS3} - k_7 C_{EGAL} C_{GOS3} + k_8 C_E C_{GOS4}$ $\frac{dC_{GLU}}{dt} = k_3 C_{EL}$ $\frac{dC_{EL}}{dt} = k_1 C_E C_L - k_2 C_{EL} - k_3 C_{EGAL} C_{GLU}$ $\frac{dC_{GAL}}{dt} = k_4 C_{EGAL} C_{H2O}$ $\frac{dC_{H2O}}{dt} = -k_4 C_{EGAL} C_{H2O}$ $\frac{dC_{GOS3}}{dt} = k_5 C_{EGAL} C_L - k_6 C_E C_{GOS3} + k_8 C_E C_{GOS4} - k_7 C_{EGAL} C_{GOS3}$ $\frac{dC_{GOS4}}{dt} = k_7 C_{EGAL} C_{GOS3} - k_8 C_E C_{GOS4}$

Materijalni bilansi svih sedam komponenti koje se razmatraju u reakcionim mehanizmima (tj. Osam komponenti za model 6) u šaržnom reaktoru konstantne zapremine su predstavljeni običnim diferencijalnim jednačinama u tabeli 2.2. Model 2 je pojednostavljena verzija Modela 1, pri čemu se pretpostavlja da je korak 2 nepovratan i jednačine za komponente E, GAL i EGAL se shodno tome menjaju.

Početni uslovi odgovaraju početnim koncentracijama svih komponenti u sistemu (tj. C_{L0} i C_{E0} za laktozu i enzim i nula za ostale komponente). Skup običnih diferencijalnih jednačina je rešen u Matlabu pomoću potprograma *ode23s*, koji koristi Runge-Kutta numeričku metodu za integraciju.

2.1.4. Estimacija parametara modela

U cilju određivanja, tj. Estimacije parametara najpre je izvršena globalna optimizacija pomoću genetskog algoritma. Za pozivanje genetskog algoritma u softverskom paketu MATLAB se koristi naredba *ga*, pri čemu se osobine algoritma prethodno podešavaju naredbom *gaoptimset*. Rezultat genetskog algoritma su vrednosti parametara koje su korišćene kao početne vrednosti za lokalnu optimizaciju. Lokalna optimizacija u MATLABu je izvedena pomoću naredbe *fminsearch* (detaljnije objašnjeno u master radu Janković 2022). Ova funkcija pronalazi lokalni minimum funkcije u zavisnosti od zadate početne vrednosti. Algoritam koji se koristi prilikom pretrage je Nelder-Mead-ov algoritam koji rešava problem traženja minimuma nelinearne funkcije bez dodatnih ograničenja,

pri čemu se ne koriste izvodi funkcije. Vrednosti parametara dobijene na ovaj način predstavljaju konačne vrednosti koje se usvajaju kao optimalne.

Kao funkcija cilja korišćena je suma kvadrata relativne razlike, koja se može prikazati sledećom formulom:

$$F_{cilja} = \sum_{i=1}^{N_{resp}} \sum_{j=1}^{N_{exp}} \left(\frac{C_{i,j}^{exp} - C_{i,j}^{cal}}{C_{i,j}^{exp}} \right)^2 \quad (2.1)$$

gde je N_{resp} broj merenja za svaku komponentu koja se analizira, N_{exp} je broj eksperimenata, $C_{i,j}^{exp}$ je koncentracija komponente u eksperimentu, $C_{i,j}^{cal}$ je izračunata koncentracija komponente. Funkcija cilja, F_{cilja} uključuje samo pet komponenata (L, GLU, GAL, GOS3 i GOS4) zbog toga što koncentracije enzima i EGAL kompleksa nisu merljive. Ukupno je 945 eksperimentalnih tačaka istovremeno korišćeno u estimacijama parametara testiranih modela, pri čemu je za svaki model dobijen jedan set kinetičkih parametara.

Za procenu kvaliteta slaganja modela sa eksperimentalnim podacima, korišćena je srednja greška između eksperimentalnih i predskazanih brzina reakcije:

$$SRPG(\%) = \sum_{i=1}^{N_{resp}} \sum_{j=1}^{N_{exp}} \left| \frac{C_{i,j}^{exp} - C_{i,j}^{cal}}{C_{i,j}^{exp}} \right| \times \frac{1}{N_{resp}N_{exp}} \times 100\% \quad (2.2)$$

Pošto su modeli 2, 3, 4 i 5 izvedeni na osnovu modela 1, dobijene vrednosti odgovarajućih parametara modela 1 su korišćene prilikom zadavanja inicijalne populacije za estimacije ostalih modela, dok su početne vrednosti preostalih parametara definisane kao 0. Estimacije za pojedine modele su zatim ponavljane više puta, a svaki put su vrednosti parametara dobijene u jednoj estimaciji korišćene kao inicijalna populacija za sledeću. Na ovaj način se izbegava lokalni minimum, a postepeno je smanjivana greška modela.

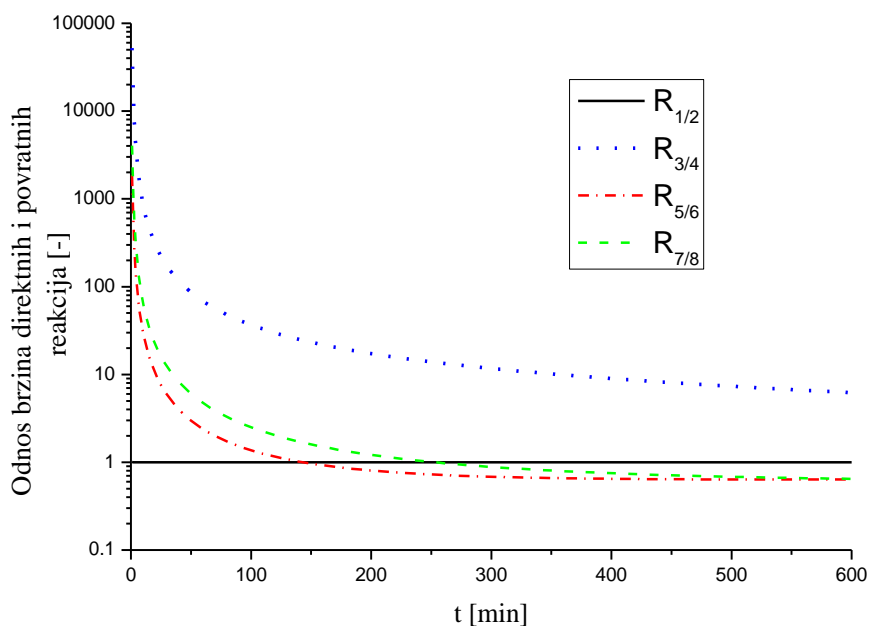
2.1.5. Odabir najboljeg kinetičkog modela enzimske sinteze GOS-a

U tabeli 2.3 su prikazani estimirani kinetički parametri za šest testiranih modela. Model 1 je dao najbolje rezultate u pogledu vrednosti apsolutnih srednjih grešaka (SRPG = 9,31 %). Međutim, model 1 je takođe jedan od složenijih modela koji je korišćen u analizi, sa četiri povratne reakcije i osam kinetičkih parametara. Model 2, koji je pojednostavljena verzija modela 1 i pretpostavlja da je drugi korak (razgradnja kompleksa enzim-galaktoza) nepovratan i samim tim ima jedan parametar manje, pokazao je veoma sličan kvalitet slaganja sa vrednošću SRPG od 9,34 %. U modelu 3, u kome je pretpostavljeno da je prvi korak nepovratan (stvaranje kompleksa enzim-galaktoza), dobijen je dosta lošiji kvalitet slaganja sa vrednošću greške od 30,64 %. Model 4 je dao sličnu grešku kao i model 3, ali sa jednim parametrom manje (drugi i treći korak su bili nepovratni). Model 5 je sadržao pet kinetičkih parametara sa samo prvom povratnom reakcijom, ali je greška iznosila 37,64 %. Mehanizam modela 6 je uključivao vodu kao reaktant, ali je pokazao najlošije slaganje (greška je bila čak 71%).

Tabela 2.3. Vrednosti kinetičkih parametara ispitanih modela.

Model	Parametar	Vrednost	SRPG (%)	Model	Parametar	Vrednost	SRPG (%)
Model 1	k ₁ (l/mmol/min)	$5,90 \cdot 10^4$	9,31	Model 4	k ₁ (l/mmol/min)	$5,65 \cdot 10^4$	29,13
	k ₂ (l/mmol/min)	$4,69 \cdot 10^5$			k ₂ (l/mmol/min)	873,77	
	k ₃ (1/min)	$7,35 \cdot 10^3$			k ₃ (1/min)	12,75	
	k ₄ (l/mmol/min)	0,1513			k ₄ (l/mmol/min)	$1,52 \cdot 10^6$	
	k ₅ (l/mmol/min)	7,99			k ₅ (l/mmol/min)	11,79	
	k ₆ (l/mmol/min)	4,22			k ₆ (l/mmol/min)	$1,42 \cdot 10^6$	
	k ₇ (l/mmol/min)	11,87					
	k ₈ (l/mmol/min)	3,89					
Model 2	k ₁ (l/mmol/min)	$7,62 \cdot 10^4$	9,34	Model 5	k ₁ (l/mmol/min)	$2,39 \cdot 10^4$	37,64
	k ₂ (l/mmol/min)	$6,86 \cdot 10^5$			k ₂ (l/mmol/min)	$1,21 \cdot 10^3$	
	k ₃ (1/min)	$7,71 \cdot 10^3$			k ₃ (1/min)	11,92	
	k ₄ (l/mmol/min)	8,38			k ₄ (l/mmol/min)	$5,41 \cdot 10^5$	
	k ₅ (l/mmol/min ⁻¹)	3,94			k ₅ (l/mmol/min)	0,536	
	k ₆ (l/mmol/min)	12,66					
	k ₇ (l/mmol/min)	3,65					
Model 3	k ₁ (l/mmol/min)	978,87	30,64	Model 6	k ₁ (l/mmol/min)	69,81	71,08
	k ₂ (1/min)	913,35			k ₂ (l/mmol/min)	57,57	
	k ₃ (l/mmol/min)	0,942			k ₃ (1/min)	197,09	
	k ₄ (l/mmol/min)	10,84			k ₄ (l/mmol/min)	58,70	
	k ₅ (l/mmol/min)	$2,07 \cdot 10^4$			k ₅ (l/mmol/min)	25,29	
	k ₆ (l·mmol ⁻¹ ·min)	9,56			k ₆ (l/mmol/min)	27,34	
	k ₇ (l/mmol/min)	$1,90 \cdot 10^4$			k ₇ (l/mmol/min)	84,20	
					k ₈ (l/mmol/min)	54,92	

Razgradnja kompleksa enzim-galaktoza je dalje analizirana uzimanjem u obzir odnosa brzina direktnih i povratnih reakcija za sve korake reakcije u modelu 1. Vrednosti ovih odnosa su prikazane na slici 2.2 za odabrane eksperimentalne uslove. Zbog visokih početnih vrednosti, one su prikazane u logaritamskoj skali. Može se videti da je odnos brzina reakcije u koraku 1 ($R_{1/2}$) najniži za sva vremena reakcije u svim eksperimentima i da je ta vrednost blizu 1. Ovaj rezultat ukazuje da je prvi korak zaista povratan kao što se pretpostavlja u modelu 1. Nasuprot tome, odnos brzina reakcija u koraku 2 ($R_{3/4}$) je veoma visok u svim eksperimentima, posebno na početku reakcije, gde je direktna reakcija hiljadama puta brža od povratne. Iako se ovaj odnos brzo smanjuje tokom vremena, on ostaje najviši od sva četiri koraka reakcije sa vrednostima od 40 – 100 za 100 min i oko 7 za vreme iznad 450 min. Dakle, brzina povratne reakcije za korak 2 je znatno niža od brzine direktne reakcije i pretpostavka da se ona može zanemariti (što je prikazano u modelu 2) je opravdana. Zbog toga će se u daljoj diskusiji o rezultatima u ovoj tezi fokusirati uglavnom na model 2, pošto je to model sa dobrim karakteristikama, a sadrži manji broj parametara. Takođe, odnosi brzina reakcije u koraku 3 ($R_{5/6}$) i koraku 4 ($R_{7/8}$) imaju veoma visoke vrednosti na početku reakcije, ali su u kasnijim fazama blizu 1, što potvrđuje da su reakcije povratne.



Slika 2.2. Odnosi brzina direktnih i povratnih reakcija za model 1 za početnu koncentraciju laktoze od 40 mas.% i početnu koncentraciju enzima od 1 mg/ml

U ovoj tezi su takođe analizirane srednje greške za pojedine komponente u svim eksperimentima i za sve modele. Ove vrednosti za model 2 su prikazane u tabeli 2.4. Pokazalo se da je ukupno slaganje prihvatljivo za sve komponente i eksperimente, pri čemu se laktoza najbolje slaže (greška je iznosila 5,28 %), a GOS najlošije (sa greškom od 12,51 %). Treba napomenuti da su proizvodi GOS3 i GOS4 grupisani u jednu komponentu i izraženi kao GOS, zbog veoma malih brzina formiranja GOS4, kao i veoma malih dobijenih koncentracija ove komponente, a samim tim i znatno većih eksperimentalnih grešaka za ovu komponentu. Veoma slični rezultati za komponente i eksperimente uočeni su i u analizi grašaka za model 1 (nije prikazano u tezi), dok su ostali modeli rezultirali mnogo većim vrednostima grešaka.

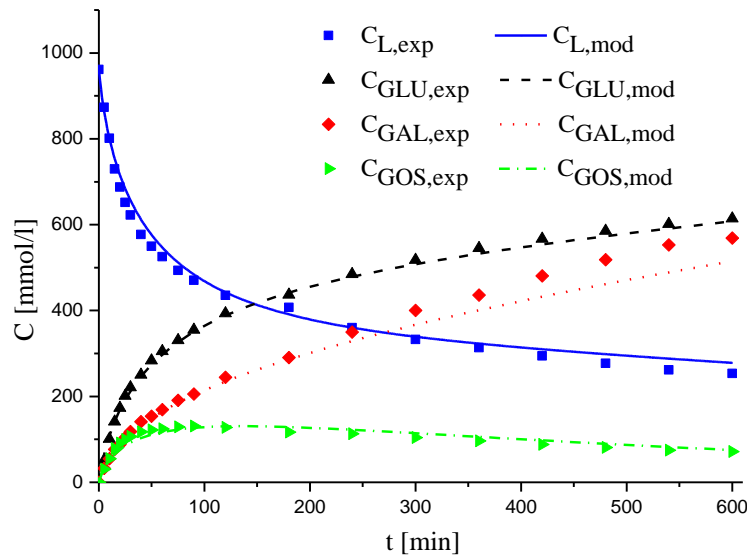
Tabela 2.4. Odstupanja modela po komponentama za model 2. Sve vrednosti su date u %.

Exp/komp	L	GLU	GAL	GOS	srednja vrednost
1.	3.72	15.99	12.46	3.36	8.88
2.	3.17	10.96	10.93	6.69	7.94
3.	6.83	8.21	20.70	21.10	14.21
4.	4.98	14.63	4.69	12.69	9.25
5.	4.21	3.57	5.22	8.97	5.49
6.	5.48	4.32	7.85	11.86	7.38
7.	7.43	3.62	10.53	20.60	10.55
8.	6.42	4.69	18.13	14.78	11.00
srednja vrednost	5.28	8.25	11.31	12.51	SRPG=9.34

(L-laktoza, GLU-glukoza, GAL-galaktoza, GOS-galaktoologosaharidi)

Na slici 2.3 su prikazani eksperimentalni rezultati za model 2 za početne koncentracije laktoze od 30 mas. %. Može se videti da je koncentracija laktoze naglo opadala prvih 200 min, a zatim nastavila da opada sporije. Koncentracije glukoze i galaktoze su se povećavale tokom eksperimenta, pri čemu su obe imale veće brzine formiranja tokom početnog intervala, a zatim su sporije rasle. Primećeno je da je koncentracija galaktoze niža u poređenju sa glukozom u svim eksperimentima, što je tipično za sintezu GOS-a (Jenab i sar. 2018, Cinar i sar. 2020, Schultz i sar. 2021, Pravilović i sar.

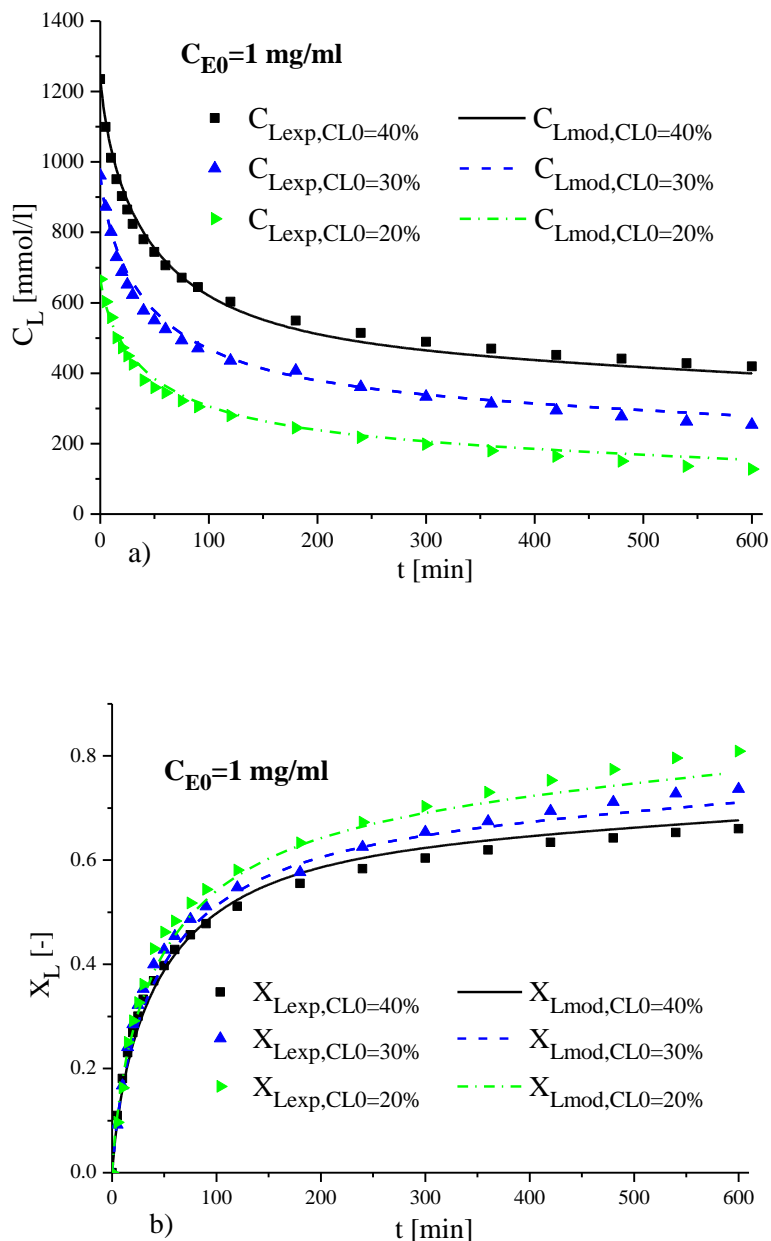
2022.). To je zato što se glukoza oslobađa u reakciji 1 (tabela 2.2), dok se samo deo galaktoze ugrađene u EGAL oslobađa u reakciji 2, a ostatak se pretvara u GOS u reakcijama 3 i 4. Koncentracija GOS se povećava za početni interval od ~ 100 min, dostiže maksimum, a zatim se blago smanjuje. Pokazalo se da model 2 veoma dobro prati sve uočene kvalitativne i kvantitativne trendove.



Slika 2.3. Rezultati modela 2 (linija) i eksperimentalne vrednosti (tačke) za reakciju sa slobodnim enzimom: početna koncentracija rastvora laktoze 30 mas.% i enzima 1 mg/ml

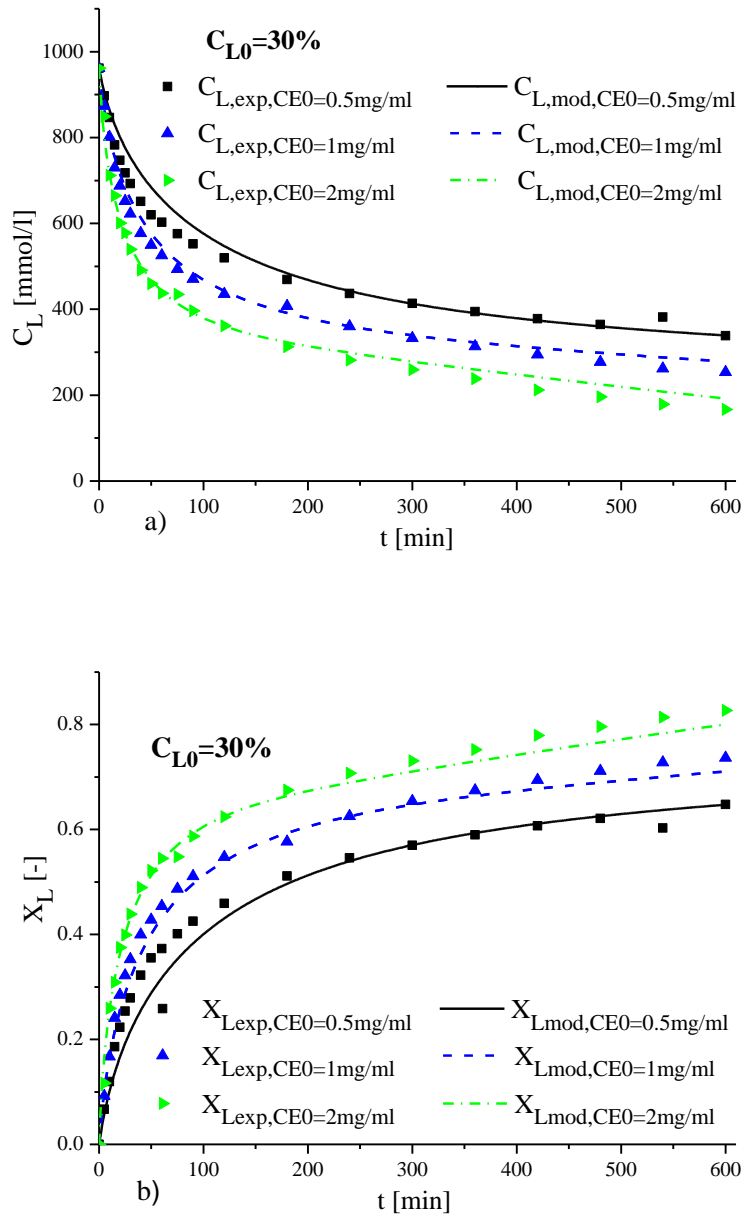
Na slikama 2.4 i 2.5 su prikazane zavisnosti koncentracije i konverzije laktoze u eksperimentima kao i po modelu 2, pri različitim početnim koncentracijama laktoze (20, 30 i 40 mas.%) i enzima (0,5, 1 i 2 mg/ml). Kao što se može videti sa slika, model 2 dobro predviđa kvalitativni uticaj početnih koncentracija laktoze i enzima.

Sa slike 2.4a se može videti da je trend promene koncentracije laktoze sa vremenom isti za sve tri početne koncentracije laktoze i da se najveća koncentracija laktoze (420 mmol/l nakon 600 min) dobija za $C_{L0}=40$ mas.%. Najveća konverzija laktoze (oko 80 %) postignuta je za najnižu vrednost početne koncentracije laktoze (slika 2.4b, zeleno).



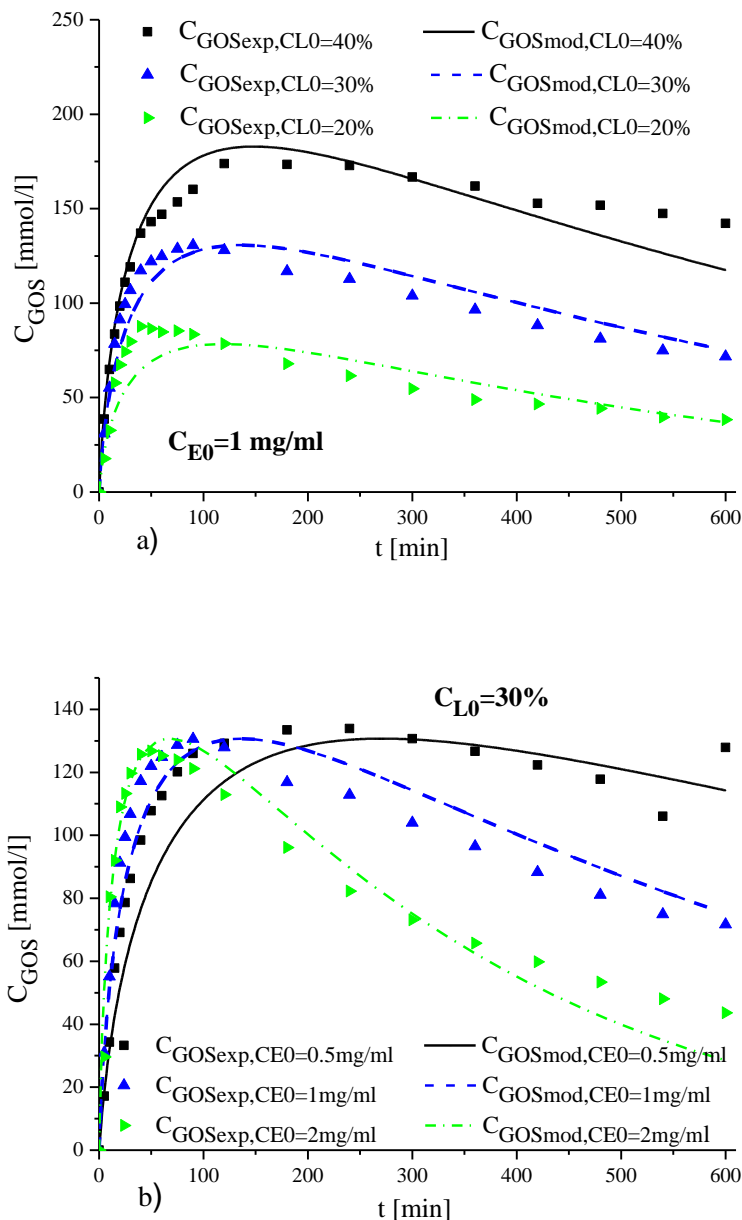
Slika 2.4. Zavisnost koncentracije (a) i konverzije (b) laktoze po eksperimentu i modelu 2 pri različitim početnim koncentracijama laktoze

Efekat koncentracije enzima na potrošnju laktoze je jednostavniji, pošto je jasno pokazano da veća koncentracija enzima favorizuje veću potrošnju laktoze, kako u pogledu koncentracije tako i u pogledu konverzije (slike 2.5a i b). Povećanje koncentracije enzima sa 0,5 na 1,0 mg/ml blago povećava konverziju laktoze sa 65 na 74 %, dok povećanje koncentracije enzima na 2 mg/ml dovodi do konverzije od 83 %. Takođe, važno je napomenuti da predloženi model 2 dobro predviđa ove trendove, što se jasno može videti sa slika.



Slika 2.5. Zavisnost koncentracije (a) i konverzije (b) laktoze po eksperimentu i modelu 2 pri različitim početnim koncentracijama enzima

Na slici 2.6a se uočava da je koncentracija GOS direktno povezana sa početnom koncentracijom laktoze, pri čemu je maksimalna koncentracija GOS u eksperimentu sa 20 mas.% laktoze oko 85 mmol/l, a u eksperimentu sa 40 mas.% laktoze oko 170 mmol/l. Ovaj rezultat je u skladu sa nekoliko istraživanja koja su pokazala da se najveća proizvodnja GOS postiže sa najvišom početnom koncentracijom laktoze (Palai i sar. 2012, Jenab i sar. 2018, Cinar i sar. 2020.). Takođe, utvrđeno je da je prinos GOS bio približno 21 %. Sa slike 2.6a se može videti da koncentracija GOS prolazi kroz maksimum u svim eksperimentima. Što je veća početna koncentracija laktoze, duže će biti potrebno da se postigne maksimalna koncentracija GOS. Kao što je ranije navedeno, nakon početnog perioda od 100 – 200 minuta i prolaska kroz maksimum, koncentracija GOS se smanjuje. Ovo je povezano sa povratnom reakcijom sinteze GOS. Takođe, kao što se može videti na slici 2.6a, svi navedeni trendovi su veoma dobro predviđeni predloženim modelom.

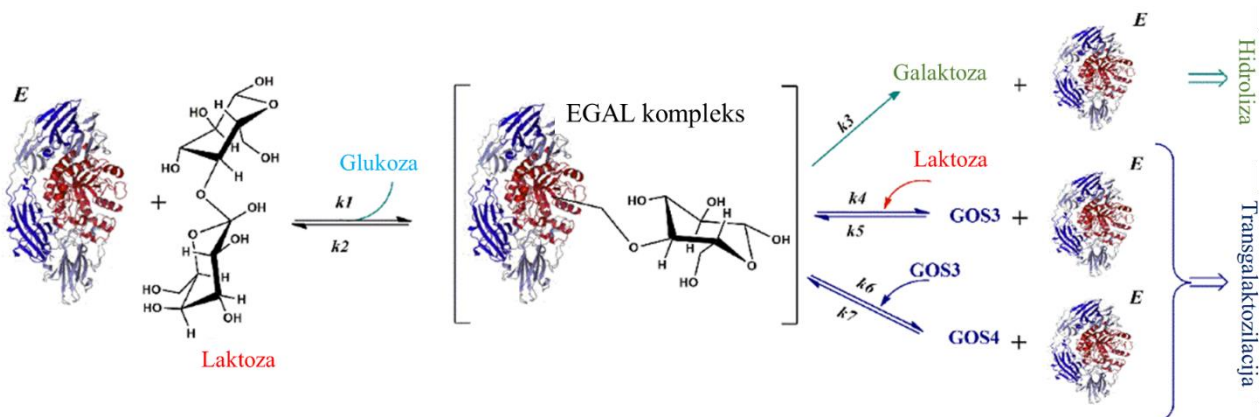


Slika 2.6. Zavisnost koncentracije GOS po eksperimentu i modelu 2 pri različitim početnim koncentracijama laktoze (a) i enzima (b)

Dok je koncentracija laktoze imala značajan uticaj na brzinu formiranja GOS, kao i na maksimalne vrednosti, uočene maksimalne koncentracije GOS su imale približno istu vrednost bez obzira na količinu korišćenog enzima (slika 2.6b). Veća koncentracija enzima je značajno smanjila vreme potrebno da se postigne maksimalna koncentracija GOS, pa je tako bilo potrebno približno 50, 100 i 200 minuta za početnu koncentraciju enzima od 2,0, 1,0 i 0,5 mg/ml, respektivno. Ovo znači da koncentracija enzima prevenstveno utiče na početnu brzinu reakcije sinteze GOS, koja je brža za veće CE_0 . Međutim, loša strana upotrebe visokih koncentracija enzima je to što one takođe rezultiraju mnogo bržim smanjenjem koncentracije GOS-a nakon što je dostignut maksimum, pošto enzim povećava brzinu reakcija razlaganja GOS-a prema koracima 3 i 4 predloženog modela. Ovo pruža mogućnost za simultanu optimizaciju koncentracije enzima i vremena odigravanja reakcije. Treba napomenuti da model dobro predviđa kvalitativne trendove.

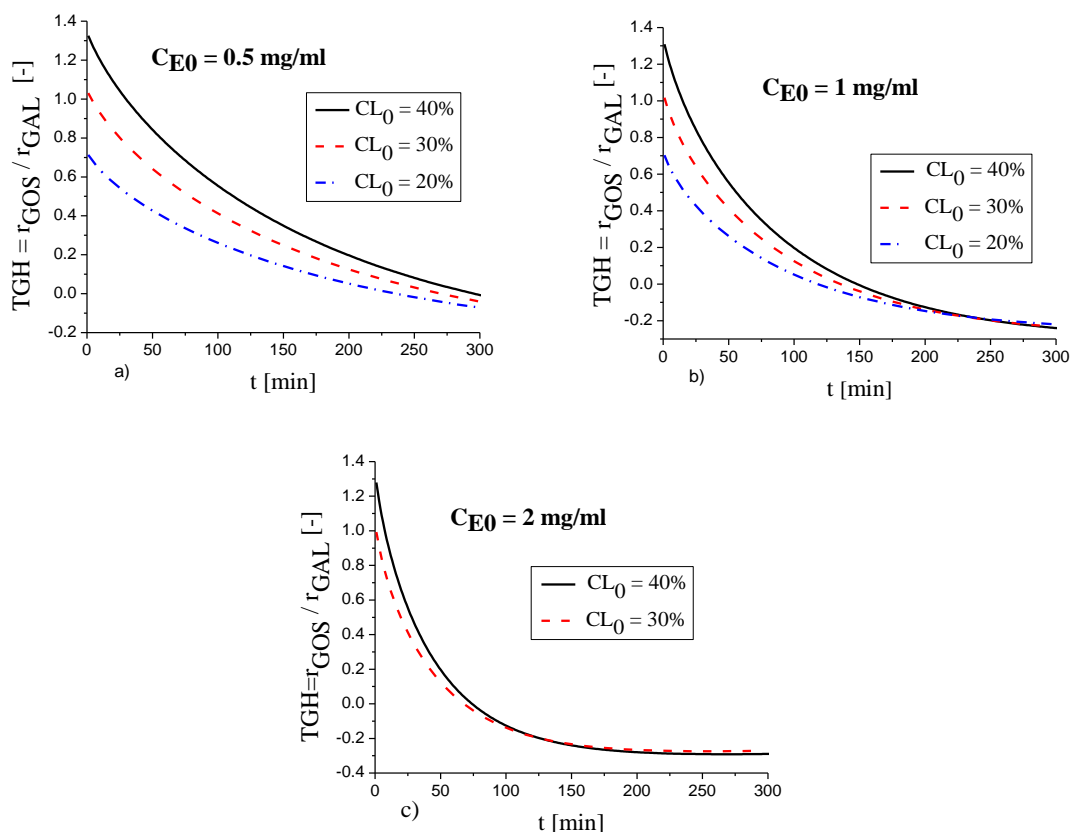
2.1.6. Analiza brzine sinteze GOS i brzine hidrolize

Enzimi koji katalizuju reakciju sinteze GOS obično katalizuju i reakciju hidrolize. Zato je predloženi model 2 iskorišćen za analizu efekata procesnih uslova na brzine kompetitivnih reakcija transgalaktozilacije i hidrolize. Osnovna biološka uloga β -galaktozidaze je hidroliza laktoze, ali je njena sekundarna katalitička aktivnost ključna u transgalaktozilaciji (u sintezi GOS). U predloženom modelu, kao i u svim modelima koji su ispitivani, ključni intermedijer je kompleks enzim-galaktoza (EGAL). Efikasnost transgalaktozilacije je određena daljim ponašanjem ovog kompleksa (slika 2.7). Odnos brzine formiranja GOS (dC_{GOS}/dt) i formiranja galaktoze (dC_{GAL}/dt) tokom reakcije određuje afinitet enzima prema reakciji transgalaktozilacije. Taj odnos transgalaktozilacije/hidrolize (TGH odnos) je korišćen u analizi efekta procesnih uslova.



Slika 2.7. Mehanizam enzimske katalizovane reakcije transformacije laktoze putem transgalaktozilacije i hidrolize

U nekoliko prethodnih studija (Gosling i sar. 2011, Gonzalez-Catano i sar. 2017, Jenab i sar. 2018, Cinar i sar. 2020.) pokazano je da je početna koncentracija laktoze najvažniji reakcioni parametar koji utiče na maksimalnu postignutu koncentraciju GOS. Na slici 2.8 je analiziran efekat koncentracije laktoze na odnos transgalaktozilacije/hidrolize (TGH odnos) upoređivanjem eksperimenata izvedenih pri jednakim koncentracijama enzima i različitim koncentracijama laktoze. U svim eksperimentima, TGH odnos se smanjivao tokom vremena reakcije, a transgalaktozilacija je bila dominantna samo u početnoj fazi reakcije (TGH odnos > 1). Ovakvo ponašanje je u skladu sa činjenicom da je vrednost konstante brzine hidrolize (k_3 , tabela 2.3) daleko veća od vrednosti konstanti brzina odgovornih za transgalaktozilaciju (k_4 i k_6). Takođe, ireverzibilnost stvaranja galaktoze (slika 2.2) obezbeđuje značajan obim ove reakcije tokom celog toka reakcije, dok su reakcije formiranja GOS povratne sa sve većim efektom povratnih reakcija u kasnijoj fazi reakcije usled povećane koncentracije proizvoda (GOS).

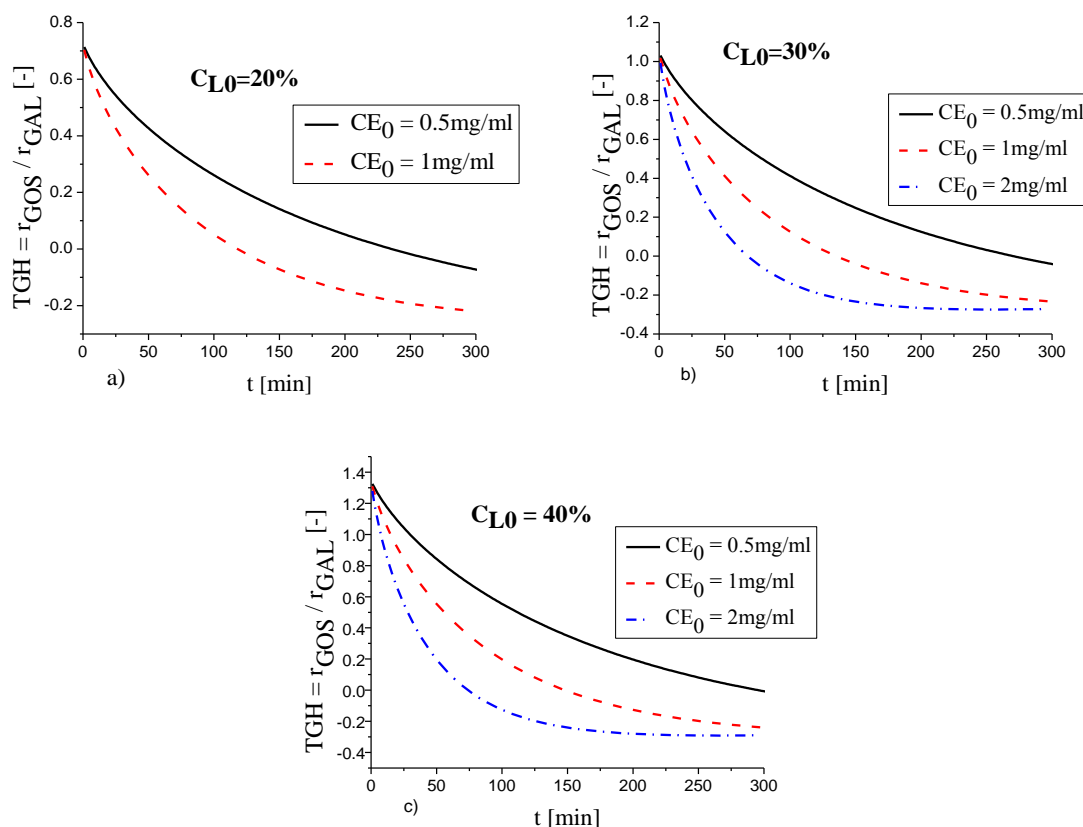


Slika 2.8. Efekat početne koncentracije laktoze na TGH odnos pri početnoj koncentraciji enzima od: a) 0,5 mg/ml; b) 1,0 mg/ml i c) 2,0 mg/ml

Svi rezultati potvrđuju pozitivan efekat povećanja koncentracije laktoze na afinitet reakcije transgalaktozilacije, iako u kasnijoj fazi reakcione krive konvergiraju niskim vrednostima TGH odnosa. Iz mehanizma reakcije je evidentno da laktoza direktno utiče na transgalaktozilaciju kao supstrat u reakciji 4 (formiranje GOS3). Dakle, njegova veća koncentracija usmerava veći deo EGAL kompleksa ka formiranju GOS3, što se manifestuje kao veća brzina transgalaktozilacije pri višoj koncentraciji laktoze. Usled smanjene koncentracije laktoze i povećane brzine hidrolize GOS, sa napredovanjem reakcije ova odstupanja postaju sve manja. Kada degradacija GOS-a postane brža od njegovog formiranja, odnosi TGH padaju ispod nule.

Takođe, može se primetiti da je pri najnižoj koncentraciji enzima (slika 2.8a) ovaj efekat najizraženiji, dok su pri višim koncentracijama krive bliže jednoj drugoj.

Efekat početne koncentracije enzima na TGH odnos je detaljnije prikazan na slici 2.9, gde su prikazani odnosi TGH pri konstantnim početnim koncentracijama laktoze. Veća koncentracija enzima dovodi do brže promene TGH odnosa, zbog činjenice da je ukupna koncentracija EGAL kompleksa veća. Početna koncentracija enzima ne utiče na dalju distribuciju kompleksa EGAL, što je prvenstveno diktirano koncentracijom laktoze, ali utiče na vreme potrebno da se postigne dominacija reakcije transgalaktozilacije.



Slika 2.9. Efekat početne koncentracije enzima na TGH odnos pri početnoj koncentraciji laktoze od: a) 20 mas.%; b) 30 mas.% i c) 40 mas.%

U ovom delu teze je prikazana detaljna kinetička analiza sinteze GOS korišćenjem enzima β -galaktozidaze iz *A. Orizae*. Izvedeno je nekoliko sličnih mikrokinetičkih modela, čiji su kinetički parametri procenjeni na osnovu eksperimentalnih podataka korišćenjem hibridnog GA. Pokazalo se da predloženi kinetički model 2 ima veoma dobro kvantitativno i kvalitativno slaganje različitih koncentracija komponenti (laktoze i GOS) za čitav niz testiranih uslova. Detaljno je analiziran efekat dva glavna parametra procesa, početne koncentracije laktoze i enzima. Model je dobro predvideo efekat oba parametra na konverziju laktoze. Takođe, kinetika formiranja GOS je veoma dobro predviđena korišćenjem predloženog modela, uključujući početne brzine formiranja GOS, maksimalne vrednosti koncentracija GOS, a zatim i njegovo smanjenje usled reverzibilnih reakcija. Pokazalo se da je maksimalna koncentracija GOS određena početnom koncentracijom laktoze, dok koncentracija enzima određuje vreme u kome se taj maksimum postiže, kao i brzinu razgradnje GOS. Analiza između dve kompetitivne reakcije, transgalaktozilacije i hidrolize laktoze, potvrdila je pozitivan efekat povećanja koncentracije laktoze na afinitet transgalaktozilacije. Dobro poznavanje kinetičkog modela je važno, jer se može koristiti za analizu, projektovanje i optimizaciju procesa kontinualne proizvodnje GOS.

2.2. Frukto-oligosaharidi (FOS)

Frukto-oligosaharidi pripadaju grupi etabliranih prebiotika, kao i galakto-oligosaharidi. S obzirom na to da struktura i sinteza FOS ima sličnosti sa GOS, predložen je analogni mehanizam nastajanja, što je ispitano u ovom delu teze.

2.2.1. Eksperimentalna sinteza FOS-a

Kinetika reakcije sinteze FOS-a je ispitivana takođe u šaržnim reaktorima (laboratorijski erlenmajeri) u tresilici, orbitalnom šejkeru (IKA® KS 4000i kontrola, Verke GmbH & Co. KG, Štaufen, Nemačka) pri brzina obrtaja od 120 o/min. Korišćen je komercijalni enzimski preparat Pectinex Ultra SP'L dobijen iz vrste *Aspergillus aculeatus*. Zapremina reakcione smeše, koja se sastojala od različitih koncentracija saharoze i enzima, u svakom setu eksperimenata je iznosila 20 ml. Rastvori saharoze su dobijeni zagrevanjem rastvora na temperaturi od 100 °C da bi se saharoza rastvorila, a nakon toga rastvori su bili stabilni na sobnoj temperaturi (rastvorljivost saharoze na 25 °C je približno 200 g saharoze na 100 g vode). Dobijeni rastvori su imali viskozitet manji od 15,2 cP i relativnu gustinu od 1,2 g/ml (na 20 °C). Temperatura reakcije je bila konstantna (50 °C) za sve eksperimente, dok su ostali uslovi, koji su varirani za svaki od devet izvedenih eksperimenata, prikazani u tabeli 2.5. Ispitani opseg koncentracija enzima je zasnovan na aktivnosti korišćenog enzima (2,5 – 12,5 IU) i koncentracijama enzima korišćenim u literaturi (Vega i Zuniga-Hansen 2014, Khandekar i sar. 2014, Kashyap i sar. 2015.). Svi eksperimenti su izvedeni u triplicatu i uzorci su uzimani u unapred određenim intervalima tokom 24 sata sa većom učestalošću tokom ranih faza reakcije. Tokom svakog uzorkovanja je uzimano 100 µl reakcione smeše, a svaki uzorak je posle deaktivacije enzima razblažen sa 900 ml destilovane vode. Uzorci su zagrevani, odmah nakon uzorkovanja, u vodenom kupatilu na 100 °C tokom 5 minuta da bi se zaustavio proces i deaktivirao enzim. Uzorci su zatim filtrirani pomoću filtera (veličina pora 0,45 µm) i na kraju analizirani tečnom hromatografijom visokih performansi (HPLC). Eksperimentalna aparatura je prikazana na slici 2.10.



Slika 2.10. Eksperimentalna aparatura za sintezu FOS (preuzeto iz master rada Janković 2022.)

Tabela 2.5. Procesni uslovi izvedenih eksperimenata.

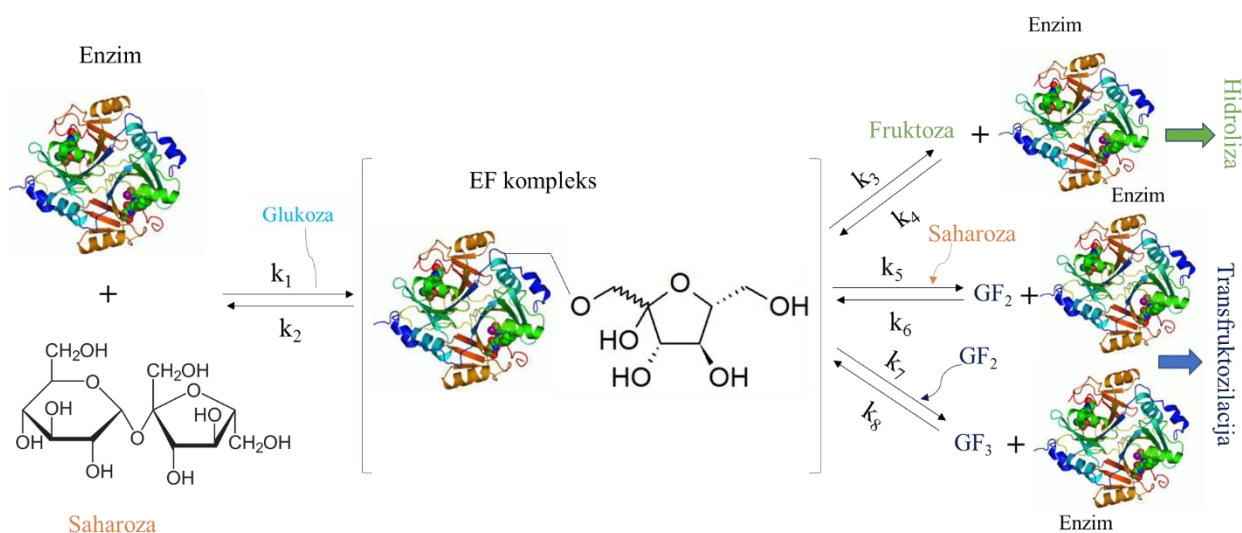
Redni broj eksperimenta	Početna koncentracija saharoze (g/l)	Početna koncentracija enzima (zap.%)
1	400	1
2	400	2
3	400	5
4	500	1
5	500	2
6	500	5
7	600	1
8	600	2
9	600	5

2.2.2. Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC)

Za analizu uzoraka korišćen je isti uređaj opisan u delu 2.1.2. (HPLC sistema Dionex Ultimate 3000, Thermo Scientific). Uzorci su pre analize 10 puta razblaženi korišćenjem HPLC vode. Proizvodi su detektovani pomoću RI detektora prethodno zagrejanog na 40 °C (RefractoMak 520, ERC GmbH, Riemerling, Nemačka), a sva akvizicija i obrada podataka je završena pomoću Chromeleon 7.2 softvera. Za određivanje sastava dobijenih ugljenih hidrata kao standardi su korišćeni glukoza, fruktoza, 1-kestoza, nistoza i 1-fruktofuranozil nistoza.

2.2.3. Kinetički modeli sinteze FOS-a

U ovoj tezi je razmatrano osam različitih mikro-kinetičkih modela prikazanih u tabeli 2.6, koji sadrže između 7 i 12 kinetičkih konstanti (Pravilovic i sar. 2023.). Prvi model je model A koji se sastoji od četiri povratne reakcije i sačinjen je po ugledu na model sinteze GOS-a koji je prikazan u delu 2.1 ove teze. U prvoj reakciji se saharoza (Sah) vezuje za prazno mesto na enzimu E , pri čemu nastaje kompleks enzim-fruktoza (EF) uz oslobađanje molekula glukoze (G). Ova reakcija je povratna, tako da slobodna glukoza i kompleks enzim-fruktoza mogu da reaguju uz nastajanje molekula saharoze i oslobađanja mesta na enzimu. Drugi korak prikazuje paralelnu reakciju hidrolize u kojoj nastaju slobodan molekul fruktoze (F) i slobodan enzim E iz formiranog kompleksa EF (slika 2.11). U trećoj, takođe povratnoj reakciji, kompleks enzim-fruktoza reaguje sa molekulom saharoze pri čemu nastaje molekul 1-kestoze (GF2) uz oslobađanje aktivnog mesta na enzimu. U poslednjoj povratnoj reakciji molekul GF2 može da reaguje sa kompleksom enzim-fruktoza i formira molekul nistoze (GF3) i slobodan enzim. Prvi i drugi korak reakcije predstavljaju reakcije hidrolize, dok treći i četvrti korak su transfruktozilacija. U predloženim modelima, ključni intermedijer je kompleks enzim-fruktoza (EF) i efikasnost transfruktozilacije je određena ponašanjem ovog kompleksa, što će detaljnije biti prikazano u delu 2.2.6.



Slika 2.11. Mehanizam enzimi katalizovane reakcije transformacije saharoze putem transfruktozilacije i hidrolize

Model B je složeniji od modela A i sastoji se od pet povratnih reakcija. Razlika u poređenju sa modelom A je u tome što molekul saharoze reaguje sa enzimom i formira kompleks enzim-saharoza (E-Sah). Ovaj kompleks dalje disosuje u kompleks enzim-fruktoza uz oslobađanje molekula glukoze. Naredna tri koraka su ista kao u prethodnom modelu.

Model C je ekvivalentan onom koji su predložili Kashiap i sar. 2015. U odnosu na opisani model, ima jedan dodatni korak i sastoji se od šest povratnih reakcija. U poređenju sa modelom B, ovaj model uključuje inhibiciju enzima glukozom pri čemu nastaje neaktivan kompleks enzim-glukoza (EG). Model D je izveden kao pojednostavljenje modela B, pri čemu se reakcija disocijacije EF kompleksa smatra nepovratnom. Model E je složeniji od modela A jer razmatra povratnu reakciju inhibicije enzima glukozom, ali je jednostavniji od modela C, jer ne uključuje kompleks E-Sah. Modeli F i G su izvedeni iz modela E sa pojednostavljenjima vezanim za nepovratnost nekih koraka. U modelu F, reakcija inhibicije enzima glukozom je nepovratna (peti korak), dok je u modelu G reakcija disocijacije EF kompleksa nepovratna (drugi korak). Model H je izveden iz modela A, s tim što je poslednji korak reakcije nepovratan.

Tabela 2.6. Različiti mehanizmi sinteze FOS-a.

Naziv modela	Mehanizam	Naziv modela	Mehanizam
Model A	$E + Sah \xrightleftharpoons{k_1, k_2} EF + G$ $EF \xrightleftharpoons{k_3, k_4} E + F$ $EF + Sah \xrightleftharpoons{k_5, k_6} E + GF_2$ $EF + GF_2 \xrightleftharpoons{k_7, k_8} E + GF_3$	Model E	$E + Sah \xrightleftharpoons{k_1, k_2} EF + G$ $EF \xrightleftharpoons{k_3, k_4} E + F$ $EF + Sah \xrightleftharpoons{k_5, k_6} E + GF_2$ $EF + GF_2 \xrightleftharpoons{k_7, k_8} E + GF_3$ $E + G \xrightleftharpoons{k_9, k_{10}} EG$
Model B	$E + Sah \xrightleftharpoons{k_1, k_2} E - Sah$	Model F	$E + Sah \xrightleftharpoons{k_1, k_2} EF + G$

	$E - Sah \xrightleftharpoons{k_3, k_4} EF + G$ $EF \xrightleftharpoons{k_5, k_6} E + F$ $EF + Sah \xrightleftharpoons{k_7, k_8} E + GF_2$ $EF + GF_2 \xrightleftharpoons{k_9, k_{10}} E + GF_3$		$EF \xrightleftharpoons{k_3, k_4} E + F$ $EF + Sah \xrightleftharpoons{k_5, k_6} E + GF_2$ $EF + GF_2 \xrightleftharpoons{k_7, k_8} E + GF_3$ $E + G \xrightarrow{k_9} EG$
Model C	$E + Sah \xrightleftharpoons{k_1, k_2} E - Sah$ $E - Sah \xrightleftharpoons{k_3, k_4} EF + G$ $EF \xrightleftharpoons{k_5, k_6} E + F$ $EF + Sah \xrightleftharpoons{k_7, k_8} E + GF_2$ $EF + GF_2 \xrightleftharpoons{k_9, k_{10}} E + GF_3$ $E + G \xrightleftharpoons{k_{11}, k_{12}} EG$	Model G	$E + Sah \xrightleftharpoons{k_1, k_2} EF + G$ $EF \xrightarrow{k_3} E + F$ $EF + Sah \xrightleftharpoons{k_4, k_5} E + GF_2$ $EF + GF_2 \xrightleftharpoons{k_6, k_7} E + GF_3$ $E + G \xrightleftharpoons{k_8, k_9} EG$
Model D	$E + Sah \xrightleftharpoons{k_1, k_2} E - Sah$ $E - Sah \xrightleftharpoons{k_3, k_4} EF + G$ $EF \xrightarrow{k_5} E + F$ $EF + Sah \xrightleftharpoons{k_6, k_7} E + GF_2$ $EF + GF_2 \xrightleftharpoons{k_8, k_9} E + GF_3$	Model H	$E + Sah \xrightleftharpoons{k_1, k_2} EF + G$ $EF \xrightleftharpoons{k_3, k_4} E + F$ $EF + Sah \xrightleftharpoons{k_5, k_6} E + GF_2$ $EF + GF_2 \xrightarrow{k_7} E + GF_3$

Materijalni bilansi svih sedam komponenti koje se razmatraju u reakcionim mehanizmima u šaržnom reaktoru konstantne zapremine su predstavljeni običnim diferencijalnim jednačinama. Jednačine materijalnog bilansa za model A su prikazane ispod, dok se jednačine ostalih modela izvode na analogan način.

$$\frac{dC_{Sah}}{dt} = -k_1 C_E C_{Sah} + k_2 C_{EF} C_G - k_5 C_{EF} C_{Sah} + k_6 C_E C_{GF_2} \quad (2.3)$$

$$\frac{dC_G}{dt} = k_1 C_E C_{Sah} - k_2 C_{EF} C_G \quad (2.4)$$

$$\frac{dC_F}{dt} = k_3 C_{EF} - k_4 C_E C_F \quad (2.5)$$

$$\frac{dC_E}{dt} = -k_1 C_E C_{Sah} + k_2 C_{EF} C_G + k_3 C_{EF} - k_4 C_E C_F + k_5 C_{EF} C_{Sah} - k_6 C_E C_{GF_2} + k_7 C_{EF} C_{GF_2} - k_8 C_E C_{GF_3} \quad (2.6)$$

$$\frac{dC_{EF}}{dt} = k_1 C_E C_{Sah} - k_2 C_{EF} C_G - k_3 C_{EF} + k_4 C_E C_F - k_5 C_{EF} C_{Sah} + k_6 C_E C_{GF_2} - k_7 C_{EF} C_{GF_2} + k_8 C_E C_{GF_3} \quad (2.7)$$

$$\frac{dC_{GF_2}}{dt} = k_5 C_{EF} C_{Sah} - k_6 C_E C_{GF_2} - k_7 C_{EF} C_{GF_2} + k_8 C_E C_{GF_3} \quad (2.8)$$

$$\frac{dC_{GF_3}}{dt} = k_7 C_{EF} C_{GF_2} - k_8 C_E C_{GF_3} \quad (2.9)$$

Početni uslovi za jednačine (2.3-2.9) odgovaraju početnim koncentracijama svih komponenti u sistemu (tj. C_{Sah0} i C_{E0} za saharozu i enzim i nula za ostale komponente). Matlab *ode23s* potprogram se koristi za rešavanje skupa običnih diferencijalnih jednačina. Ovaj potprogram je zasnovan na modifikovanoj Rozenbrokovoju formuli reda 2 i posebno je koristan za efikasno rešavanje sistema kuplovanih nelinearnih diferencijalnih jednačina sa velikim gradijentima.

2.2.4. Estimacija parametara modela

Estimacija kinetičkih parametara je opisana u delu 2.1.4. Korišćeni su podprogrami *ga* i *fminsearch* softvera Matlab R2014b. Da bi se pokrio širi opseg mogućih vrednosti, kao i isključile negativne vrednosti, kinetičke konstante su skalirane prema sledećoj jednačini:

$$k_i = 10^{x_i} \quad (2.10)$$

gde je k_i konstanta brzine reakcije ($i = 1, 2, \dots$) i x_i je eksponent, parametar estimacije.

Kao funkcija cilja korišćena je srednja relativna procentualna greška (SRPG), data jednačinom (2.2).

Treba napomenuti da koncentracije enzima i EF kompleksa nisu merljive, pa zato F_{cilja} sadrži samo preostalih pet komponenti (Sah, G, F, GF2 i GF3). Ukupno, 1296 eksperimentalnih tačaka je istovremeno korišćeno u estimaciji, tj. optimizaciji, dajući jedan set parametara.

Za procenu kvaliteta predviđanja modela u odnosu na eksperimentalne podatke, takođe je korišćena SRPG (jednačina 2.2). Pored toga, statistička značajnost parametara modela je analizirana korišćenjem t-testa i intervala poverenja (detaljnije opisano u master radu Cristhian 2022).

2.2.5. Odabir najboljeg kinetičkog modela enzimske sinteze FOS-a

Srednja relativna procentualna greška (SRPG) za svaku komponentu i svaki ispitivani model reakcije sinteze FOS prikazana je u tabeli 2.7. Od testiranih modela, model H se najbolje slaže sa eksperimentalnim podacima u smislu dobijene vrednosti SRPG (SRPG = 13,34 %, tabela 2.7). Modeli A, E, F i G su pokazali veoma sličan kvalitet slaganja, ali ovi modeli sadrže više parametara, dok je najveća greška dobijena za model B (15,44 %).

Tabela 2.7. Srednja relativna procentualna greška (SRPG) za sve komponente i sve ispitane modele. Sve vrednosti su date u %.

Model/komponenta	Sah (%)	G (%)	F (%)	FOS (%) (GF ₂ +GF ₃)	SRPG (ukupno) (%)
Model A	9,05	9,85	26,25	10,44	13,89
Model B	19,94	8,02	22,46	11,32	15,44
Model C	19,16	7,57	23,60	10,97	15,32
Model D	18,60	8,18	23,82	10,74	15,33
Model E	10,27	12,13	19,99	13,43	13,96
Model F	10,34	12,07	19,67	13,50	13,90
Model G	10,46	12,34	19,22	14,01	14,01
Model H	10,44	9,31	22,05	11,59	13,34

Tabela 2.8 prikazuje procenjene kinetičke parametre za model H, sa odgovarajućim intervalima poverenja od 95 %. Dobijeni kinetički parametri za druge testirane modele prikazani su u tabeli 2.9. Tabela 2.10 daje statističku značajnost parametara modela korišćenjem t-testa za model H.

Tabela 2.8. Vrednosti konstante brzine reakcije sa intervalom poverenja od 95 % za model H.

Model H	Parametar	Vrednost konstante brzine	Parametar x _i (jednačina 2.10)	95% interval poverenja od x _i
	k₁ [l/(mmol h)]	$6,37 \cdot 10^{12}$	12,80	±2,84
	k₂ [l/(mmol h)]	$3,16 \cdot 10^{12}$	12,50	±2,10
	k₃ [l/h]	$5,31 \cdot 10^5$	5,73	±1,09
	k₄ [l/(mmol h)]	$1,49 \cdot 10^3$	3,17	±1,84
	k₅ [l/(mmol h)]	$1,26 \cdot 10^4$	4,10	±1,03
	k₆ [l/(mmol h)]	$4,25 \cdot 10^3$	3,63	±1,74
	k₇ [l/(mmol h)]	$8,21 \cdot 10^3$	3,91	±1,15

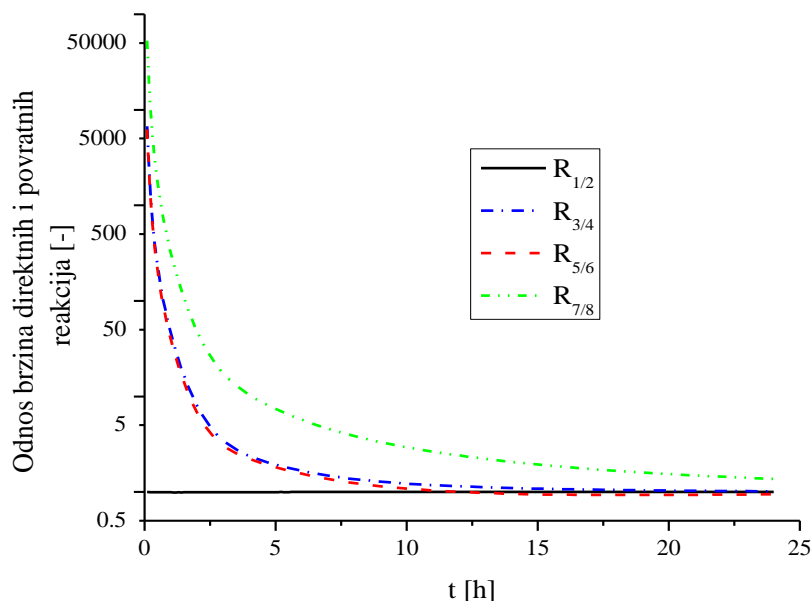
Tabela 2.9. Vrednosti kinetičkih parametara ispitanih modela.

Model A	Parametar	Vrednost	Model B	Parametar	Vrednost
	k₁ [l/(mmol·h)]	$3,3817 \cdot 10^{13}$		k₁ [l/(mmol·h)]	$5,9252 \cdot 10^5$
	k₂ [l/(mmol·h)]	$2,5006 \cdot 10^{12}$		k₂ [l/(mmol·h)]	2,8268
	k₃ [l/h]	$4,1242 \cdot 10^5$		k₃ [l/h]	$1,4572 \cdot 10^7$
	k₄ [l/(mmol·h)]	$2,1434 \cdot 10^4$		k₄ [l/(mmol·h)]	$4,0362 \cdot 10^{13}$
	k₅ [l/(mmol·h)]	$9,3210 \cdot 10^3$		k₅ [l/h]	$6,8018 \cdot 10^{14}$
	k₆ [l/(mmol·h)]	$1,4489 \cdot 10^4$		k₆ [l/(mmol·h)]	$1,0703 \cdot 10^{-10}$
	k₇ [l/(mmol·h)]	$2,5755 \cdot 10^3$		k₇ [l/(mmol·h)]	$1,7641 \cdot 10^{13}$
	k₈ [l/(mmol·h)]	$1,8881 \cdot 10^3$		k₈ [l/(mmol·h)]	$1,2847 \cdot 10^4$
				k₉ [l/(mmol·h)]	$7,3075 \cdot 10^{12}$
		k₁₀ [l/(mmol·h)]	$5,0324 \cdot 10^{-4}$		
Model C	Parametar	Vrednost	Model D	Parametar	Vrednost
	k₁ [l/(mmol·h)]	$5,9252 \cdot 10^5$		k₁ [l/(mmol·h)]	$7,0929 \cdot 10^5$
	k₂ [l/(mmol·h)]	2,4688		k₂ [l/h]	2,8781
	k₃ [l/h]	$1,5080 \cdot 10^7$		k₃ [l/h]	$1,4571 \cdot 10^7$
	k₄ [l/(mmol·h)]	$4,1504 \cdot 10^{13}$		k₄ [l/(mmol·h)]	$4,2182 \cdot 10^{13}$
	k₅ [l/(mmol·h)]	$6,8042 \cdot 10^{14}$		k₅ [l/h]	$6,9249 \cdot 10^{14}$
	k₆ [l/(mmol·h)]	$9,9911 \cdot 10^{-11}$		k₆ [l/(mmol·h)]	$1,7640 \cdot 10^{13}$
	k₇ [l/(mmol·h)]	$1,8164 \cdot 10^{13}$		k₇ [l/(mmol·h)]	$4,0626 \cdot 10^4$
	k₈ [l/(mmol·h)]	$2,3900 \cdot 10^4$		k₈ [l/(mmol·h)]	$7,3080 \cdot 10^{12}$
	k₉ [l/(mmol·h)]	$6,8011 \cdot 10^{12}$		k₉ [l/(mmol·h)]	$5,0327 \cdot 10^{-4}$
	k₁₀ [l/(mmol·h)]	$5,5792 \cdot 10^{-4}$			
	k₁₁ [l/(mmol·h)]	1,0820			
k₁₂ [l/(mmol·h)]	$1,5849 \cdot 10^8$				
Model E	Parametar	Vrednost	Model F	Parametar	Vrednost
	k₁ [l/(mmol·h)]	$3,2735 \cdot 10^{13}$		k₁ [l/(mmol·h)]	$2,0769 \cdot 10^{13}$
	k₂ [l/(mmol·h)]	$2,4228 \cdot 10^{12}$		k₂ [l/(mmol·h)]	$2,6612 \cdot 10^{12}$
	k₃ [l/h]	$4,4067 \cdot 10^5$		k₃ [l/h]	$4,5684 \cdot 10^5$
	k₄ [l/(mmol·h)]	$1,9966 \cdot 10^4$		k₄ [l/(mmol·h)]	$1,1655 \cdot 10^4$
	k₅ [l/(mmol·h)]	$9,7479 \cdot 10^3$		k₅ [l/(mmol·h)]	$9,8467 \cdot 10^3$
	k₆ [l/(mmol·h)]	$2,3240 \cdot 10^4$		k₆ [l/(mmol·h)]	$1,3618 \cdot 10^4$
	k₇ [l/(mmol·h)]	$7,0235 \cdot 10^3$		k₇ [l/(mmol·h)]	$7,3678 \cdot 10^3$
	k₈ [l/(mmol·h)]	$1,9865 \cdot 10^3$		k₈ [l/(mmol·h)]	$1,0226 \cdot 10^3$
	k₉ [l/(mmol·h)]	$7,0326 \cdot 10^{-4}$		k₉ [l/(mmol·h)]	$3,9735 \cdot 10^{-4}$
k₁₀ [l/h]	$1,3795 \cdot 10^{-5}$				
Model G	Parametar	Vrednost			
	k₁ [l/(mmol·h)]	$3,3446 \cdot 10^{13}$			
	k₂ [l/(mmol·h)]	$8,2929 \cdot 10^{12}$			
	k₃ [l/h]	$4,5729 \cdot 10^5$			
	k₄ [l/(mmol·h)]	$9,9297 \cdot 10^3$			
	k₅ [l/(mmol·h)]	$5,5734 \cdot 10^3$			
	k₆ [l/(mmol·h)]	$1,2678 \cdot 10^4$			
	k₇ [l/(mmol·h)]	$4,3060 \cdot 10^3$			
	k₈ [l/(mmol·h)]	$4,3776 \cdot 10^{-4}$			
k₉ [l/(mmol·h)]	$4,7699 \cdot 10^{-4}$				

Tabela 2.10. T-test za model H.

Parametar	Vrednost	\bar{x}_i vrednost	Interval poverenja			95% t-vrednost	Standardna devijacija
			90%	95%	99%		
k_1 [l/(mmol·h)]	$6,37 \cdot 10^{12}$	12,80	2,40	2,84	3,95	28,22	0,23
k_2 [l/(mmol·h)]	$3,16 \cdot 10^{12}$	12,50	1,87	2,11	2,67	38,62	0,16
k_3 [l/h]	$5,31 \cdot 10^5$	5,73	1,08	1,09	1,13	144,07	0,02
k_4 [l/(mmol·h)]	$1,49 \cdot 10^3$	3,17	1,05	1,85	2,24	11,92	0,14
k_5 [l/(mmol·h)]	$1,26 \cdot 10^4$	4,10	1,03	1,03	1,04	293,32	0,01
k_6 [l/(mmol·h)]	$4,25 \cdot 10^3$	3,63	1,59	1,74	2,70	15,08	0,12
k_7 [l/(mmol·h)]	$8,21 \cdot 10^3$	3,91	1,13	1,16	1,21	62,17	0,03
						Referentna t-vrednost (95%) = 1,64	

Treba napomenuti da je model H modifikovana verzija modela A i da je izveden uzimanjem u obzir odnosa brzina direktnih i povratnih reakcija za sve korake reakcije modela A (slična analiza koja je urađena i sa sintezom GOS-a). Vrednosti ovih odnosa su prikazane na slici 2.12. Zbog visokih početnih vrednosti, one su prikazane u log-skali. Može se videti da je odnos brzina reakcije u koraku 1 ($R_{1/2}$) najniži za sva reakciona vremena u svim eksperimentima i da je ta vrednost blizu 1 (crna linija). Ova vrednost potvrđuje pretpostavku modela A da je prvi korak reakcije povratan. Pored toga, odnosi brzina reakcije u koracima 2 ($R_{3/4}$) i 3 ($R_{5/6}$) počinju sa relativno visokim vrednostima, ali se na kraju približavaju 1, što sugerise da su reakcije povratne. Nasuprot tome, sa slike 2.12 se može videti da je odnos brzina reakcije u koraku 4 ($R_{7/8}$) veoma visok, posebno na početku reakcije, kada je direktna reakcija hiljadama puta brža od povratne. Iako se ovaj odnos značajno smanjuje tokom vremena, on ostaje najviši od sva četiri koraka reakcije sa vrednošću 10 tokom 5 sati i oko 3 za vreme od 10 sati. Kao rezultat toga, pošto je brzina povratne reakcije u koraku 4 niža od brzine direktne reakcije, pretpostavka modela H da se povratna reakcija može zanemariti je korišćena u daljoj analizi.



Slika 2.12. Odnosi brzina direktnih i povratnih reakcija za model A za početnu koncentraciju sahara od 400 g/l i početnu koncentraciju enzima od 1 zap. %

U cilju analiziranja ponovljivosti eksperimentalnih podataka, izračunate su vrednosti standardne devijacije (*SD*) i relativne standardne devijacije (*RSD*). Vrednosti *SD* i *RSD* se izračunavaju pomoću sledećih formula:

$$SD = \sqrt{\frac{(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + \dots + (x_n - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2.11)$$

$$RSD = \frac{100 SD}{\bar{x}} \quad (2.12)$$

gde je *n* ukupan broj pojedinačnih merenja, a \bar{x} srednja vrednost koncentracije koja se izračunava na sledeći način:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} \quad (2.13)$$

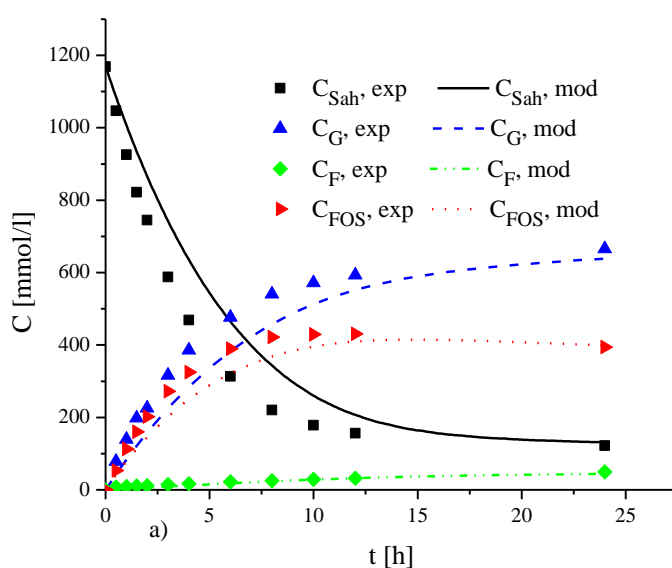
Dobijena vrednost *RSD* se kretala od 3 do 6 %, što ukazuje na dobru ponovljivost eksperimentalnih podataka. Za svaki eksperiment su takođe određene relativne standardne devijacije po komponentama. Zbog niskog sadržaja fruktoze, što otežava precizno merenje njene koncentracije, najveća odstupanja su bila za fruktozu (oko 16%), a zatim za GF3 (oko 12 %). Vrednost *RSD* za ostale komponente su se kretala od 4 do 5 %.

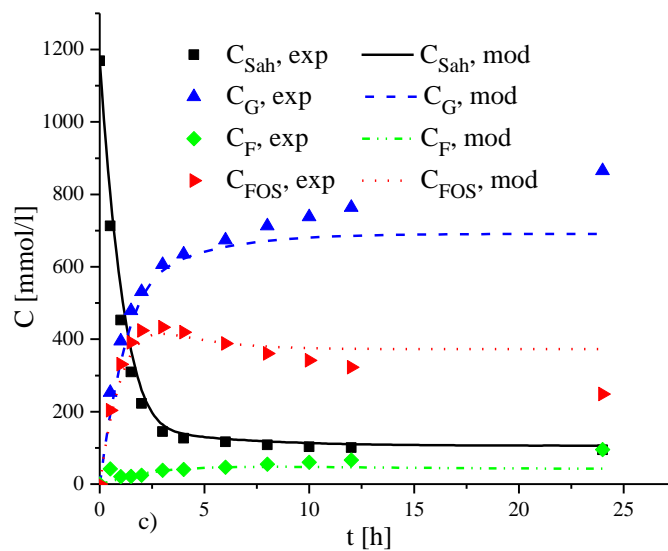
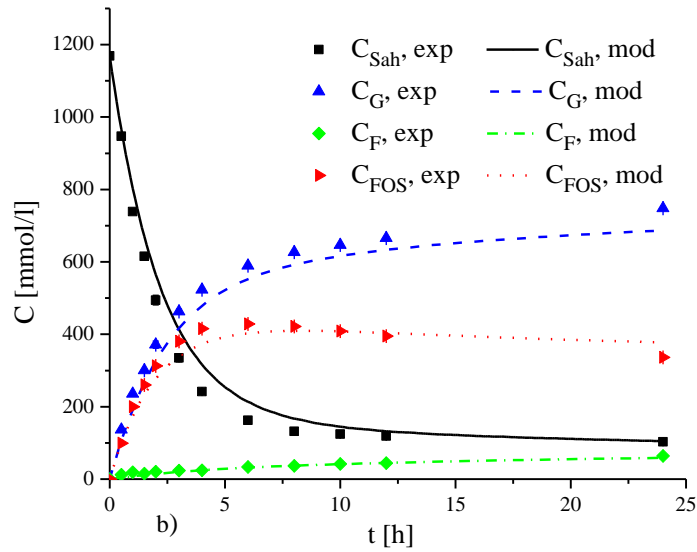
Takođe su određene srednje relativne procentualne greške za pojedinačne komponente u svim izvedenim eksperimentima i za sve ispitane modele. Ove vrednosti za model H su prikazane u tabeli 2.11. Sve komponente su pokazale zadovoljavajuće slaganje, pri čemu se glukoza najbolje slaže (SRPG=9,31 %), a fruktoza najmanje (SRPG=22,05 %). Ovaj rezultat je očekivan, jer se fruktoza dobija u veoma malim količinama i pokazuje visoku standardnu devijaciju u ponovljenim eksperimentima. Slično tome, zbog izuzetno niskih brzina formiranja i koncentracija GF3, kao i značajno većih eksperimentalnih grešaka za ovu komponentu, treba naglasiti da su komponente GF2 i GF3 sabrane i prikazane kao jedna komponenta FOS u analizi. Slični rezultati za komponente i eksperimente su dobijeni i za druge predložene modele (rezultati nisu prikazani u tezi).

Tabela 2.11. Srednja relativna procentualna greška (SRPG) za model H. Sve vrednosti su date u %.

Exp/komp	Sah (%)	G (%)	F (%)	FOS (%) (GF ₂ +GF ₃)	srednja vrednost ±SD (%)
1.	17,32	15,21	25,53	10,14	17,62±0,28
2.	14,76	10,27	19,80	7,37	13,46±1,38
3.	9,13	5,82	17,59	9,56	10,61±0,72
4.	2,95	5,25	24,28	9,57	10,60±1,17
5.	9,32	8,39	22,32	10,48	12,61±3,54
6.	11,53	8,05	13,79	11,03	10,79±1,82
7.	6,36	8,59	32,16	17,82	16,16±5,32
8.	8,73	10,16	24,29	15,80	14,63±5,86
9.	13,87	11,37	16,40	13,98	13,61±4,15
srednja vrednost	10,44	9,31	22,05	11,59	SRPG=13,34

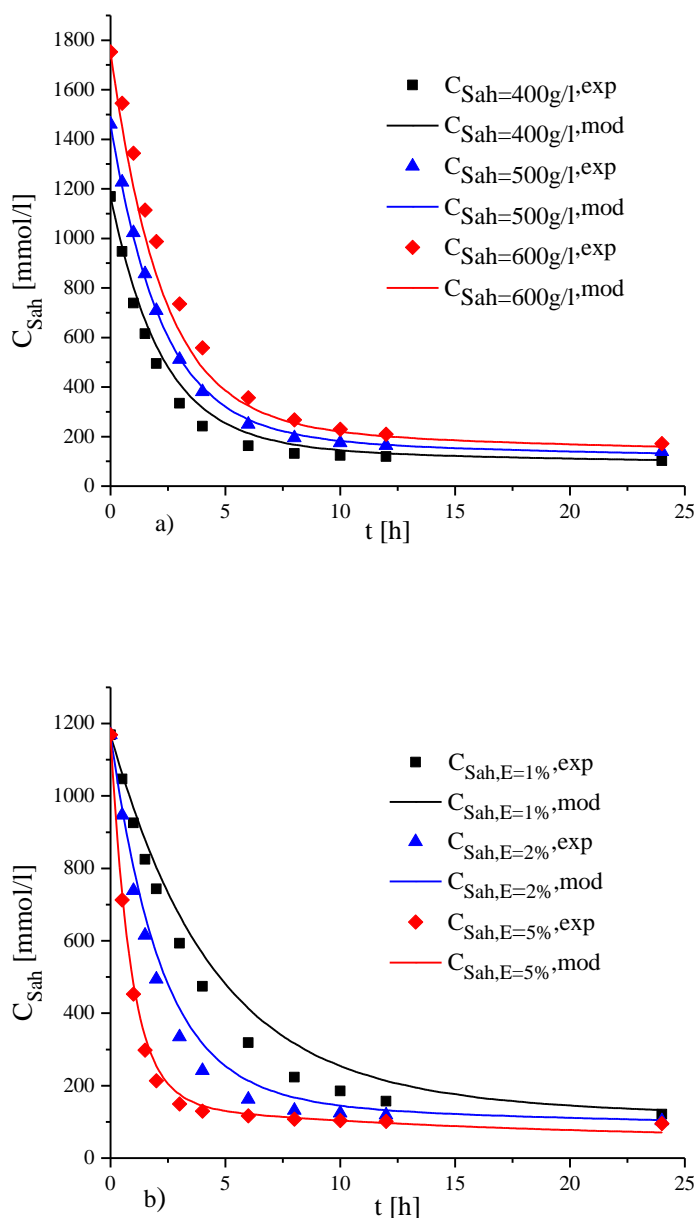
Da bi se dodatno ispitalo slaganje modela H sa eksperimentima, na slici 2.13 su prikazane promene koncentracije komponenti sa vremenom za početnu koncentraciju saharoze od 400 g/l i za različite početne koncentracije enzima. Kao što se može primetiti, sadržaj saharoze se brzo smanjivao tokom prvih pet sati. Kao što se očekivalo, koncentracije glukoze i fruktoze su se povećavale tokom eksperimenta, pri čemu su obe komponente imale veće brzine nastajanja na početku. U svakom eksperimentu se vidi da je koncentracija fruktoze znatno niža od koncentracije glukoze, koja je karakteristična za proizvodnju FOS. To je zato što se glukoza oslobađa u koraku reakcije 1 (tabela 2.6), dok se samo deo fruktoze ugrađene u EF oslobađa u koraku 2, a ostatak se pretvara u FOS u reakcijama 3 i 4. Koncentracija FOS se obično povećavala na početku reakcije (oko 10 sati kada je $C_{E0}=1\%$, oko 6 sati kada je $C_{E0}=2\%$ i oko 3 sata kada je kada je $C_{E0}=5\%$), dostizala maksimum, a zatim se blago smanjivala. Takođe, može se zaključiti da je za veće početne koncentracije enzima, potrošnja saharoze mnogo brža (crna linija). Sa slike 2.13 se može videti da model H veoma dobro prati sve uočene kvalitativne i kvantitativne trendove (Pravilovic i sar. 2023.).





Slika 2.13. Rezultati modela H (linije) i eksperimentalne vrednosti (tačke) za reakciju sa slobodnim enzimom: početna koncentracija rastvora saharoze 400 g/l i enzima a) 1 zap.%, b) 2 zap.% i c) 3 zap.%

Slika 2.14 prikazuje zavisnost koncentracije saharoze u eksperimentima (tačke), kao i po modelu (linije), pri različitim početnim koncentracijama saharoze (400, 500 i 600 g/l, grafik a) i enzima (1, 2 i 5 zap.%, grafik b). Može se videti da model H daje dobro slaganje u pogledu kvalitativnog uticaja početnih koncentracija enzima i saharoze.

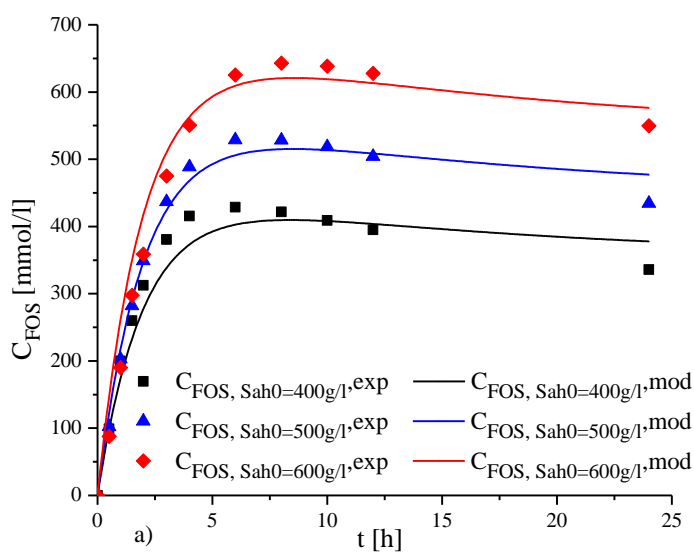


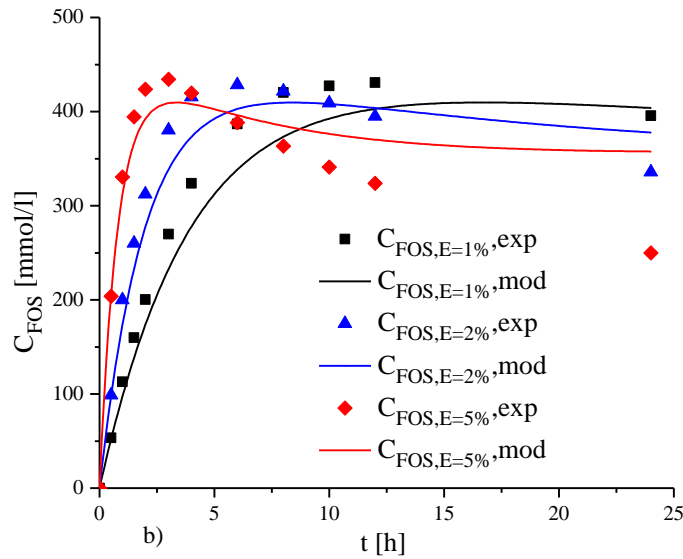
Slika 2.14. Zavisnost koncentracije saharoze po eksperimentu i modelu H: (a) pri različitim početnim koncentracijama saharoze za početnu koncentraciju enzima od 2 zap.% i (b) pri različitim početnim koncentracijama enzima za početnu koncentraciju saharoze od 400 g/l

Za sve početne koncentracije saharoze može se primetiti da koncentracija saharoze naglo opada tokom prva 3-4 h od početka reakcije, što je u skladu sa istraživanjima Kashiap i sar. 2015, dok kasnije ostaje približno konstantna. Iz oblika krive na slici 2.14a, može se zaključiti da je brzina konverzije saharoze dosta slična za sve početne koncentracije saharoze. Za početne koncentracije saharoze od 400 g/l, 500 g/l i 600 g/l, respektivno, krajnje koncentracije saharoze su bile 105 mmol/l, 132 mmol/l i 159 mmol/l, pokazujući konverzije saharoze od oko 90% za sve uslove (slika 2.14a). Slika 2.14b prikazuje odnos između koncentracije enzima i potrošnje saharoze, a evidentno je da povećana koncentracija enzima favorizuje veću brzinu konverzije saharoze i veću potrošnju. Koncentracija saharoze blago opada sa 132 na 105 mmol/l kada se koncentracija enzima poveća sa 1 na 2 zap.%, a smanjuje se na 71 mmol/l kada se koncentracija enzima poveća na 5 zap.%. Takođe, značajno je napomenuti da model kvalitativno dobro prati eksperimentalne tačke.

Na maksimalnu koncentraciju FOS jasno utiče početna koncentracija saharoze, kao što je prikazano na slici 2.15a, gde veće početne koncentracije saharoze (400 g/l, 500 g/l i 600 g/l, respektivno) dovode do viših maksimalnih koncentracija FOS (približno 410 mmol/l, 515 mmol/l i 620 mmol/l, respektivno). Koncentracija FOS dostiže maksimum za sve početne vrednosti koncentracije saharoze, nakon čega počinje polako da opada. Ovo se slaže sa nekoliko istraživanja koja tvrde da se maksimalna sinteza FOS dešava pri najvećoj početnoj koncentraciji saharoze (Pravilović i sar. 2023, Kashyap i sar. 2015, Caicedo i sar. 2008, Lee i sar. 1999.). Kao što se može primetiti na slici 2.15a, predloženi model dobro predviđa sve pomenute trendove.

S druge strane, veća početna koncentracija enzima dovodi do bržeg povećanja koncentracije FOS, ali je maksimalna koncentracija FOS približno ista za sve koncentracije enzima (slika 2.15b). Može se zaključiti da se brzina sinteze FOS povećava sa koncentracijom enzima, slično kao i brzina potrošnje saharoze. Vreme potrebno da se postigne maksimalna koncentracija FOS značajno se smanjuje sa povećanjem koncentracije enzima i iznosi oko 4, 6 i 12 sati za koncentracije enzima od 5, 2 i 1 zap.%, respektivno. Nedostatak korišćenja visokih koncentracija enzima je u tome što, kada se postigne maksimalna koncentracija FOS, enzim ubrzava brzinu procesa razgradnje FOS, u skladu sa koracima 3 i 4 predloženog modela. Na slici 2.15b se može videti da model pokazuje neka odstupanja u poređenju sa eksperimentalnim podacima, posebno u vremenskom periodu nakon postizanja maksimalne koncentracije FOS, a veće odstupanje je izraženije za veće početne koncentracije enzima (2 i 5 zap.%).



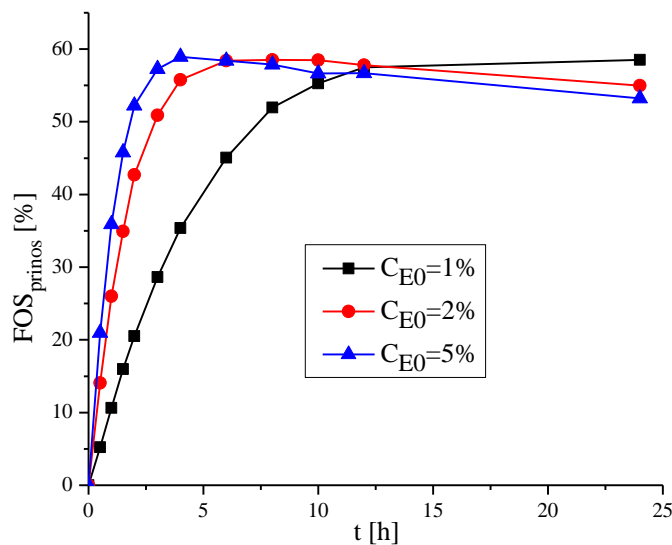


Slika 2.15. Zavisnost koncentracije FOS po eksperimentu i modelu H: (a) pri različitim početnim koncentracijama saharoze za početnu koncentraciju enzima od 2 zap.% i (b) pri različitim početnim koncentracijama enzima za početnu koncentraciju saharoze od 400 g/l

Na slici 2.16 je prikazana zavisnost prinosa FOS sa vremenom pri različitim početnim koncentracijama enzima. Prinos je računat prema sledećoj jednačini:

$$FOS_{prinos}(\%) = \frac{masa\ FOS}{ukupna\ masa\ šećera} \cdot 100 \quad (2.14)$$

Sa povećanjem koncentracije enzima, prinos FOS-a u se povećava u prvih 10–12 sati, a zatim blago opada. Pri višim početnim koncentracijama enzima, maksimalni prinos FOS je postignut za relativno kraće vreme reakcije (slika 2.16). Tako je za početnu koncentraciju enzima od 5 zap.%, prinos FOS bio 58 % nakon 4 sata od početka reakcije, dok je sličan prinos postignut nakon 6 sati za početnu koncentraciju enzima od 2 zap.%, a nakon 12 sati za početnu koncentraciju enzima od 1 zap.%. Na kraju reakcije, prinos FOS je bio oko 55 %, što je u skladu sa literaturom (Sangeetha i sar. 2005, Kashyap i sar. 2015, Guio i sar. 2012.). Nekoliko drugih istraživanja je koristilo isti enzim koji je korišćen u ovoj tezi. U radu Kashiap i sar. 2015. korišćene su različite početne koncentracije saharoze (300–500 g/l) i koncentracije enzima (4–32 U/ml). Upotrebljen je enzim fruktoziltransferaze iz *Aspergillus aculeatus*. Maksimalni prinos FOS od 60 %, sličan našem rezultatu, dobijen je pri početnim koncentracijama saharoze od 500 g/l na pH 4,5 sa aktivnošću enzima od 32 U/ml i na temperaturi od 55 °C. Uočeno je da je 1-kestoza glavni proizvod među različitim vrstama dobijenih FOS, što je u skladu sa rezultatima ove teze. Takođe, Schorsch i sar. 2018. su koristili enzim iz *Aureobasidium pullulans* i mehanizam reakcije je bio sličan našem, a prinos FOS, koji je dobijen, je bio 50 %.



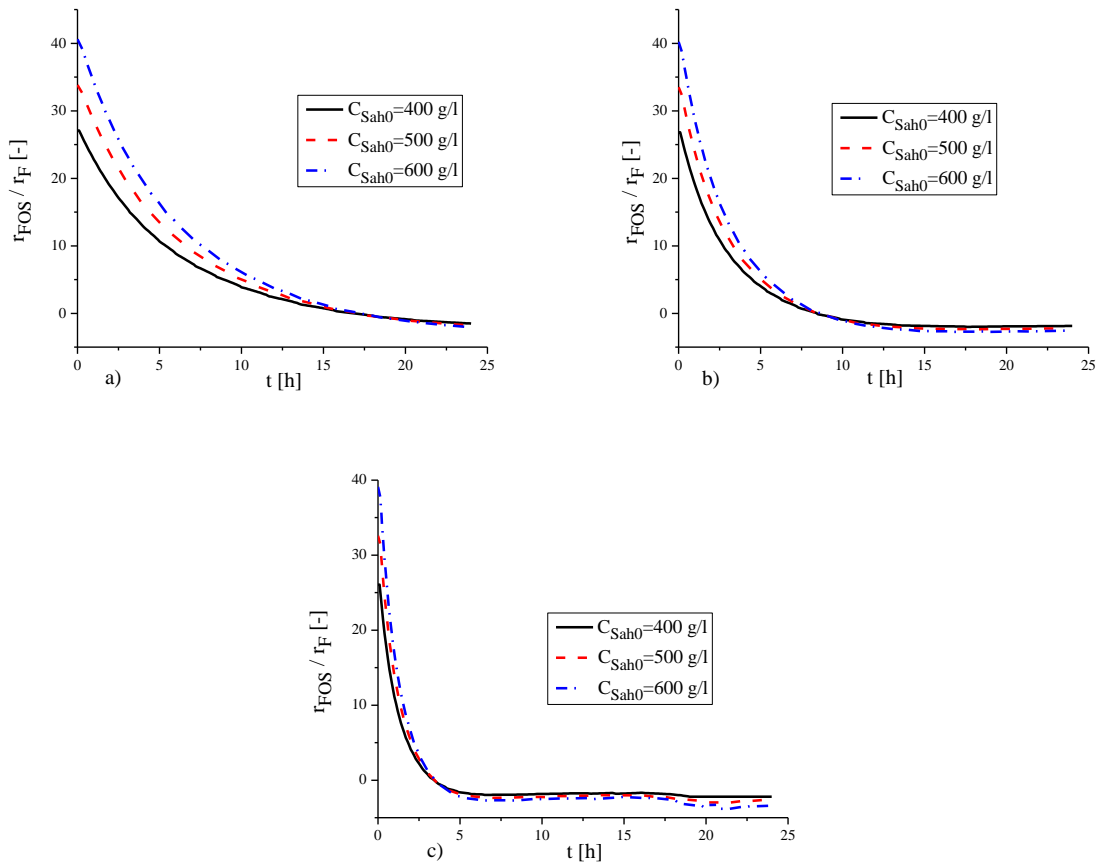
Slika 2.16. Zavisnost prinosa FOS sa vremenom pri različitim početnim koncentracijama enzima

2.2.6. Analiza brzine sinteze FOS i brzine hidrolize

Slično kao što je ranije opisano u tezi (poglavlje 2.1.6), i u sintezi FOS postoje dve kompetitivne reakcije: transfruktozilacija (koraci 3 i 4) i hidroliza (koraci 1 i 2). Ove reakcije su dalje analizirane korišćenjem modela kako bi se odredili efekti parametara procesa na brzine reakcije. U predloženom kinetičkom modelu, glavni intermedijer je kompleks enzim-fruktoza (EF), koji može dalje hidrolizovati, oslobađajući molekul fruktoze. Paralelno može da reaguje sa saharozom ili nižim FOS, što rezultira molekulom FOS dužim za jednu jedinicu fruktoze. Afinitet enzima za reakciju transfruktozilacije se može odrediti odnosom brzine formiranja FOS (dC_{FOS}/dt) i brzine formiranja fruktoze (dC_F/dt). Zato se za analizu efekata parametara procesa koristi odnos transfruktozilacije/hidrolize (TFH odnos).

Prethodna istraživanja (Kashyap i sar. 2015, Alvarado-Huallanco i sar. 2010, Caicedo i sar. 2008, Vega i sar. 2014.) su pokazala da je početna koncentracija saharoze najvažniji reakcioni parametar koji utiče na maksimalnu dostignutu koncentraciju FOS. Na slici 2.17 su upoređeni rezultati modela dobijeni pri različitim koncentracijama saharoze i jednakim koncentracijama enzima da bi se ispitaio uticaj koncentracije saharoze. Na početku reakcije, odnos transfruktozilacije/hidrolize ima najveće vrednosti pošto je reakcija sinteze FOS dominantna (TFH odnos > 1). Početni odnos TFH je 27 pri početnoj koncentraciji saharoze od 400 g/l. Kada je početna koncentracija saharoze 500 g/l, početni TFH odnos je 34, dok je za najveću početnu koncentraciju saharoze od 600 g/l taj odnos iznosio oko 40. TFH odnos se zatim smanjivao tokom čitavog vremenskog perioda, što znači da uticaj hidrolize postaje sve veći, ali reakcija transfruktozilacije ostaje dominantna. Odnos TFH postaje manji od jedan nakon više od 15 h od početka reakcije (slika 2.17a). Tada je brzina hidrolize veća od brzine transfruktozilacije; odnosno reakcija razgradnje FOS-a postaje brža od njegove sinteze. Na slikama 2.17b i 2.17c, vidi se da se TFH odnosi značajno brže smanjuju i da posle nešto manje od 10 h za početnu koncentraciju enzima od 2 zap.% i posle 3 sata za početnu koncentraciju enzima od 6 zap.%, TFH odnos postaje manji od jedan za sve početne koncentracije saharoze. Kako se saharoza

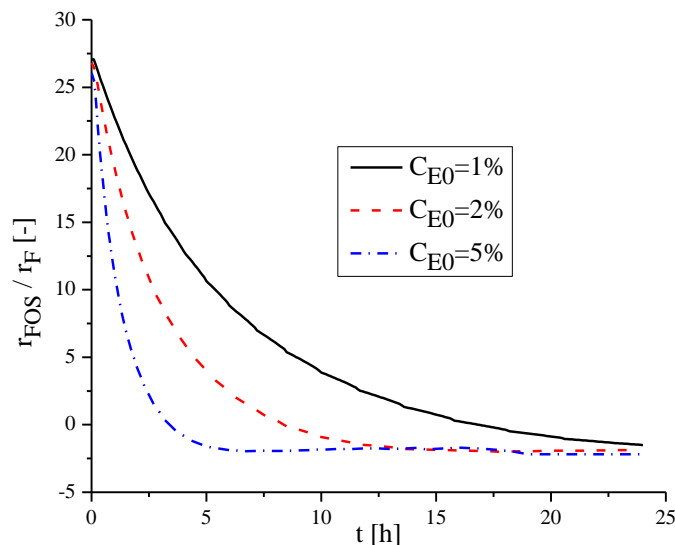
vremenom trošila, ona prestaje da deluje kao primarni akceptor ostatka molekula fruktozila, a molekuli vode počinju da zauzimaju njeno mesto. Ovo ukazuje da će hidroliza nastaviti da dominira.



Slika 2.17. Efekat početne koncentracije saharoze na TFH odnos pri početnoj koncentraciji enzima od: a) 1 zap.%; b) 2 zap.% i c) 5 zap.%

Svi rezultati su pokazali pozitivan uticaj povećanja koncentracije saharoze na afinitet transfruktozilacije, iako su krive konvergirale niskim vrednostima TFH odnosa u kasnijoj fazi reakcije. Na osnovu kinetičkog modela može se videti da saharoza direktno učestvuje u reakciji sinteze GF2 tako da njena veća koncentracija rezultira većom koncentracijom formiranog GF2. Ovaj efekat je mnogo izraženiji za niže početne koncentracije enzima, dok se sa povećanjem koncentracije enzima krive na grafiku približavaju jedna drugoj (slika 2.17).

Na slici 2.18 je prikazan odnos TFH pri početnoj koncentraciji saharoze od 400 g/l, a efekat početne koncentracije enzima je detaljnije istražen. Slike za početne koncentracije saharoze od 500 g/l i 600 g/l nisu prikazane jer su dobijeni slični rezultati (razlikuje se samo početni odnos TFH). Zbog činjenice da je ukupna koncentracija EF kompleksa veća, veća koncentracija enzima uzrokuje da TFH odnos brže opada. Početna koncentracija enzima utiče na vreme potrebno da se dođe do kraja transfruktozilacije, ali nema uticaja na raspodelu EF u budućnosti, koja je pretežno određena koncentracijom saharoze.



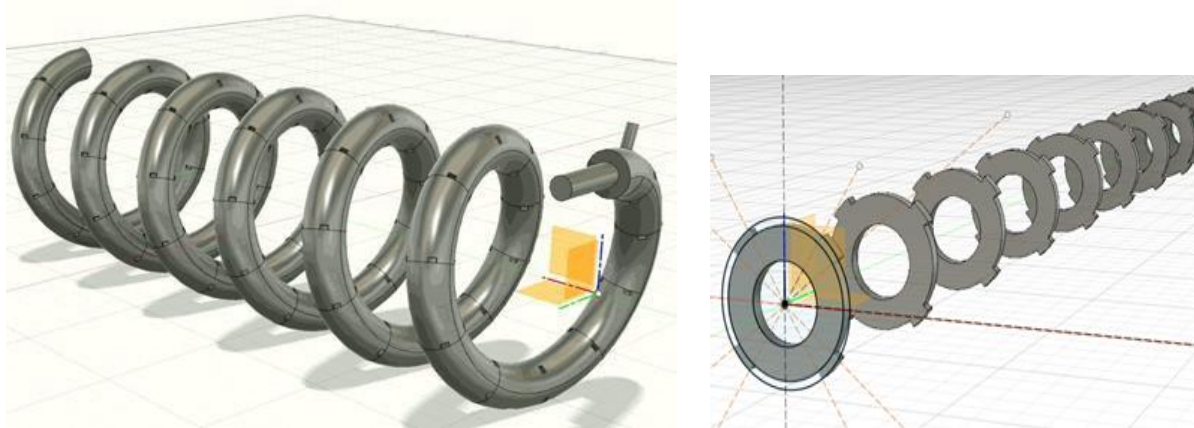
Slika 2.18. Efekat početne koncentracije enzima na TFH odnos pri početnoj koncentraciji saharoze od 400 g/l

U ovom delu teze je prikazana detaljna kinetička analiza sinteze FOS korišćenjem enzima Pectinex® Ultra SP'L iz *A. aculeatus*. Izvedeno je nekoliko sličnih mikrokinetičkih modela, čiji su kinetički parametri procenjeni na osnovu eksperimentalnih podataka korišćenjem hibridnog GA. Pokazalo se da predloženi kinetički model H ima veoma dobro kvantitativno i kvalitativno slaganje različitih koncentracija komponenti za čitav niz testiranih uslova. Detaljno je analiziran efekat dva glavna parametra procesa, početne koncentracije saharoze i enzima. Modelom je precizno procenjen uticaj oba parametra na brzinu nastajanja FOS i konverziju saharoze, uključujući početne velike brzine formiranja FOS, maksimalnu koncentraciju FOS i njeno naknadno smanjenje usled dominacije reakcije hidrolize. Pokazano je da početna koncentracija saharoze u velikoj meri utiče na maksimalni nivo koncentracije FOS, ali koncentracija enzima kontroliše vremenski period u kome se taj maksimum postiže, kao i brzinu razgradnje FOS. Analiza između dve kompetitivne reakcije, transfruktozilacije i hidrolize saharoze, potvrdila je pozitivan efekat povećanja koncentracije saharoze na afinitet transfruktozilacije. Kao rezultat je izveden matematički model koji se može koristiti za projektovanje i optimizaciju reaktora za kontinualnu proizvodnju FOS u opsegu koncentracija saharoze od 400–600 g/l. Takođe, dobijeni model je veoma jednostavan i lak za implementaciju u praksi.

3. DIZAJN INTENZIFIKOVANOG REAKTORA ZA KONTINUALNU PROIZVODNJU PREBIOTIKA I EKSPERIMENTALNI REZULTATI

3.1. Karakteristike i prednosti novog spiralnog oscilatornog reaktora sa pregradama i oscilacijama toka

Spiralni oscilatorni reaktor sa pregradama (SORP) predstavlja spiralno uvijen cevni reaktor sa unutrašnjim pregradama. Ovaj reaktor zapravo kombinuje geometriju reaktora sa pregradama i oscilatornim tokom fluida (ROT) i spiralnog reaktora, a u cilju poboljšanja mešanja (opisani u Poglavljima 1.2.1 i 1.2.2). Na slici 3.1a je prikazan karakteristični izgled reaktora, gde se vidi i pozicija pregrada. Anularne prstenaste pregrade (slika 3.1b) su raspodeljene na 1,5 puta unutrašnjeg prečnika reaktora, što je raspored preporučen za oscilatorne reaktore sa pregradama (McDonough i sar. 2018.). Dodavanjem pregrada u spiralni reaktor postižu se dodatni pozitivni efekti pri oscilatornim tokom tečnosti. Značaj prisustva pregrada je u tome što se fluid koji protiče kroz reaktor sudara sa pregradama, usled čega dolazi do formiranja vrtloga i intenzivnog mešanja. Mešanje se dodatno može poboljšati uvođenjem oscilatornog toka, pri čemu se uspostavlja strujanje koje je blisko idealnom klipnom, sužava se raspodela vremena zadržavanja, a prenosi toplote i mase se intenzifikuju.



Slika 3.1. a) Izgled spiralnog oscilatornog reaktora sa pregradama, b) izgled pregrada

Glavna prednost ovog reaktora u odnosu na ROT je veća kompaktnost i pojava Dean-ovih vrtloga koji se javljaju zbog postojanja spiralne geometrije cevi. Kao što je već objašnjeno, Dean-ovi vrtlozi intenzifikuju mešanje čime se poboljšava prenos mase i toplote. Pojava vrtloga pri manjim brzinama proticanja znači i manje smicajne napone nego kod sistema sa mehaničkim mešanjem. Rezultati završnog rada Tešić 2021. pokazuju da je mešanje u SORP intenzivnije nego u ROT u slučaju istih uslova proticanja. Takođe, zbog karakterističnog oblika SORP odnos površine i zapremine reaktora je veliki što omogućava laku termičku kontrolu reaktora.

Međutim, treba biti oprezan prilikom definisanja uslova za rad sa SORP zato što Dean-ovi vrtlozi, iako omogućavaju poboljšano mešanje, mogu imati i neželjeni efekat. Taj efekat je zarobljavanje dela fluida u svojoj unutrašnjosti koji zato ne može da bude izmešan sa ostatkom fluida. Dakle, Dean-ovi vrtlozi istovremeno predstavljaju i nedostatak ovih reaktora. Ovo neželjeno dejstvo

se prevazilazi uvođenjem oscilatornog toka, što podrazumeva generisanje oscilacija putem membranske ili klipne pumpe unutar toka fluida koji struji kroz reaktor.

Takođe, u završnom radu Tešić 2021. je iznet zaključak da se mešanje intenzifikuje sa smanjenjem oscilatornosti toka. Uvođenje normalnog toka, pored oscilatornog, u SORP utiče na efikasnije radijalno mešanje. Naime, oscilatorni tok povećava aksijanu disperziju, dok se sa druge strane, uticaj neoscilatornog toka ogleda u intenzifikovanju radijalnog mešanja koje je posledica interakcije oscilatornog toka i pregrada reaktora, pri čemu se smanjuje aksijalna disperzija.

Na slici 3.2 je prikazan izgled novog spiralnog oscilatornog reaktora sa pregradama i oscilacijama toka korišćen u eksperimentima u ovoj tezi.



Slika 3.2. SORP korišćen u eksperimentima

Reaktor korišćen u eksperimentima je sastavljen od četiri jedinice. Svaka jedinica se sastoji iz dva manja dela spojena elementom za povezivanje prikazanim na slici 3.3. U svakom delu su prisutna po tri navoja. Reaktorske jedinice su međusobno povezane preko U-cevi. Sve ukupno, reaktor je sačinjen od 8 posebno štampanih delova. Ukupna dužina reaktora iznosi 4m.



Slika 3.3. Element za povezivanje

3.1.1. Prednosti upotrebe SORP za sintezu prebiotika

Prednosti upotrebe SORP za sintezu prebiotika se ogledaju u već objašnjenim karakteristikama i prednostima ROT i SR opisanih u Poglavlju 1.2.

Spiralni oscilatorni reaktor sa pregradama ima odličan potencijal za ostvarivanje zadovoljavajućih performansi kontinualnog procesa sinteze GOS, jer se podešavanjem procesnih parametara i dimenzija reaktora mogu ispuniti svi potrebni uslovi za odvijanje reakcije. Radi poboljšanja produktivnosti GOS, poželjno je na ulazu u sistem uvoditi koncentrovan rastvor laktoze, što je utvrđeno i u kinetičkim ispitivanjima i rezultatima prikazanim u Poglavlju 2 (Pravilović i sar. 2022.). Da bi rastvor bio stabilan, a i reakcija se odvijala željenom brzinom, potrebno je održavati temperaturu sistema i omogućiti kontrolisanje mešanja. Kao što je već navedeno, kontrola temperature je olakšana zahvaljujući specifičnoj geometriji sistema, to jest velikom odnosu površine i zapremine reaktora. U eksperimentima je reaktor bio potopljen u vodenom kupatilu koje je održavalo temperaturu sistema.

Kontrolisano mešanje u SORP je moguće zbog uvedenog oscilatornog toka, spiralne konfiguracije reaktora i anularnih pregrada kao što je već objašnjeno. Pored stabilnosti rastvora laktoze, kontrolisanim mešanjem se ostvaruje i poboljšanje kontakta sa enzimom. Kako koncentracija nastalih GOS-a nakon dostizanja svog maksimuma može krenuti da opada (objašnjeno u Poglavlju 2.1.5) treba obezbediti tačno definisano vreme zadržavanja. Definisanjem protoka na ulazu, samim tim i na izlazu, za određenu dužinu reaktora i ovaj uslov se može zadovoljiti. S obzirom na to da je reakcija spora i da je zbog toga neophodno obezbediti dovoljnu dužinu reaktora, ovde se takođe ogleda prednost geometrije SORP koja je kompaktna. Još značajnije, SORP omogućava dobro mešanje i usku raspodelu vremena zadržavanja i za male protoke koji obezbeđuju duža vremena zadržavanja. Osim toga, postoji i opcija sa recirkulacionim tokom, kako bi se obezbedio dovoljno veliki protok kroz sam reaktor, što obezbeđuje dobro mešanje. Sa druge strane, opcija sa recirkulacijom omogućava da se koristi vrlo mala vrednost ulaznog (i izlaznog) protoka, čime se obezbeđuje dovoljno dugo vreme zadržavanja, neophodno za reakciju, tj. dostizanje maksimuma koncentracije GOS.

Dakle, SORP je odličan kandidat za zamenu šaržnih reaktora pri proizvodnji GOS-a, jer omogućava: kontrolisano mešanje i to pri malim smicajnim naponima, duže vreme zadržavanja, usku raspodelu vremena zadržavanja, te dobar prenos toplote (za održavanje temperature konstantnom).

3.2. 3D štampanje spiralnog oscilatornog reaktora sa pregradama

3D štampa je inovativna tehnika proizvodnje trodimenzionalnih objekata, sa čijim se razvojem postepeno menja način proizvodnje delova ili celog sklopa uređaja za laboratorijske testove, ali i industrijsku proizvodnju. Konstruisanje elemenata 3D štampom ostvaruje se na različite načine, ali princip je isti. Bazira se na nanošenju tankih slojeva materijala jedan preko drugog pri tome uspostavljajući međusobnu vezu. Usled sve pristupačnijih cena, udeo ove tehnologije doživljava nagli rast, gotovo u svim oblastima. Ono što je prednost 3D štampe jeste, pre svega, njena fleksibilnost u odnosu na klasične metode mašinske obrade i/ili proizvodnje na kalup, te se pomoću iste može ostvariti proizvodnja predmeta kompleksne geometrije, odnosno reaktora, u kratkom vremenskom roku.

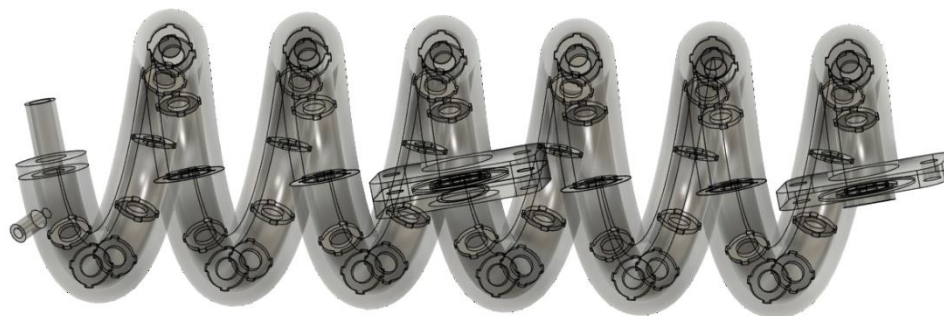
Pre same fizičke realizacije štampe, potrebno je nacrtati željenu geometriju. Crtanje trodimenzionalnih modela može se izvršiti primenom mnogobrojnih CAD programa, a u ovoj tezi je korišćen softverski paket Autodesk *Fusion 360*.

U eksperimentima je korišćen 3D štampani kontinualni spiralni oscilatorni reaktor sa pregradama (SORP). Proces crtanja geometrije SORP detaljno je objašnjen u završnom rad Mirilo 2021. prema opisanoj proceduri u okviru Poglavlja „*Formiranje geometrije u Fusuion-u 360*“. Geometrijske karakteristike SORP koji je korišćen za kontinualnu proizvodnju pebiotika prikazane su u tabeli 3.1.

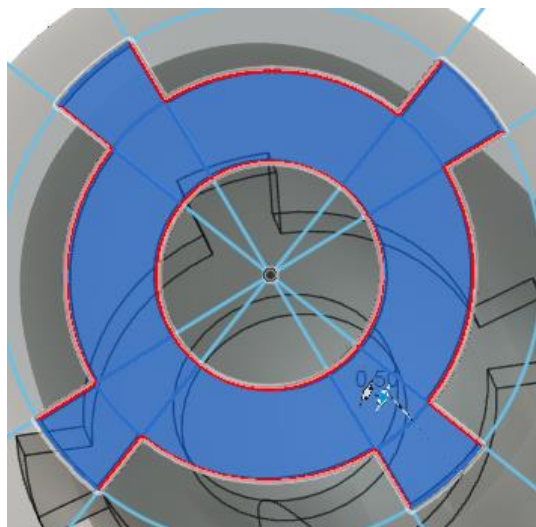
Tabela 3.1. Geometrijske karakteristike spiralnog oscilatornog reaktora sa pregradama (SORP).

Osnovne geometrijske karakteristike sorp		Geometrija cevi u obliku zavojnice	
Broj namotaja cevi u obliku zavojnice	24	Prečnik navoja do ose cevi, $D_{zavojnice}$ [mm]	50
Broj U-cevi	2	Unutrašnji prečnik cevi, d_u [mm]	10
Ukupna dužina [mm]	3996	Spoljašnji prečnik cevi, d_s [mm]	16
Ukupan broj pregrada	248	Korak navoja, p [mm]	30,56
Osnovna geometrija namotaja cevi u obliku zavojnice		Geometrija pregrada	
Dužina segmenta, l_{seg} [mm]	160	Prečnik otvora pregrade, d_{op} [mm]	5
Broj pregrada	10	Rastojanje između pregrada, l [mm]	16
Geometrija primarnih ulaza/izlaza iz reaktora		Razmak između zida i pregrade [mm]	1
Dužina primarnog ulaza - ulaz za fluid koji osciluje [mm]	16	Debljina pregrada, δ [mm]	2
Unutrašnji prečnik cevi primarnog ulaza, $d_{prim,u}$ [mm]	5	Geometrija sekundarnih ulaza/izlaza	
Spoljašnji prečnik cevi primarnog ulaza, $d_{prim,s}$ [mm]	7	Unutrašnji prečnik cevi sekundarnog ulaza, $d_{sec,u}$ [mm]	2,5
Geometrija U-cevi		Spoljašnji prečnik cevi sekundarnog ulaza, $d_{sec,s}$ [mm]	4,5
Dužina U-cevi, $l_{U\ cevi}$ [mm]	78		
Unutrašnji prečnik cevi, $d_{u,Ucevi}$ [mm]	10		
Spoljašnji prečnik cevi, $d_{s,U\ cevi}$ [mm]	16		
Broj pregrada	4		

Geometrija jednog 3D odštampanog dela kontinualnog SORP je prikazan na slici 3.4a, dok je na slici 3.4b prikazana geometrija pregrade. U eksperimentima je korišćen reaktor dužine 4 metra, koji je dobijen spajanjem 2 odštampana dela sa slike 3.4a pomoću U-cevi. Ova dužina reaktora omogućava postizanje većih vremena zadržavanja, koja su potrebna u eksperimentima.



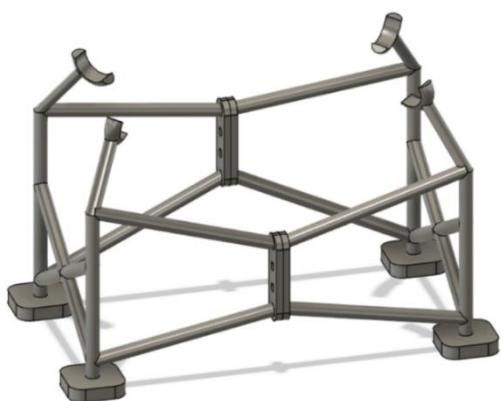
a)



b)

Slika 3.4. Prikaz geometrije: a) reaktorske jedinice, b) pregrada

Reaktor se u eksperimentima koristi u vertikalnoj orijentaciji pa su zato uvedeni i razdvojni nosači (slika 3.5a), koji se po potrebi mogu koristiti. Upotrebom nosača se izbegava direktan kontakt reaktora sa grejačima u vodenom kupatilu, koji može narušiti mehanička svojstva reaktora (slika 3.5b).



a)



b)

Slika 3.5. (a) Dizajn nosača, (b) geometrija reaktorskih jedinica

Nakon što je pomoću Fusion-a 360 formirana geometrija reaktorskog sistema pristupa se njegovoj 3D štampi. U te svrhe je korišćen Formlabs *Form 3+* 3D štampač (slika 3.6) koji koristi tehniku stereolitografije zasnovanu na upotrebi fotoosetljivih polimera koji se pod dejstvom UV svetlosti povezuju u dugačke lance i tako očvršćavaju. U slučaju *Form 3+* kao izvor UV zračenja koristi se laser. Da bi rezultat 3D štampe bio funkcionalan element potrebno je pravilno odraditi proces pripreme modela za štampu i samu realizaciju štampe. Oba procesa detaljno su opisana u završnom radu Mirilo 2021. Za štampanje delova reaktora korišćen je Formlabs Clear Resin (sastav: 55-75 % 7,7,9(ili 7,9,9)-trimethyl-4,13-dioxo-3,14-dioxa-5,12-diazaheptadecane-1,16-diylbismethacrylate; 15-25 % Methacrylic acid, monoester with propane-1,2-diol; <0.9 % Diphenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphine oxide).



Slika 3.6. Formlabs Form 3+ 3D štampač

Pod završnim operacijama podrazumevano je čišćenje komponenti štampača i obrada odštampanog elementa. Potrebno je najpre odvojiti pomoćne delove (tzv. suportove) od odštampanog dela reaktora (ili kleštima ili rukom). Zatim sledi čišćenje zaostalog rezina sa štampe tako što se odštampani deo potopi u ultrazvučno kupatilo napunjeno alkoholom ili vodom. Jedino što preostaje jeste očistiti ploču, pri čemu se čišćenje obavlja upotrebom čistog izopropanola (ili etanola). Na slici 3.7 je prikazan odštampani spiralni element reaktora.



Slika 3.7. Odštampani spiralni element

3.3. Eksperimentalni uslovi za kontinualnu proizvodnju prebiotika

3.3.1. Spajanje i puštanje sistema u rad

Po završetku štampanja svih delova reaktora, može se pristupiti njegovom sastavljanju i puštanju u rad. Na slici 3.2 (prikazano u Poglavlju 3.1) je pokazan odštampani reaktor, sa 8 elementa (3 navoja po elementu) i „U cevi“, spojenih na 4 mesta sa čeličnim zavrtnjima (prečnika 4 mm) i silikonskim gumicama (20 mm spoljnog prečnika, 15 mm unutrašnjeg i čvrstoće 10 Shore). Ukupna dužina reaktora iznosi 4 m.

Kada se svi delovi reaktora spoje, a pre puštanja reaktora u rad, potrebno je izvršiti kalibraciju pumpi. Kalibracija membranske pumpe, koja je korišćena u eksperimentalnom radu, ima opciju samokalibracije što skraćuje vreme samog postupka kalibracije. Pokretanjem pomenute opcije potrebno je izmeriti zapreminu koju pumpa izbaci, uneti izmerenu zapreminu u polje predviđeno za to u podešavanjima i ponovo pokrenuti samokalibraciju. Kalibracija peristaltičkih pumpi podrazumeva iterativnu metodu. Vršeno je merenje zapremine fluida koji je protekao i vremena na osnovu pretpostavljenog broja obrtaja kojim se određuje protok. Postupak je ponavljan nekoliko puta, dok nije dobijena zadovoljavajuća ponovljivost. Treba napomenuti da je greška prilikom merenja protoka približno 1 ml.

Pre izvođenja samih eksperimenata, izvršene su hladna i topla proba. Kod hladne probe u zamenu za prave reaktante koristi se hladna voda. Hladna proba nam pomaže kako bi postupak punjenja reaktora tekao nesmetano tokom prave reakcije i kako u reaktoru ne bi bili zarobljeni mehurići vazduha u velikoj količini. Takođe, tokom probnih eksperimenata se uči tehnika uzorkovanja. Važnost toplih proba se, pre svega, ogleda u održavanju temperature vodenog kupatila, jer se u eksperimentima koristi rastvor laktoze koji zahteva određenu temperaturu. Temperatura u sistemu (izlazu iz reaktora) merena je ručno, termometrom. Maksimalna temperatura za rad membranske pumpe je 45 °C, a rastvor laktoze zahteva temperaturu od 42 °C, tako da je optimalna temperatura tokom eksperimenata održavana u opsegu od 44-44,5 °C. Poslednja proba vršena je sa rastvorom laktoze i bez enzima. Korišćen je 40 % rastvor laktoze u puferu. Ovaj tip probe vršen je zbog karakteristika rastvora laktoze. Proverava se gustina rastvora i utvrđuje se da li će rastvor laktoze kristalirati.

Posle izvedenih opisanih proba, potrebno je izvršiti punjenje reaktora rastvorom supstrata, kao i povezivanje reaktora sa pumpama. Izgled reaktorskog sistema u toku rada je prikazan na slici 3.8. U eksperimentu je korišćena membranska pumpa Smart Digital DDC za generisanje oscilatornog toka, dok se peristaltička pumpa LLG-Uni PERISTALTICPUMP 1 koristila za normalni tok. Merenje temperature i protoka vršeno je na izlazu iz sistema, dok je uzorkovanje reakcione smeše vršeno na polovini i na izlazu iz reaktora.



Slika 3.8. Izgled reaktorskog sistema u toku rada

3.3.2. Eksperimentalni uslovi i postupak izvođenja eksperimenata

Pre početka izvođenja eksperimenata, potrebno je proračunati protoke i koncentracije ulaznih struja (laktoze i enzima) tako da se njihovim spajanjem ispune uslovi zadati eksperimentom (tabela 3.2). Pri tome treba imati na umu i fizička ograničenja u pogledu maksimalne rastvorljivosti supstrata i enzima. Pre svega, potreban nam je 40 % rastvor laktoze za punjenje reaktora. Zatim nam je potreban rastvor laktoze veće koncentracije od 40 %, koji će predstavljati ulaznu struju supstrata. Nakon rastvora laktoze, priprema se rastvor enzima. Kada oba rastvora uđu u reaktor reakcija započinje. Stoga, treba preračunati koncentraciju rastvora na ulazu u sistem da bi unutar reaktora ona iznosila 40 %, a koncentracija enzima treba da bude od 0,3 do 2 g/l (u zavisnosti od uslova eksperimenta, tabela 3.2). Detaljni proračuni su prikazani u master radu Mirilo 2022.

Jednačina po kojoj se računa odnos recikla i ukupnog protoka $FR(\%)$ je:

$$FR = \frac{Q_r}{Q_{ul}} \quad (3.1)$$

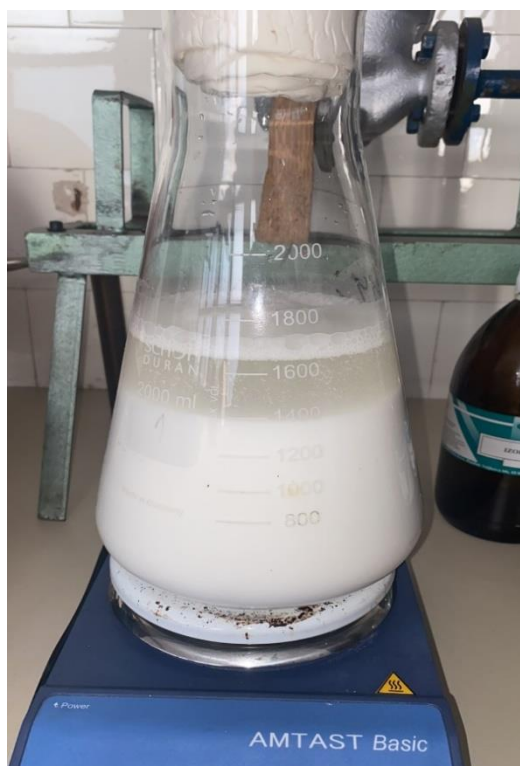
Srednje vreme zadžavanja se računa u odnosu na ukupni protok po jednačini:

$$\tau = \frac{V}{Q_{uk}} \quad (3.2)$$

Tabela 3.2. Procesni uslovi u izvedenim eksperimentima.

Exp	Q_{ub} , ml/min	Q_r , ml/min	$C_{ul,L}$, mmol/l	$C_{ul,E}$, mg/ml	Q_{uk} , ml/min	FR, %	τ , min
enzim	20,4	38,1	/	2	58,5	65,1	14,83
1.	20,4	38,1	1277	2	58,5	65,1	14,83
2.	53,0	/	1249	1,1	53,0	0	5,72
3.	4,03	54,5	1300	2	58,5	93,1	75,19
4.	23,1	/	1299	2	23,1	0	12,62
5.	17,58	/	1366	1,5	17,58	0	16,58
6.	17,58	/	1275	0,3	17,58	0	16,58

Procedura pravljenja rastvora laktoze podrazumeva pripremu pufera. Za svaki eksperiment je bila potrebna zapremina pufera od 3,5 litara. Korišćen je 10 mM Na-acetatni pufer čiji je pH 4,5. Konkretno za 3,5 litara pufera je dodato 2,03 grama Na-acetata tetrahidrata i 1,19 ml sirćetne kiseline i dopunjeno je destilovanom vodom. Priprema oba rastvora laktoze (i 40 % i 43 %) je vršena na magnetnim mešalicama u erlenmajer posudama od 2 l. Rastvor je zagrevan do temperature 80 °C i mešan sve dok u potpunosti nije postao bistar (slika 3.9). Na slici 3.9. se može videti zagrevanje rastvora laktoze u erlenmajeru.

**Slika 3.9.** Priprema rastvora laktoze

Kada je rastvor laktoze zagrejan do odgovarajuće temperature (85-90 °C) i postao kompletno bistar, usledilo je njegovo hlađenje. Hlađenje može biti spontano ili uz pomoć hladne vode i vršeno je kako bi se dostigla optimalna temperatura od 44 °C. Rastvor laktoze je i pri zagrevanju i pri hlađenju prekriven ili folijom ili vatenim čepom kako ne bi došlo do isparavanja i potencijalnog kristalisanja rastvora. Dok se rastvor hladi može se vršiti priprema epruveti za uzorkovanje. Ependorf epruvete se nakon uzorkovanja ubacuju u posudu sa ključalom vodom kako bi došlo do prekida reakcije.

Nakon što se rastvor 40 % laktoze ohladio počinje se sa procedurom punjenja reaktora. Prvo se pokrene membranska pumpa i sačeka se da crevo izbaci sav vazduh, nakon toga crevo se može povezati za reaktorsku jedinicu. Punjenje reaktorske jedinice se vrši tako što se ona okreće tako da se ulazni tok rastvora nalazi normalno na pregradi. Razlog ovakvog punjenja je izbegavanje pojave i zarobljenja mehura vazduha koji se mogu javiti iza pregrada. Nakon toga treba pažljivo uroniti taj deo reaktora u posudu sa rastvorom za punjenje. Tokom ovog procesa treba paziti da su ventili i otvori reaktora potopljivi kako ne bi ušla velika količina vazduha. Punjenje druge reaktorske jedinice je potpuno identičan postupak. Na kraju se reaktorske jedinice potopljene povezuju elementom za povezivanje, a potom se i povezuju ulazno i izlazno crevo membranske pumpe. Reaktor sada može da se postavi na odgovarajuće postolje. Sledeći korak je postavljanje posude za enzim. Naime, enzim se nalazi rastvoren u malom erlenmajeru postavljenom na magnetnu mešalicu. U erlenmajer se uranja crevo peristaltičke pumpe.

Startovanje reakcije vrši se istovremenim otvaranjem ventila koji regulišu ulaz enzima i ulaz laktoze. Ventili na sekundarnom izlazu iz sistema treba da budu zatvoreni. Uzorkovanje se vrši na polovini sistema tako da trokraki ventil bude otvoren i da se tok fluida preusmeri sa druge reaktorske jedinice ka ventilu. Kod izlaza iz reaktora uzorkovanje se vrši direktno iz izlaznog creva koje je uronjeno u praznu čašu. Nakon uzorkovanja, koje treba da se vrši brzo, ependorfi se stavljaju u posudu sa ključalom vodom, te se reakcija prekida. Takođe je vršeno merenje temperature na izlazu iz reaktora, postavljanjem termometra u izlazno crevo. Pored temperature na izlazu iz reaktora merio se i protok standardnom metodom pomoću istekle zapremine u vremenu. Urađeno je šest eksperimenata kontinualne proizvodnje GOS-a u spiralnom reaktoru sa pregradama i jedan eksperiment u kome je u reaktor ulazio samo rastvor enzima.

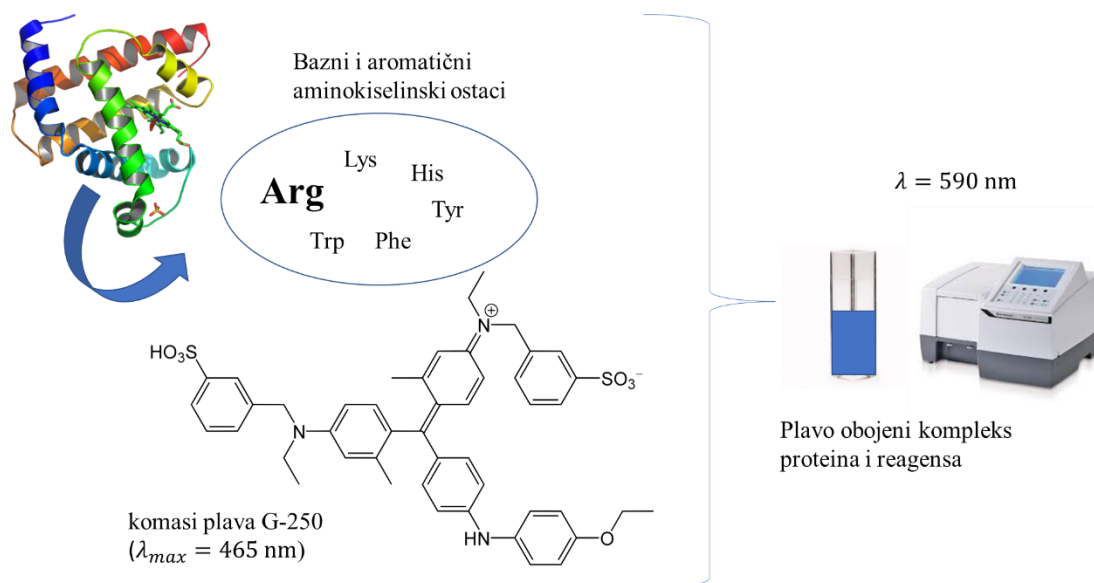
Raspored eksperimenata i zadati procesni uslovi su prikazani u tabeli 3.2. Koncentracija laktoze je u svim eksperimentima približno jednaka 1250 mmol/l (odgovara 40 mas.%) dok je varirana koncentracija enzima u opsegu od 0.3 do 2 mg/ml. Treba napomenuti da je u eksperimentima 1, 2 i 3 korišćen enzim β -galaktozidaze E1 sa karakteristikama aktivnosti 12,1 IU, dok je u eksperimentima 5 i 6 korišćen enzim β -galaktozidaze E2 sa većom aktivnošću od 59,4 IU. U eksperimentu 4 su pomešani enzimi E1 i E2. U tabeli 3.2 se može uočiti da je variran ulazni protok, kako bi se dobila i ispitala različita srednja vremena zadržavanja. U eksperimentima 1. i 3. je korišćen recikl sa recirkulacionim odnosima 65,1 % i 93,1 %, respektivno. Kao što je ranije navdano, uvođenje recikla je omogućilo veća vremena zadržavanja, jer su ulazni (i izlazni) protoci manji.

3.3.3. Analitičko određivanje koncentracije jedinjenja

Određivanje sastava jedinjenja šećera u uzorcima rađeno je hromatografskom metodom, tj. tačnom hromatografijom visokih performansi (HPLC, High-Pressure Liquid Chromatography), koja je detaljno opisana u Poglavlju 2.1.2.

Metoda korišćena za analizu uzoraka enzima β -galaktozidaze je Bredfordova metoda. Pomenuta metoda se zasniva na nekovalentnom vezivanju proteina i anjonskog oblika molekula komasi plave G-250 (Coomassie Blue G-250) u kiseljoj sredini.

Naime, prvo je konstruisana kalibraciona prava u rasponu od 0-0,3 mg/ml pomoću napravljenih rastvora (razblaženjem) poznatog sastava. Razblaženja su pravljena pomoću albumina iz goveđeg seruma – BSA i vode u određenom zapreminskom odnosu. Na osnovu dobijene kalibracione prave određen je ukupni sadržaj proteina u uzorku. Isti postupak je ponovljen za enzim β -galaktozidazu gde je napravljena tabela u rasponu od 0-2 mg/ml. Nakon razblaženja, u epruvete je sipano 50 μ l uzorka i 1000 μ l Bredfordovog reagensa, u oba slučaja. Metoda podrazumeva da se nakon sipanja Bredfordovog reagensa uzorak dodatno promeša, zatim se čeka pet minuta kako bi se formirala odgovarajuća boja i izmerila apsorbanca na spektrofotometru. Boja je stabilna narednih sat vremena i apsorbanca za date uzorke merena je na 590 nm. Kalibraciona prava daje zavisnost apsorbance od koncentracije proteina. Pomoću nagiba koji je dobijen konstruisanjem kalibracione prave određuje se koncentracija proteina u uzorcima. Koncentracija proteina je data kao količnik očitane apsorbance za dati uzorak i brojne vrednosti nagiba. Metoda po Bredfordu je korišćena za određivanje koncentracije proteina, tj. enzima u tri eksperimenta. Reakcija sa bojom je šematski prikazana na slici 3.10.



Slika 3.10. Reakcija proteina sa anjonskim oblikom boje komasi plava G-250

3.4. Eksperimentalni rezultati kontinualne proizvodnje GOS

Kao što je prethodno navedeno, urađeno je šest eksperimenata kontinualne proizvodnje GOS-a u SORP, kao i jedan eksperiment u kome je u sistem ulazio samo rastvor enzima, a umesto laktoze je bio pufer. Procesni uslovi su dati u tabeli 3.2.

U tabeli 3.3 su prikazane koncentracije svih komponenata kontinualne proizvodnje GOS-a u SORP u stacionarnom stanju. Stacionarne koncentracije su očitane sa grafika, tj. za krajnje vreme reakcije.

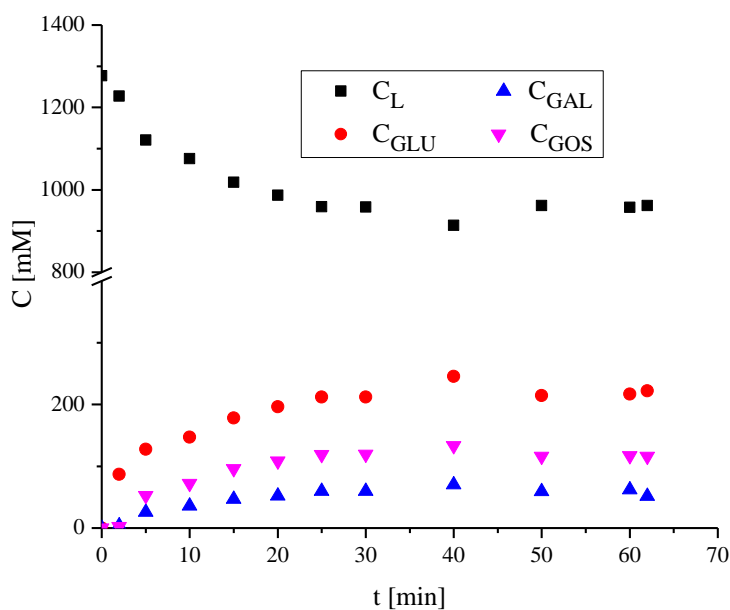
Tabela 3.3. Stacionarne koncentracije svih komponenti u izvedenim eksperimentima u SORP.

Exp	C_L^{SS} , mmol/l	C_{GOS}^{SS} , mmol/l	C_{GAL}^{SS} , mmol/l	C_{GLU}^{SS} , mmol/l	τ , min
1.	961,8	116,03	51,4	222	14,83
2.	973,5	99,44	53,3	193,7	5,72
3.	700,2	185,22	161,5	451,3	75,19
4.	790,4	190,04	118,6	302,7	12,62
5.	667,2	203,73	186,9	486,7	16,58
6.	897,8	139,86	75,5	242,6	16,58

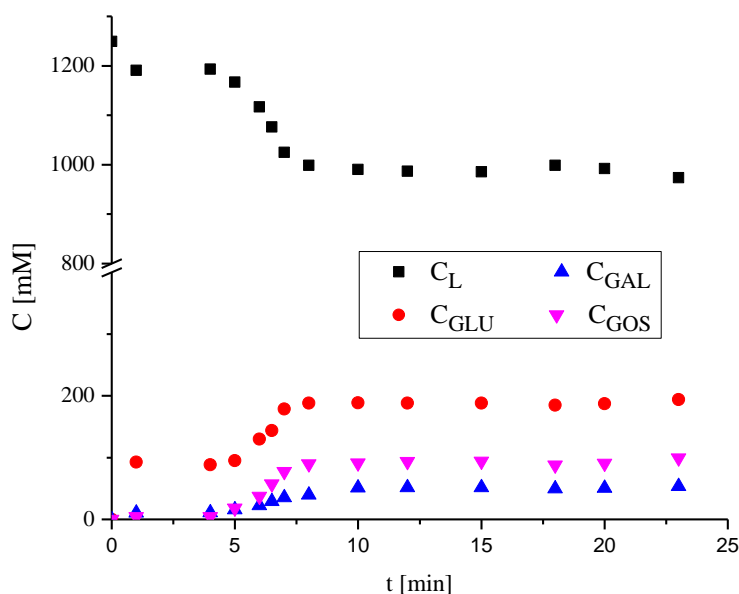
Treba napomenuti da je u rezultatima data ukupna koncentracija GOS-a (GOS3 + GOS4), s tim što je dominantan proizvod GOS3. Možemo primetiti da je najviše laktoze potrošeno u trećem eksperimentu, koji je i najduže trajao. Najviše GOS-a je nastalo u petom eksperimentu. Količina nastalog GOS-a je značajna i kreće se u ospegu od 100 do 200 mmol/l, naročito u eksperimentima 4 i 5, što je prvi pokazatelj da je SORP validna opcija za kontinualnu proizvodnju GOS. U sledećem poglavlju (Poglavlje 3.6) će biti prikazani drugi značajni rezultati, kao što su selektivnost, prinos i produktivnost, te će se više diskutovati o rezultatima eksperimenata i poređenju sa šaržnim sistemom.

Na slikama 3.11 i 3.12. su prikazane promene koncentracija laktoze, glukoze, galaktoze i GOS-a na izlazu iz reaktora sa vremenom za eksperimente 1 i 2 respektivno.

Za eksperiment 1 se može videti da se stacionarno stanje, kada nema značajne promene koncentracije komponenti, uspostavlja posle 30-tak min ili približno posle dva srednja vremena zadržavanja. Sa slike 3.11 može se uočiti da u eksperimentu najviše nastaje glukoze, zatim GOS, pa galaktoze, što je i očekivano na osnovu kinetičkih ispitivanja (Poglavlje 2).

**Slika 3.11.** Promena koncentracije laktoze i proizvoda na izlazu iz reaktora sa vremenom za eksperiment 1

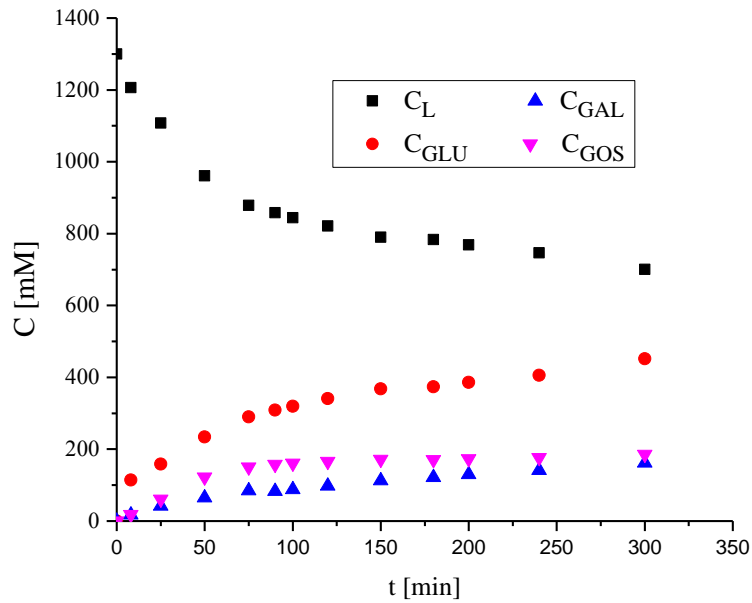
Za eksperiment 2 se može videti sa slike 3.12 da se stacionarno stanje uspostavlja posle 10-tak min, takođe približno posle dva srednja vremena zadržavanja. Može se uočiti da su nagibi promene koncentracija u eksperimentu 2 strmiji u odnosu na one u eksperimentu 1, iako su ukupni protoci kroz reaktor slični. U prvom eksperimentu je veći protok postignut reciklom. Razlog za strmiji nagib je taj što se reciklom razblažuju koncentracije reaktanta (laktoze) u prvom delu reaktora, tako da se efekat dužeg vremena zadržavanja (eksperiment 1) donekle anulira. I u eksperimentu 2 je dobijen sličan trend odnosa koncentracija proizvoda postignutih u stacionarnom stanju, kao i u eksperimentu 1. S tim što treba primetiti da finalna koncentracija GOS ima sličnu vrednost kao u eksperimentu 1, iako je korišćeno 2,5 puta manje vreme zadržavanja. Ovo takođe ukazuje na potencijal za kontinualno izvođenje reakcije, sa dobrim prinosima u kratkim vremenima zadržavanja i bez upotrebe recikla.



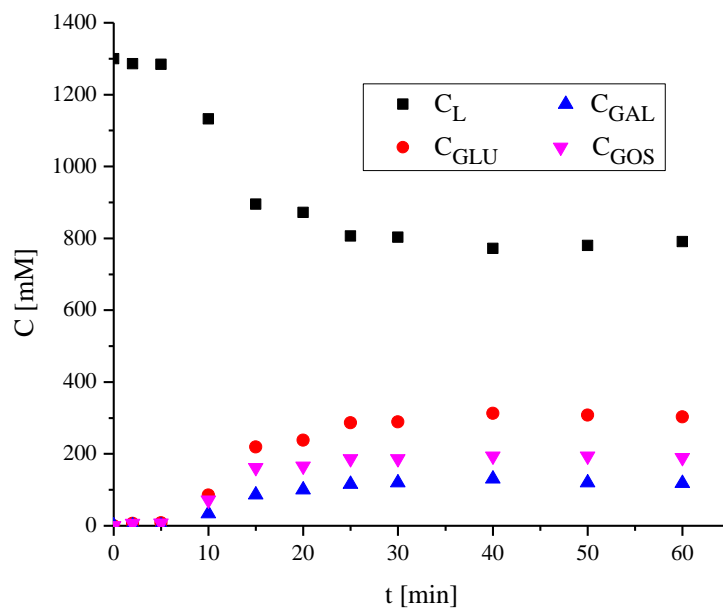
Slika 3.12. Promena koncentracije laktoze i proizvoda na izlazu iz reaktora sa vremenom za eksperiment 2

Na slikama 3.13 - 3.15 su prikazane promene koncentracija svih komponenti na izlazu iz reaktora sa vremenom za eksperimente 3, 4 i 5. Za treći eksperiment se može videti da je stacionarno stanje uspostavljeno posle 150 min (slika 3.13), dok je za eksperimente 4 i 5 potrebno 30 min (slike 3.14 i 3.15). Ta vremena takođe odgovaraju dvostrukim vrednostima vremena zadržavanja. U trećem eksperimentu je korišćen veliki protok recikla, a vrlo mali ulazni protok, pa je postignuto značajno veće vreme zadržavanja (od 75 min). Veće vreme zadržavanja jeste rezultovalo povećanjem koncentracije GOS u odnosu na eksperimente 1 i 2. na oko 185 mmol/l. Međutim, neophodno je razmotriti opravdanost upotrebe recikla, jer je vreme zadržavanja povećano mnogostruko (13 puta), a koncentracija GOS je povećana za oko 85 %. Ovo znači da je produktivnost GOS u eksperimentu 3 mnogo manja od onog u eksperimentu 2, bez obzira na veću apsolutnu vrednost GOS. Stoga je potvrđeno da recikl nije neophodan, u slučaju da je dužina reaktora 4 m. Za kraće reaktore uvođenje recikla bi se moglo smatrati opravdanim. Tu tvrdnju potkrepljuje i eksperiment 4, u kome su korišćene iste koncentracije enzima, kao u eksperimentu 3, a vreme zadržavanja je 12,6 min, pri čemu je dobijena koncentracija GOS nešto veća i iznosi 190 mmol/l, što je upoređeno na slici 3.16. Ovo deluje kao dosta bolji rezultat (prinos GOS) od eksperimenta 1, gde je korišćeno slično vreme zadržavanja od 14,8 min, kao i ista koncentracija enzima. Međutim, glavni razlog nije odsustvo recikla, već to da je u rastvoru enzima bio prisutan i aktivniji enzim E2 (videti Poglavlje 3.3.2). To je potvrđeno u eksperimentu 5, gde je dobijena koncentracija GOS od 200 mmol/l, a za manju koncentraciju enzima

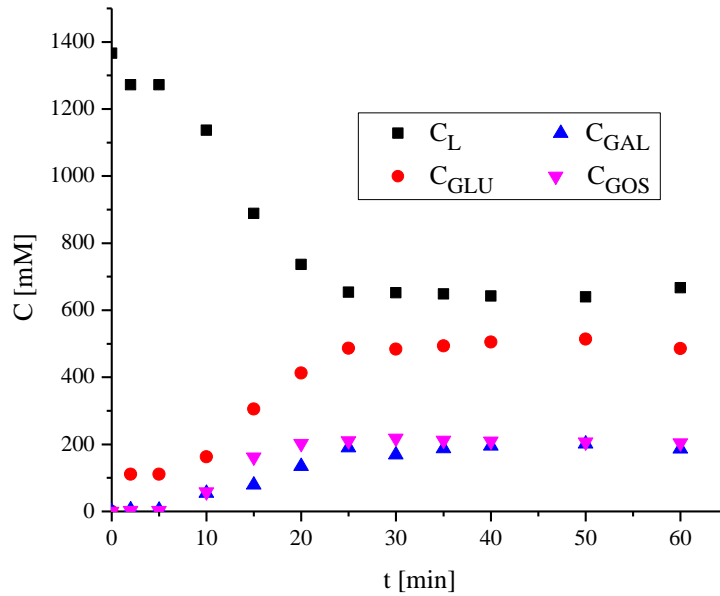
i nešto veće vreme zadžavanja od 16,6 min. U eksperimentima 5 i 6 je korićen samo aktivniji enzim E2, koji omogućava bržu reakciju, tj. konverziju u GOS.



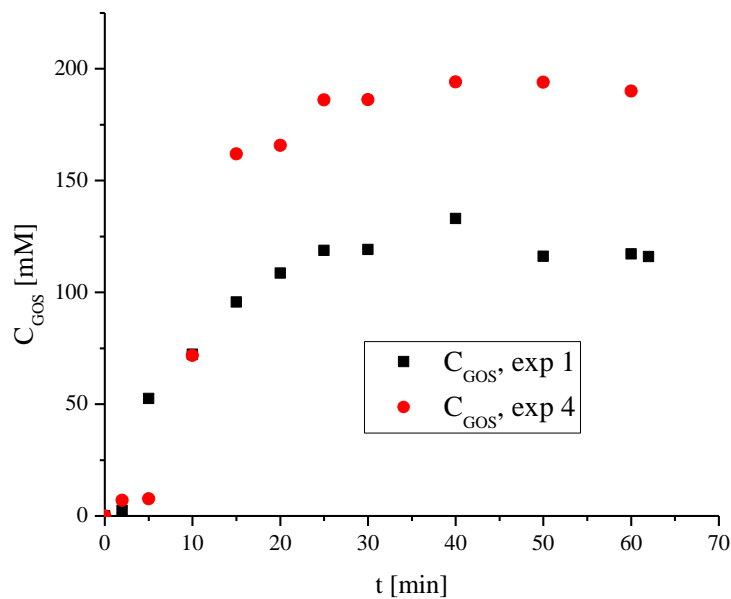
Slika 3.13. Promena koncentracije laktoze i proizvoda na izlazu iz reaktora sa vremenom za eksperiment 3



Slika 3.14. Promena koncentracije laktoze i proizvoda na izlazu iz reaktora sa vremenom za eksperiment 4

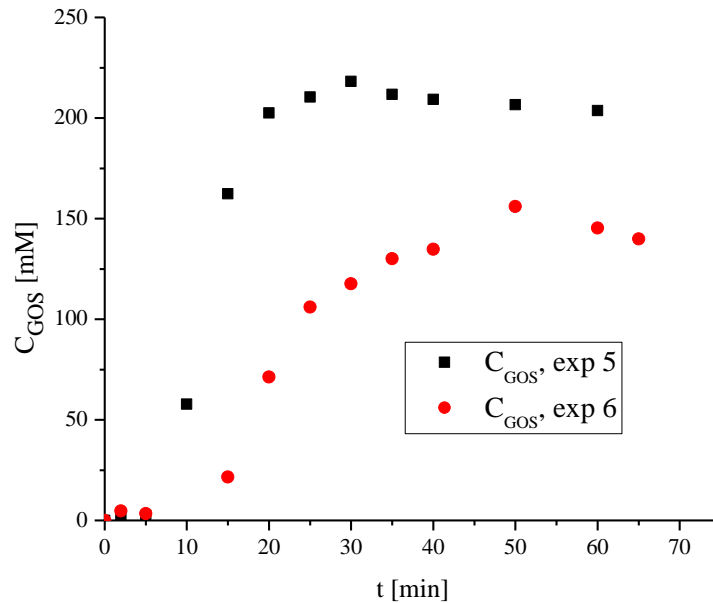


Slika 3.15. Promena koncentracija laktoze i proizvoda na izlazu iz reaktora sa vremenom za eksperiment 5



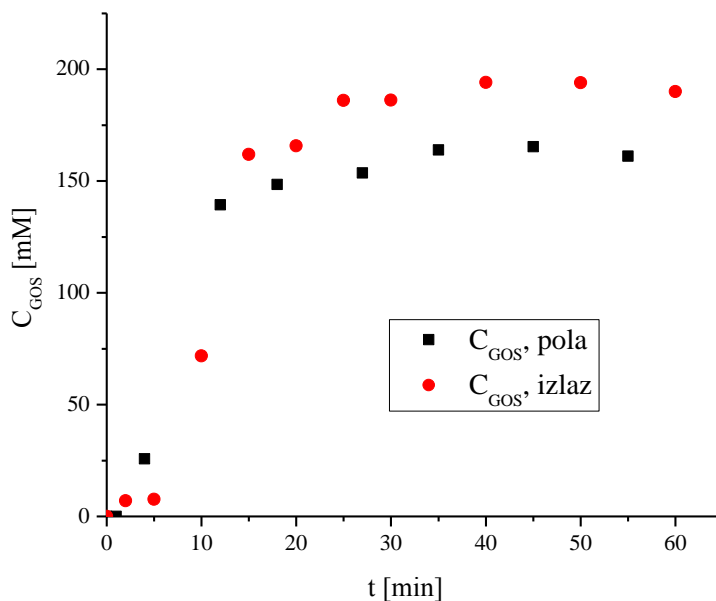
Slika 3.16. Promena koncentracija GOS na izlazu iz reaktora sa vremenom za eksperimente 1 i 4

U eksperimentu 6 je ispitana mogućnost velikog sniženja koncentracije enzima E2 – pet puta manja od one u eksperimentu 5, dok su ostali uslovi isti. Na slici 3.17 su upoređeni koncentracioni profili GOS za eksperimente 5 i 6, gde se uočava da je u eksperimentu 6 očekivano dobijena manja vrednost GOS za oko 43%, ali sa 5 puta manjom koncentracijom enzima E2. Ovo ukupno ukazuje da aktivnost enzima ima najveći uticaj, te da je upotrebom E2 moguće postići visoke koncentracije GOS u kratkom vremenu zadržavanja (velika produktivnost), bez upotrebe recikla. Takođe je moguće koristiti manje koncentracije enzima.

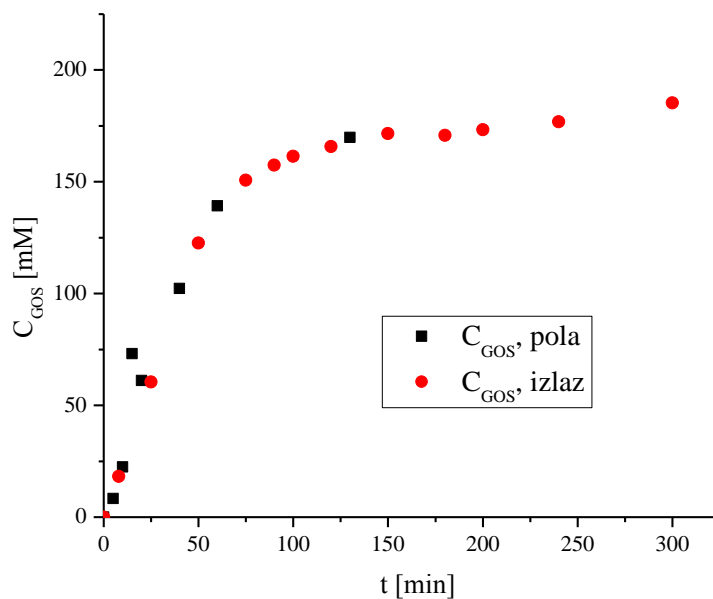


Slika 3.17. Promena koncentracija GOS na izlazu iz reaktora sa vremenom za eksperimente 5 i 6

Na narednim graficima upoređeni su rezultati na polovini i na kraju reaktora (izlazu) za eksperimente 3 i 4. Sa grafika 3.18 i 3.19 se uočava postojanje razlika između stacionarnih koncentracija GOS, koje je oko 19 %. Za eksperiment 4 je stacionarna koncentracija GOS na polovini reaktora 160 mM, dok je na izlazu 190 mM. Trendovi promena koncentracija svih komponenti su slični i za ostale eksperimente bez recikla. Ovo je očekivano, jer pola reaktora predstavlja pola vremena zadržavanja, a razlika od oko 19 % (manje od 50 %) potiče od toga što je na ulasku u reaktor veća koncentracija reaktanta, pa je brzina reakcije (konverzije laktoze) veća u prvoj polovini. Sa druge strane za eksperiment 3 je na pola i na kraju reaktora vrlo slična koncentracija (slika 3.19). Razlog za to je što se cevni reaktor sa velikim reciklom približava ponašanju reaktora sa idealnim mešanjem (ulazna koncentracija reaktanta biva razblažena izlaznom). Ovaj rezultat i argument potvrđuje gore navedena zapažanja o manjoj efikasnosti sistema sa reciklom, tj. neopravdanosti njegovog uvođenja, kada je dovoljno velika dužina reaktora, kao što je u ovom slučaju.

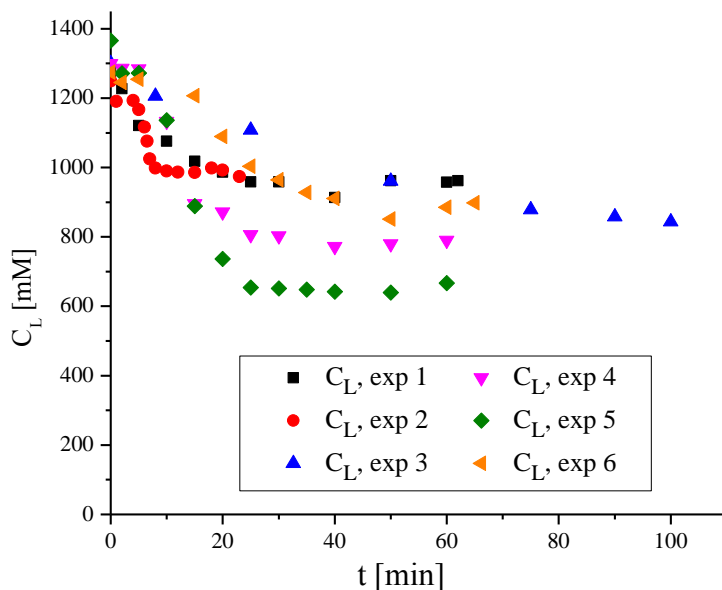


Slika 3.18. Promena koncentracija GOS na pola i na izlazu iz reaktora sa vremenom za eksperiment 4

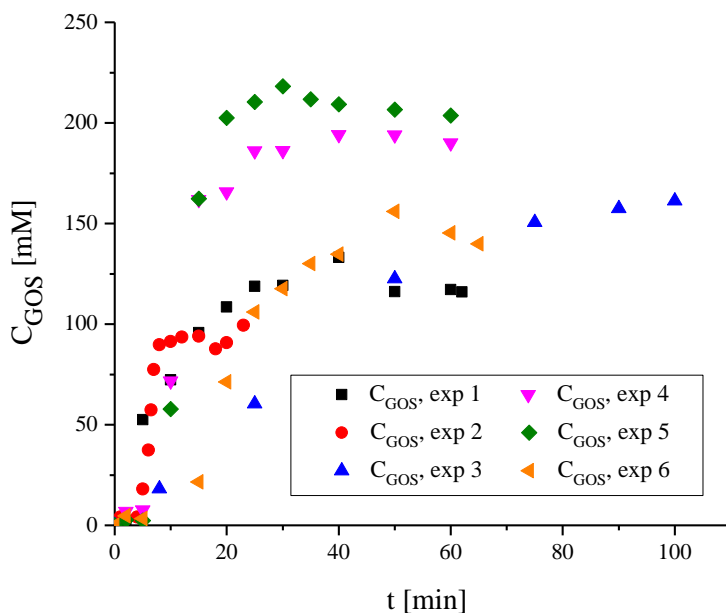


Slika 3.19. Promena koncentracije GOS na pola i na izlazu iz reaktora sa vremenom za eksperiment 3

Na slikama 3.20 i 3.21 su prikazane promene koncentracija laktoze i GOS-a sa vremenom za svih 6 eksperimenata. Treći eksperiment je trajao najduže (jer ima najveće vreme zadržavanja), pa je za njega prikazan period od prvih 100 min. Može se primetiti da se u eksperimentu 5 najviše laktoze potrošilo i samim tim nastalo i najviše GOS-a (oko 200 mM). Ovo je prvenstveno posledica korišćenja aktivnijeg enzima E2, što je ranije diskutovano.



Slika 3.20. Promena koncentracija laktoze sa vremenom za sve eksperimente

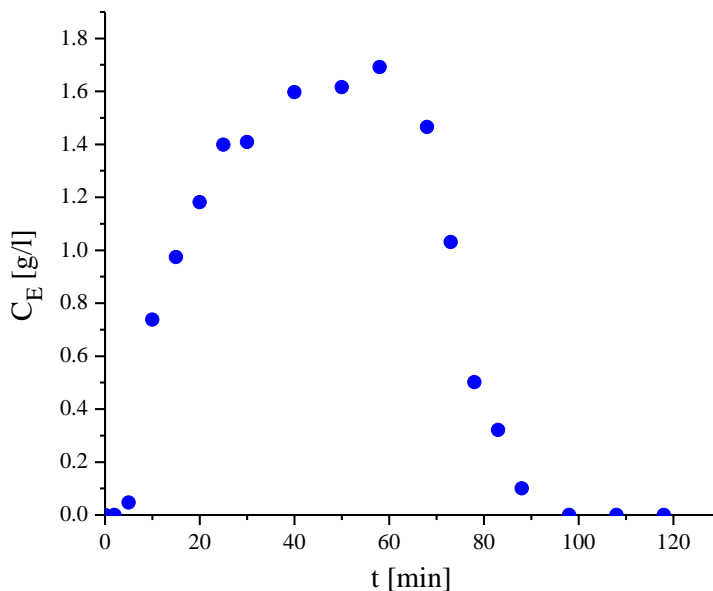


Slika 3.21. Promena koncentracija GOS sa vremenom za sve eksperimente

Sa slika 3.20 i 3.21 može se potvrditi i dobar rezultat za eksperiment 2, u kome je sa manje aktivnim enzimom E1 u kratkom vremenu zadržavanja postignut zadovoljavajući rezultat. Kao što je navedeno, oštar nagib krive ukazuje na dobro mešanje i usku raspodelu vremena zadržavanja, koja potiče od većeg protoka kroz reaktor, bez recikla, što se uočava bolje na ovim uporednim graficima.

Zbog potpunije diskusije, u eksperimentima je analizirana i koncentracija enzima u kontinualnom reaktoru. Enzim se u toku reakcije ne troši, pa bi nakon uspostavljanja stacionarnog stanja, ulazna koncentracija trebalo da bude jednaka izlaznoj. Koncentracije enzima merene su određivanjem sadržaja proteina Bredfordovom metodom (opisano u poglavlju 3.3.3). Na slici 3.22 je prikazana promena koncentracije enzima na izlazu iz reaktora sa vremenom za eksperiment u kome je ulazio samo enzim. Prvih 60 min je enzim pricao u reaktor koncentracijom od 2 mg/ml i protokom

od 58,5 ml/min, a zatim je narednih 60 min vršeno “ispiranje“ reaktora istim protokom (ulazio je samo pufer). Iako je ulazna (željena) koncentracija enzima je bila 2 mg/ml, na kraju dela eksperimenta sa uvođenjem enzima (nakon 60 min) je dobijeno oko 1,7 mg/ml. Posle 60 min se sa slike 3.22 može videti da koncentracija enzima opada (ispiranje) i da posle 90 min nema enzima na izlazu iz reaktora.



Slika 3.22. Promena koncentracije enzima na izlazu iz reaktora sa vremenom

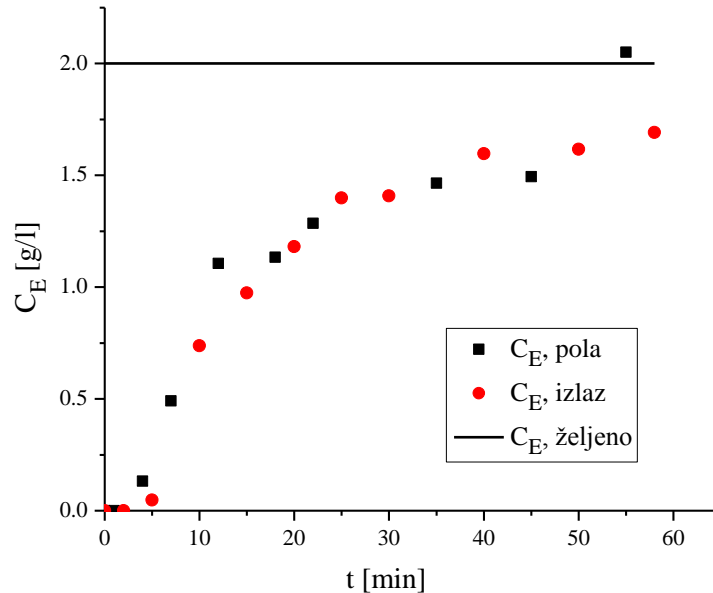
Koncentracije enzima su praćene i u ostalim eksperimentima. U tabeli 3.4 su prikazane ulazne (željene) i izmerene vrednosti koncentracije enzima u eksperimentima, u stacionarnom stanju. Vrednost u stacionarnom stanju je izračunata analogno kao za ostale komponente, kako je opisano gore u tekstu. Slično kao kod eksperimenta sa samim enzimom (slika 3.22). primećeno je da su sve izmerene vrednosti na izlazu manje od ulaznih, tj. željenih vrednosti koncentracija enzima. Tokom eksperimenata su provereni protoci rastvora enzima, jer je potvrđeno da pripremljene količine rastvora protiču onoliko vremena koliko je proračunom određeno. Stoga se može zaključiti da uzrok manje koncentracije nije pogrešna vrednost protoka enzima. Ukoliko se isključe drugi mogući uzroci eksperimentalne greške, poput neadekvatne analitike i grubih (ljudskih) greški, jedno od objašnjenja bi moglo da bude da je enzim u određenoj količini adsorbovan na zidove i pregrade reaktora.

Tabela 3.4. Koncentracije enzima u eksperimentima u SORP.

Exp	C _{E,željeno} , g/l	C _{E,izm,pola} , g/l	C _{E,izm,izlaz} , g/l
enzim	2	1.67	1.64
1.	2	/	0.94
2.	1.1	/	0.74
3.	2	/	0.78
4.	2	1.92	1.92
5.	1.5	1.30	1.32
6.	0.3	0.198	0.24

Na slici 3.23 se može videti promene koncentracije enzima sa vremenom na pola i na izlazu iz reaktora. Sa slike 3.23, na kojoj je prikazan eksperiment samo sa enzimom, gde nema reakcije, može se uočiti da se koncentracija enzima na polovini i na kraju reaktora dosta poklapa i da je koncentracija oko 1,64 g/l. Izuzetak je tačka na polovini reaktora, u 55. minutu kada se dostiže koncentracija slična željenoj od 2 g/l (crna linija). Pretpostavlja se da je to eksperimentalna greška, jer na izlazu iz reaktora nije dostignuta željena koncentracija od 2 g/l. Očekuje se da se stacionarno

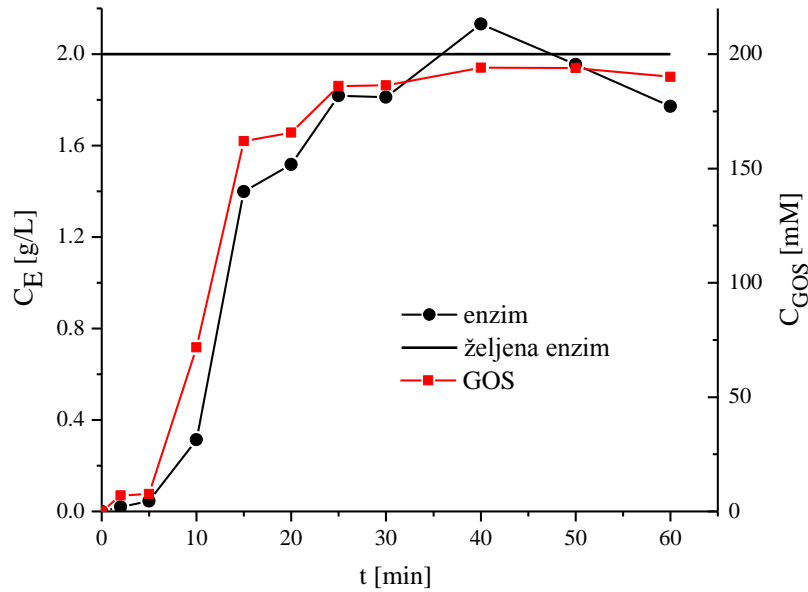
stanje uspostavi nakon 30 minuta, dok se uočava na grafiku da koncentracija blago raste i posle tog perioda. To ukazuje da nije sigurno da je uspostavljeno stacionarno stanje za odabrano vreme zadržavanja. Ovi rezultati takođe ukazuju da je moguće da se na zidove reaktora vezuje enzim, i to više u prvoj polovini reaktora, koji se vrlo polako oslobađa (desorbuje).



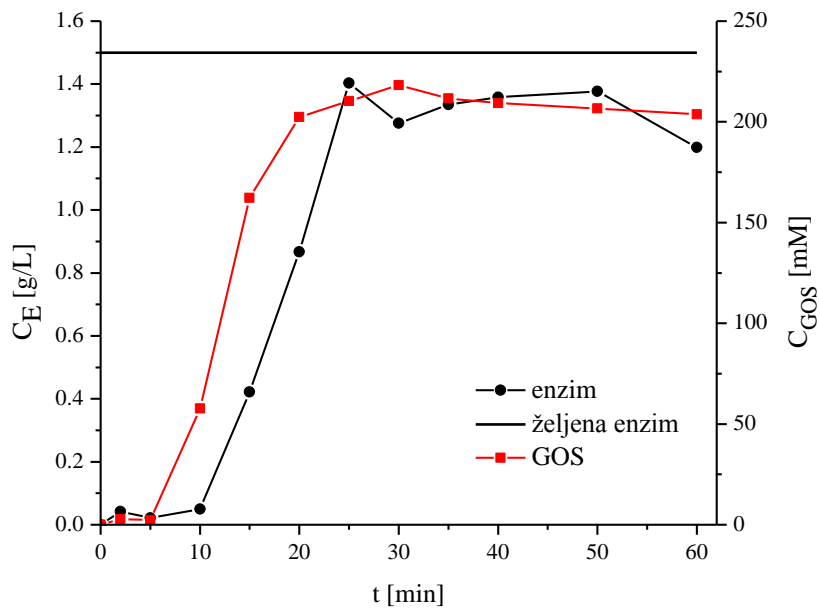
Slika 3.23. Promena koncentracije enzima sa vremenom za eksperiment samo sa enzimom. Ulazna (željena) koncentracija enzima je prikazana crnom linijom

Slični rezultati i promene koncentracije enzima u vremenu se dobijaju i za eksperimente 1-6, s tim da su razlike između ulaznih i izlaznih vrednosti posebno velike za eksperimente 1-3 (videti tabelu 3.4), dok su razlike manje za eksperimente 4-6.

Dodatno su upoređeni koncentracioni profili enzima i GOS-a na slikama 3.24 i 3.25. Može se primetiti da za prikazane eksperimente 4 i 5, front koncentracije GOS-a putuje brže kroz SORP nego enzim, što se jasnije vidi za eksperiment 5. To se slaže sa rezultatima prikazanim u tabeli 3.4, jer je razlika između ulaza i izlaza veća za eksperiment 5 u odnosu na eksperiment 4. Ovaj rezultat je još jedan pokazatelj da se određena količina enzima imobilizuje na zidove SORP i tamo zadržava neko duže vreme, koje nije određeno u eksperimentima.



Slika 3.24. Promena koncentracije enzima i koncentracije GOS za SORP sa vremenom za eksperiment 4



Slika 3.25. Promena koncentracije enzima i koncentracije GOS za SORP sa vremenom za eksperiment 5

Kako bi se razlike uočene na prethodnim slikama i tabeli 3.4. dodatno proverile, kvantifikovale i objasnile moguće zadržavanje (imobilizacija) enzima, izvedeno je materijalno bilansiranje za enzim u eksperimentima. Masa enzima na ulazu je računata prema formuli:

$$m_{ulazE} = V_E \cdot C_{ulazE} \quad (3.1)$$

Masa enzima na izlazu je dobijena pomoću formule:

$$m_{izlazE} = Q \cdot \int C \cdot dt \quad (3.2)$$

Za vreme trajanja procesa od početka kada je $t=0$ do trenutka $t=t_F$ kada se proces završava (t_f) važi:

$$m_{ulazE} - m_{izlazE} = m_{r,t_f} \quad (3.3)$$

gde je m_{r,t_f} masa enzima koja je zaostala u reaktoru u trenutku t_f .

Na osnovu tako izračunate vrednosti m_{r,t_f} (iz jednačine 3.3) može se proceniti doprinos imobilizacije ili neplaniranog zadržavanja enzima u reaktoru. Masa enzima m_{r,t_f} je podeljena na dve komponente: a) masa rastvorenog enzima u tečnosti koja se nalazi u reaktoru u tom trenutku i koja se može izračunati kao proizvod zapremine reaktora i koncentracije rastvorenog enzima, pa je tako $c_{E,sol}$ koncentracija enzima na izlazu u trenutku t_f , b) masa enzima koji je „imobilisana“, pa se može proceniti njegova koncentracija ($c_{E,imob}$, izražena po zapremini reaktora) iz jednačine:

$$m_{r,t_f} = V_r \cdot (c_{E,sol} + c_{E,imob}) \quad (3.4)$$

Na ovaj način se, na osnovu izračunate mase m_{r,t_f} i izmerene $c_{E,sol}$ može izračunati $c_{E,imob}$, kao i $m_{E,imob}$. U tabeli 3.5 su prikazane vrednosti mase i koncentracije enzima na ulazu, izlazu, kao i koncentracije. Osim toga data je i zapremina SORP, kao i vreme trajanja eksperimenta (t) i srednje vreme zadržavanja (τ).

Tabela 3.5. Materijalni bilansi enzima u eksperimentima u SORP.

Exp	$m_{E,ulaz}$, g	m_{izlaz} , g	m_{r,t_f} , g	$c_{E,sol}$, g/l	$m_{E,sol}$, g	$c_{E,imob}$, g/l	$m_{E,imob}$, g	V, l	τ , min	t, min
enzim	2.45	1.426	1.024	1.64	0.492	1.891	0.548	0.29	14.83	58
1.	2.448	0.924	1.524	0.94	0.291	3.976	1.232	0.31	14.83	62
2.	1.749	0.624	1.125	0.74	0.222	3.14	0.91	0.29	5.72	23
3.	2.418	0.812	1.606	0.78	0.242	4.40	1.364	0.31	75.19	300
4.	2.772	2.092	0.68	1.92	0.576	0.424	0.123	0.29	12.62	60
5.	1.582	1.018	0.564	1.32	0.396	0.625	0.181	0.29	16.58	60
6.	0.3164	0.2045	0.1119	0.24	0.072	0.146	0.0423	0.29	16.58	65

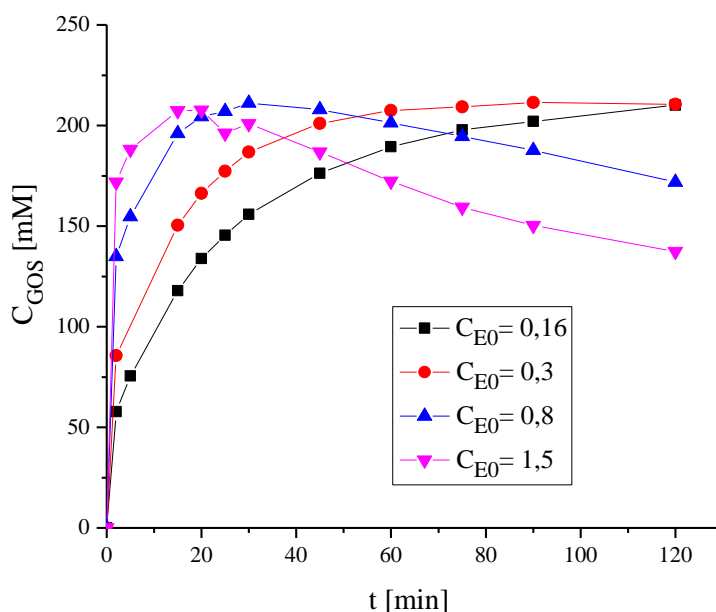
Kada se posmatra samo eksperiment sa enzimom i slika 3.22, može da se izračuna masa enzima na osnovu integrala, m_{izlaz} (prvih 60 min) i ona je iznosila 1,426 g, a $m_{ispiranje}$ je 0,586 g. To znači da je ukupna masa koja je izašla iz reaktora bila 2,012 g. U reaktor je uneto 2,45 g enzima, što znači da je masa „imobilisanog“ enzima 0,438 g. I po ovom proračunu je pokazano da se određena masa enzima zadržava u reaktoru. Masa imobilisanog enzima $m_{E,imob}$ iz tabele je 0,548 g. Tabela 3.5 pokazuje da je procenjena masa imobilisanog enzima značajna za eksperiment 2, a naročito velika za eksperimente sa reciklom – 1. i 3, kao i onaj kontrolni sa enzimom, koji je takođe imao recirkulaciju. To dodatno ukazuje da recirkulacija nije povoljna, jer sem što daje manju produktivnost, složenija je za kontrolu uslova u reaktoru.

Analiza materijalnog bilansa enzima, kao i koncentracioni profili prikazani iznad, nam potvrđuju razliku unete i izlazne mase enzima, odnosno da se određena, a ne mala, količina enzima zadržava u reaktoru. Pitanje je da li je imobilisan enzim aktivan, za šta nema direktne potvrde merenjem. Iz tog razloga će rezultati u SORP biti upoređeni sa onim u šaržnom reaktoru, koji su izvedeni u staklenom sudu, gde nema imobilizacije. U slučaju da SORP pokazuje bolje rezultate (veće prinose GOS) za iste nominalne koncentracije enzima (ulazna koncentracija enzima u SORP i šaržni), to može da ukazuje da je enzim imobilisan na zidove SORP takođe aktivan. Ovo će biti ispitano i upoređeno u poglavlju 3.6.

3.5. Ispitivanje aktivnosti enzima u šaržnom reaktoru

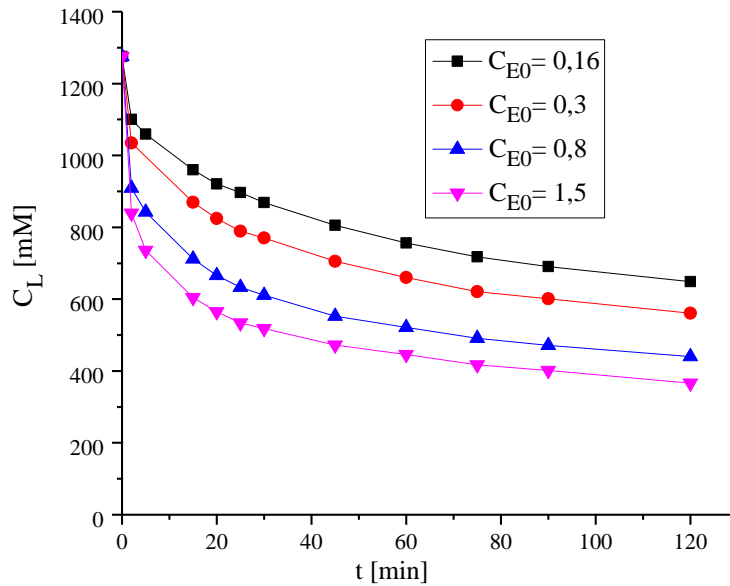
Uporedno sa eksperimentima u SORP, urađeno je i sedam eksperimenata u šaržnom reaktoru sa ulaznom koncentracijom laktoze od $C_{L,0}=40\%$ i različitim koncentracijama enzima. Korišćena su dva enzima – E1 i E2, koji se razlikuju po aktivnosti enzima, kako je ranije navedeno. Tri eksperimenta su urađena sa enzimom E1, koncentracije su bile 0,8 mg/ml, 1 mg/ml i 1,5 mg/ml, a četiri eksperimenta sa enzimom E2 koji ima 4,91 puta veću aktivnost (koncentracije su bile 0,16 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,8 mg/ml i 1,5 mg/ml).

Na slici 3.26 su grafički predstavljene promene koncentracije GOS-a sa vremenom u šaržnom reaktoru za početnu koncentraciju laktoze 40% i različite koncentracije E2. Najviše GOS-a na početku reakcije nastaje sa najvećom početnom koncentracijom enzima od 1,5 mg/ml, dok se vremenom koncentracija GOS-a smanjuje i posle 2 sata dostiže vrednost od 137 mM (roze kriva). Ako se posmatra promena koncentracije GOS-a za $C_{E0}=0,8$ mg/ml (plava kriva), može se primetiti da koncentracija GOS-a raste, dostiže maksimalnu vrednost od 211 mM i zatim polako opada do 171 mM posle 2 sata reakcije. Za manje početne koncentracije enzima od 0,16 mg/ml (crna kriva) i 0,3 mg/ml (crvena kriva) koncentracija GOS-a sporije raste i na kraju dostiže približno istu vrednost od 210 mM.



Slika 3.26. Promena koncentracije GOS u šaržnom reaktoru za različite početne koncentracije enzima E2

Na slici 3.27 su grafički predstavljene promene koncentracije laktoze sa vremenom u šaržnom reaktoru za početnu koncentraciju laktoze 40 % i različite početne koncentracije enzima E2. Najviše laktoze je potrošeno u eksperimentu sa najvećom početnom koncentracijom enzima od 1,5 mg/ml (konverzija 71,2 %), dok je u eksperimentu sa $C_{E0}=0,8$ mg/ml konverzija malo manja (65,5 % tabela 3.6). Ovi rezultati pokazuju iste kvalitativne trendove, kao oni predstavljeni u Poglavlju 2, gde je ispitivana kinetika. S tim da postoji kvantitativna razlika – jer su sa enzimom veće aktivnosti (E2) dobijene veće konverzije laktoze i prinosi GOS. U tabeli 3.6 su pored konverzije laktoze date i selektivnost i prinos GOS.



Slika 3.27. Promena koncentracije laktoze u šaržnom reaktoru za različite početne koncentracije enzima E2

Tabela 3.6. Konverzija, selektivnost i prinos u šaržnim eksperimentima.

Exp	C _{E0} , mg/ml	C _{GOS, stac} , mM	X _L , %	S, %	Y, %	Enzim
1.	0,8	193	41,9	36,1	15,1	E1
2.	1	199	44,2	21,9	15,1	E1
3.	1,5	210	51,1	32,2	16,5	E1
4.	0,16	210	49,1	33,5	16,5	E2
5.	0,3	210	56	29,5	16,5	E2
6.	0,8	172	65,5	20,6	13,5	E2
7.	1,5	137	71,2	15,1	10,8	E2

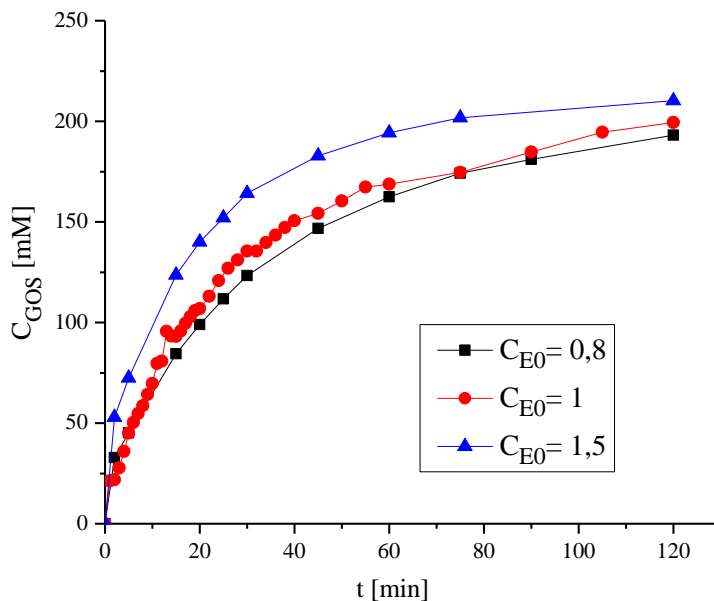
Jednačine 3.5 – 3.7 pokazuju kako su računati stepen konverzije, selektivnost i prinos u tabeli 3.6.

$$\text{Stepen konverzije: } X_L = \frac{\text{količina utrošenog reaktanta}}{\text{količina unetog reaktanta}} \cdot 100 \quad (3.5)$$

$$\text{Selektivnost: } S = \frac{\text{količina nastalog proizvoda}}{\text{količina utrošenog reaktanta}} \cdot 100 \quad (3.6)$$

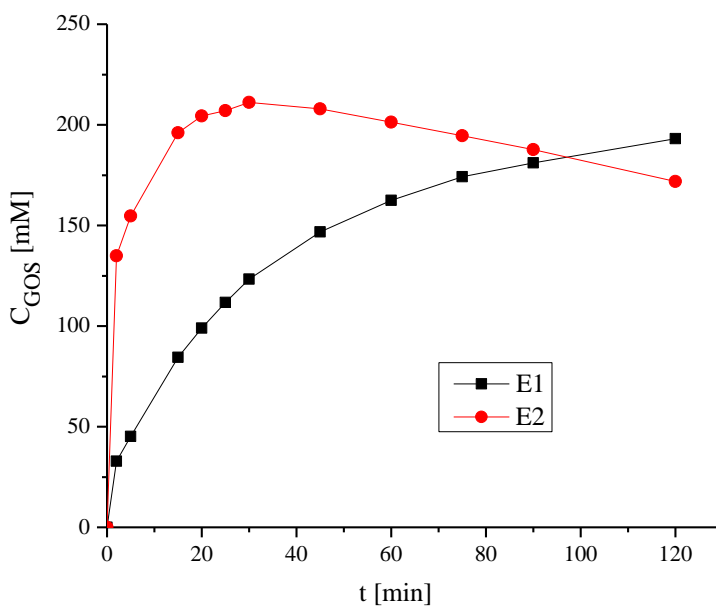
$$\text{Prinos: } Y = \frac{\text{količina nastalog proizvoda}}{\text{količina unetog reaktanta}} \cdot 100 \quad (3.7)$$

Na slici 3.28 su grafički predstavljene promene koncentracije GOS-a sa vremenom u šaržnom reaktoru za početnu koncentraciju laktoze 40 % i različite koncentracije enzima E1. Najviše GOS-a se dobija za najveću početnu koncentraciju enzima, dok je trend promene koncentracije GOS-a sa vremenom sličan.



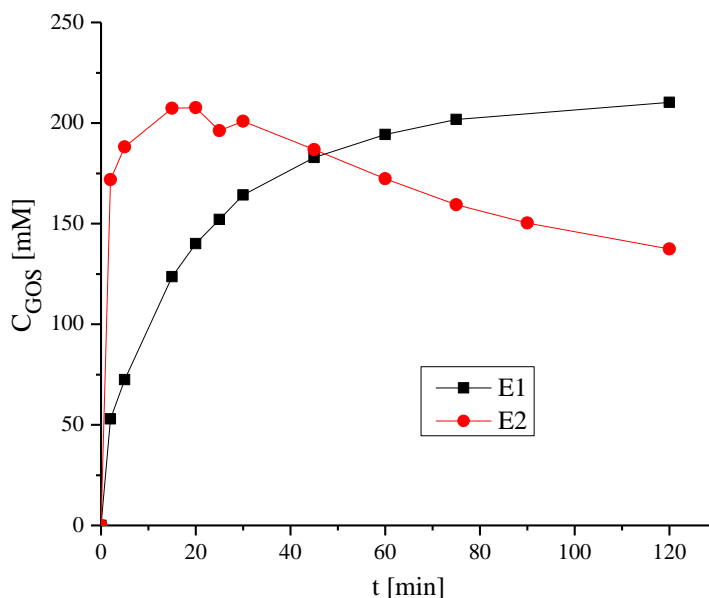
Slika 3.28. Promena koncentracije GOS u šaržnom reaktoru za različite početne koncentracije enzima E1

Na slici 3.29 je prikazana zavisnost koncentracije GOS-a sa vremenom za početnu koncentraciju enzima od 0,8 mg/ml kada se koristi enzim E1 i E2. Jasno se uočava da GOS-a nastaje mnogo brže kada koristimo aktivniji enzim, što je naročito izraženo u prvih 30-40 min reakcije. Za E2 koncentracija GOS prolazi kroz maksimum, tj. opada posle oko 30 min (crvena linija), dok za enzim E1 koncentracija GOS-a raste sporije sve vreme trajanja reakcije (crna linija) i posle 120 min dobijaju se slične koncentracije proizvoda.



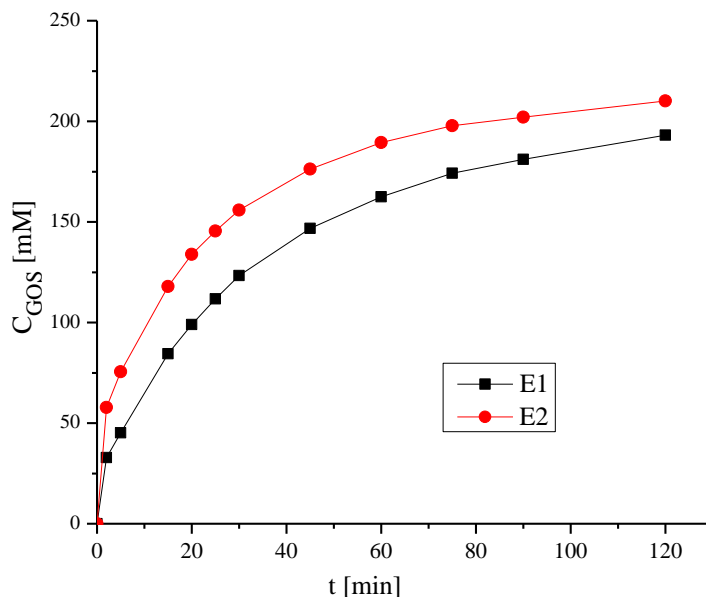
Slika 3.29. Promena koncentracije GOS u šaržnom reaktoru za koncentraciju enzima E1 i E2 od 0,8 mg/ml

Na slici 3.30 je grafički predstavljeno poređenje koncentracije GOS-a sa vremenom u šaržnom reaktoru za početnu koncentraciju laktoze 40 % i početnu koncentraciju enzima E1 i E2 od 1,5 mg/ml. Trend je sličan kao na prethodnoj slici 3.29 kada je korišćena manja koncentracija enzima od 0,8 mg/ml. Očekivano, razlika je u prvom delu trajanja reakcije, jer je reakcija brža sa većom koncentracijom enzima, a što je opisano u kinetičkim ispitivanjima. Apsolutne vrednosti maksimalnih koncentracija dobijenog GOS-a su slične (oko 200 mM), bez obzira na koncentracije enzima i njegovu aktivnosti (E1 i E2).



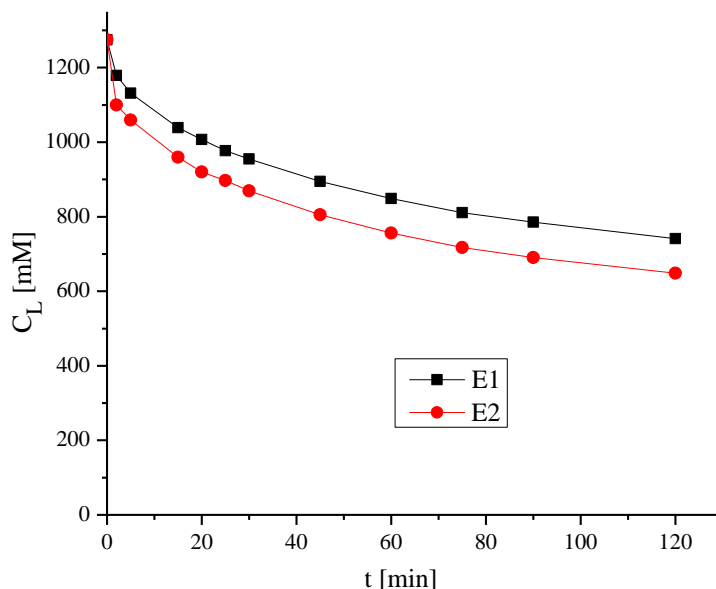
Slika 3.30. Promena koncentracije GOS u šaržnom reaktoru za koncentraciju enzima E1 i E2 od 1,5 mg/ml

Enzim E2 ima približno 5 puta veću aktivnost nego E1, pa je tako izvršeno poređenje koncentracije GOS-a za početne koncentracije enzima E1 od 0,8 mg/ml i enzima E2 od 0,16 mg/ml. Očekivano je da ova dva šaržna eksperimenta daju slične rezultate. Grafičko poređenje je prikazano na slici 3.31. Može se primetiti da je trend promene koncentracije GOS-a sa vremenom isti, s tim što sve vreme veća koncentracija GOS-a nastaje kada se koristi aktivniji enzim (crvena linija), mada su razlike male (posle 120 min nastaje 210 mM GOS sa enzimom E2 i 193 mM GOS sa enzimom E1).



Slika 3.31. Promena koncentracije GOS u šaržnom reaktoru za koncentracija enzima E1 od 0,8 mg/ml i enzima E2 od 0,16 mg/ml

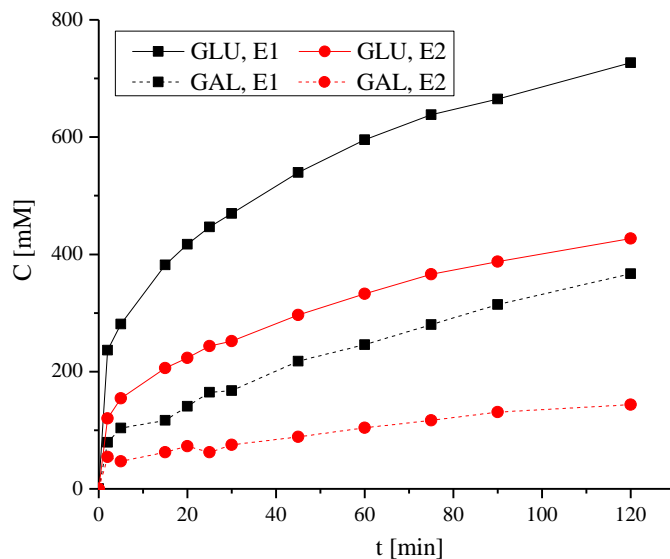
Sličan rezultat se dobija i kada se posmatra promena koncentracije laktoze sa vremenom, što je predstavljeno na slici 3.32. Veća koncentracija laktoze je utrošena kada je korišćen enzim E2, mada je razlika mala (posle 120 min, ostalo je 649 mM laktoze sa enzimom E2 i 741 mM sa enzimom E1).



Slika 3.32. Promena koncentracije laktoze u šaržnom reaktoru za koncentraciju enzima E1 od 0,8 mg/ml i enzima E2 od 0,16 mg/ml

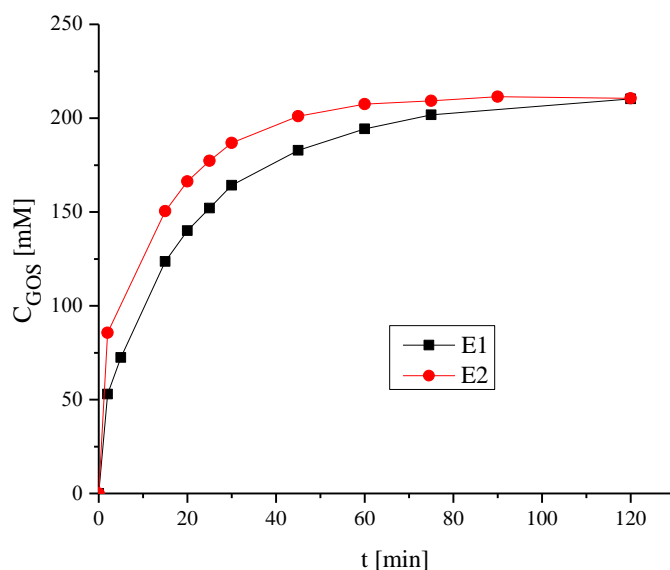
Ako se posmatra promena koncentracije glukoze i galaktoze sa vremenom za koncentraciju enzima E1 od 0,8 mg/ml i enzima E2 od 0,16 mg/ml, što je prikazano na slici 3.33, može se primetiti da nastaje više i glukoze i galaktoze sa enzimom E1. Međutim, kada se izračuna selektivnost proizvoda na osnovu jednačine 3.6, dobijaju se vrlo slične vrednosti ($S_{GLU} = 68,2\%$ za enzim E2, a

$S_{GLU} = 64,6\%$ za enzim E1, dok je $S_{GAL} = 22,9\%$ za enzim E2, a $S_{GLU} = 20,5\%$ za enzim E1), što ukazuje na to da je mala razlika u selektivnosti između enzima E1 i E2.

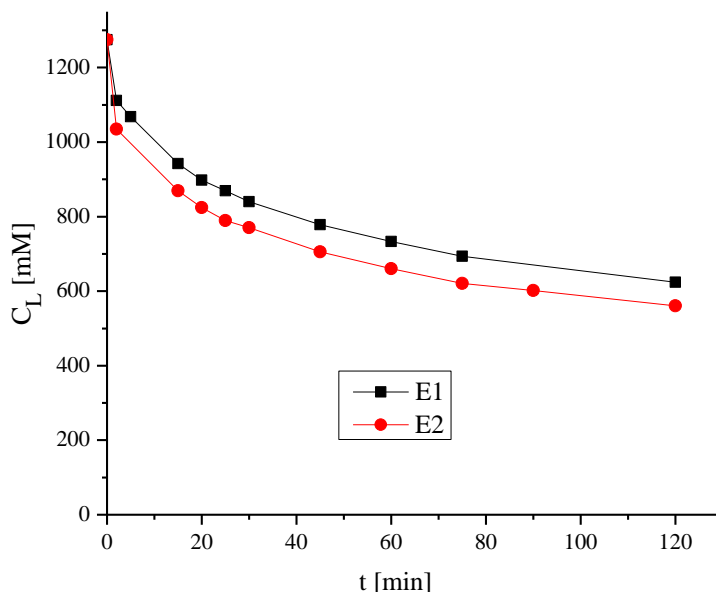


Slika 3.33. Promena koncentracije glukoza i galaktoze u šaržnom reaktoru za koncentraciju enzima E1 od 0,8 mg/ml i enzima E2 od 0,16 mg/ml

Na slici 3.34 je grafički predstavljeno poređenje promene koncentracije GOS-a sa vremenom u šaržnom reaktoru za početnu koncentraciju laktoze 40 % i početnu koncentraciju enzima E1 od 1,5 mg/ml i enzima E2 od 0,3 mg/ml. Na kraju eksperimenta se dobijaju iste koncentracije GOS-a (210 mM), ali je, kao i u prethodnom poređenju, malo veća koncentracija GOS-a tokom eksperimenta primetna sa aktivnijim enzimom E2. Na slici 3.35 je grafički predstavljeno poređenje promene koncentracije laktoze sa vremenom u šaržnom reaktoru za početnu koncentraciju laktoze 40 % i početnu koncentraciju enzima E1 od 1,5 mg/ml i enzima E2 od 0,3 mg/ml, gde se uočava isti trend kao za prethodno poređenje dato na slici 3.32.



Slika 3.34. Promena koncentracije GOS u šaržnom reaktoru za koncentraciju enzima E1 od 1,5 mg/ml i enzima E2 od 0,3 mg/ml



Slika 3.35. Promena koncentracije laktoze u šaržnom reaktoru za koncentraciju enzima E1 od 1,5 mg/ml i enzima E2 od 0,3 mg/ml

U tabeli 3.7 su prikazane koncentracije svih komponenti u šaržnim reaktorima posle 15 min za koncentraciju enzima E1 i enzima E2 od 1,5 mg/ml. Koncentracija laktoze na kraju eksperimenta je 36 % manja u slučaju enzima E2, ali je i nastalo mnogo više glukoze i galaktoze, dok je koncentracija GOS-a veća za 68 % posle 15 min. Konverzija laktoze je čak 71 % kada se koristi enzim E2, dok je za enzim E1 konverzija 51 %.

Tabela 3.7. Koncentracije komponenti posle 15 min za koncentraciju enzima E1 i enzima E2 od 1,5 mg/ml.

Komponenta	Koncentracija enzima E1, mM	Koncentracija enzima E2, mM	Relativna razlika, %
Laktoza	942,3	604,5	-35,8
Glukoza	218,6	484	121
Galaktoza	65,6	177,3	170
GOS	123,7	207,4	67,7

U tabeli 3.8 su prikazane koncentracije svih komponenti u šaržnim reaktorima posle 15 min za koncentraciju enzima E1 i enzima E2 od 0,8 mg/ml. Laktoza je potrošena za 31,5 % više kada koristimo enzim E2, ali je i nastalo mnogo više glukoze i galaktoze, dok je koncentracija GOS-a veća za čak 132 % posle 15 min. Konverzija laktoze je 65,5 % kada se koristi enzim E2, dok je za enzim E1 konverzija 42 %.

Tabela 3.8. Koncentracije komponenti posle 15 min za koncentraciju enzima E1 i enzima E2 od 0,8 mg/ml.

Komponenta	Koncentracija enzima E1, mM	Koncentracija enzima E2, mM	Relativna razlika, %
Laktoza	1038,7	711,9	-31,5
Glukoza	163,7	382,1	133
Galaktoza	51,7	116,6	125
GOS	84,4	196	132

Iz novih rezultata u šaržnom sistemu, može se zaključiti da je enzim E2 približno 5 puta aktivniji od E1, a još više od enzima E0 korišćenog u kinetičkim ispitivnjama. Ovo ukazuje da je aktivnost enzima ključan faktor za kontinualnu proizvodnju, jer je moguće koristiti mala vremena zadržavanja, što omogućava kraće reaktore i/ili veće protoke, te veću produktivnost GOS. Osim toga, može se zaključiti da ranije predloženi kinetički modeli kvalitativno mogu opisati sintezu GOS (isti mehanizam i kinetički izrazi), ali da je neophodno izvršiti korekciju vrednosti konstanti za različite aktivnosti enzima. To je značajno kako bi model mogao da bude korišćen za simulacije i optimizaciju procesnih uslova, tj. određivanje optimalnog vremena zadržavanja i ulazne koncentracije enzima, koji daju maksimalnu proizvodnost GOS u datom reaktoru, za optimalnu potrošnju enzima.

3.6. Poređenje rezultata u kontinualnom i šaržnom reaktoru

U cilju upoređivanja eksperimenata u SORP sa odgovarajućim eksperimentima u šaržnom reaktoru, izračunati su stepen konverzije (X_L), selektivnost GOS po utrošenoj laktozi (S), prinos GOS po količini unete laktoze (Y) i produktivnost proizvoda i prikazani su u tabeli 3.9. Formule po kojima su izračunate X_L , S i Y su iste kao i za šaržni sistem (jendačine 3.5-3.7), dok se produktivnost GOS u SORP računa kao:

$$\text{Produktivnost: } P = C_{GOS_{SS}} * Q_{in} \quad (3.8)$$

U svim jednačinama su korišćene vrednosti određene u stacionarnom stanju.

Tabela 3.9. Konverzija, selektivnost, prinos i produktivnost u eksperimentima izvedenim u SORP.

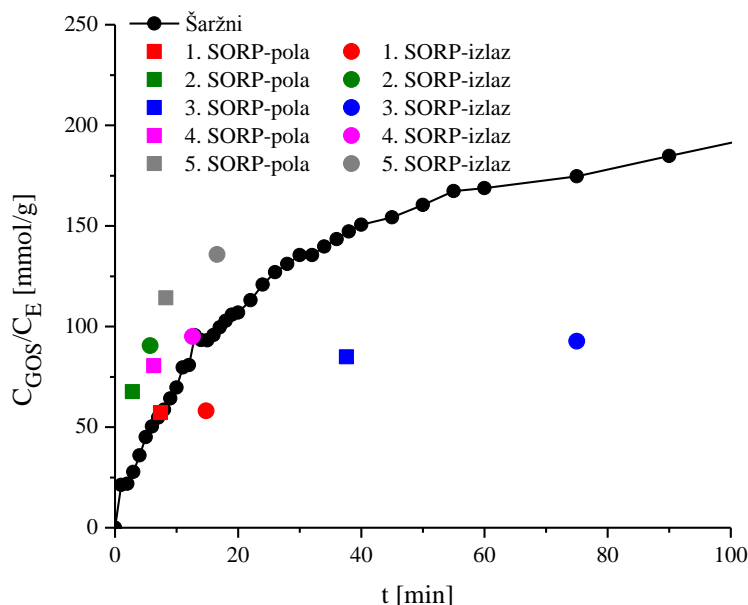
Exp	C_{E0} , mg/ml	$C_{GOS, \text{stac}}$, mM	X_L , %	S, %	Y, %	P, mmol/min	τ , min
1.	2	116	25,5	37	9,4	2,36	14,83
2.	1,1	99	21	35,5	7,4	5,27	5,72
3.	2	185	42	32	13,4	0,74	75,19
4.	2	190	39	37	14,5	4,39	12,62
5.	1,5	204	52,5	29	15,5	3,58	16,58
6.	0,3	140	29	37	11	2,46	16,58

Iz dobijenih vrednosti zaključuje se da su najbolji kvalitativni rezultati postignuti u petom eksperimentu. U petom eksperimentu je postignut najveći stepen konverzije i prinos, dok je selektivnost (količina nastalog GOS u odnosu na količinu utrošene laktoze) najmanja. Osnovni razlog je taj što je korišćen aktivniji enzim E2 i to u većoj koncentraciji (u odnosu na eksperiment 6). Sa druge strane, ako se analizira produktivnost GOS, najbolji rezultat daje eksperiment 2, a zbog najvećeg ulaznog protoka, što je dole dodatno analizirano. Treba naglasiti da je ovaj rezultat postignut sa manje aktivnim enzimom E1.

Ako poredimo prvi i treći eksperiment (koji su imali recikl), može se videti da je veći prinos ostvaren u trećem, koji je imao i znatno veće vreme zadržavanja. U prvom eksperimentu, koji je sa umerenim reciklom ($FR = 65,1 \%$) i vremenom zadržavanja 14,83 min, ostvarena je konverzija laktoze od 25,5 % pri stacionarnoj koncentraciji GOS-a 116 mM. Slično prvom, treći eksperiment je rađen sa istom ulaznom koncentracijom laktoze (1235 mmol/l) i enzima (2 mg/ml) i protokom u reaktoru, ali većom vrednosti recikla ($FR = 93,1 \%$). Ovi uslovi su rezultovali u znatno većoj konverziji laktoze $X_L = 42 \%$ i koncentraciji GOS od 185 mM, u odnosu na eksperiment 1. Razlog za to upravo leži u najvećem vremenu zadržavanja koje se ostvaruje kao rezultat povećanja recikla na račun smanjenja ulaznog toka. Međutim, na ovaj način ulazni protok u reaktor postaje 5 puta manji u odnosu prvi eksperiment, što rezultuje u smanjenoj proizvodnosti GOS (tabela 3.9). U eksperimentu 3 je proizvodnost oko 3 puta manja od eksperimenta 1 što sugeriše da se sa povećanjem FR, pri istom ukupnom protoku u reaktoru, povećava konverzija (X_L) i koncentracija GOS-a ($C_{GOS, \text{stac}}$), ali smanjuje proizvodnost. Ovaj rezultat potvrđuje da recikl nije neophodan, u slučaju da je dužina reaktora 4 m.

Eksperiment 2 se izdvaja kao poseban, s obzirom da je izveden sa manjom vrednošću koncentracije enzima E1 ($C_{E0} = 1,1 \text{ mg/ml}$) u odnosu na ostale eksperimente i odsustvom recikla. Ulazni protok je ujedno i ukupni protok u reaktoru koji u ovom slučaju ima i sličnu vrednost kao ukupan protok u eksperimentima 1 i 3. Slični ukupni protoci podrazumevaju i slično mešanje unutar reaktor, stoga je opravdano porediti performanse izvedenih eksperimenata. Odsustvo recikla uzrokuje znatno manje vreme zadržavanja u eksperimentu 2 (5,72 min) u odnosu na druge eksperimente. Stoga, to rezultuje u manjim vrednostima X_L i $C_{GOS, \text{stac}}$ od 21 % i 99 mM, respektivno. Međutim, može se primetiti da je proizvodnost u ovom slučaju 5,27 mmol/min, što je veće u odnosu na sve ostale izvedene eksperimente.

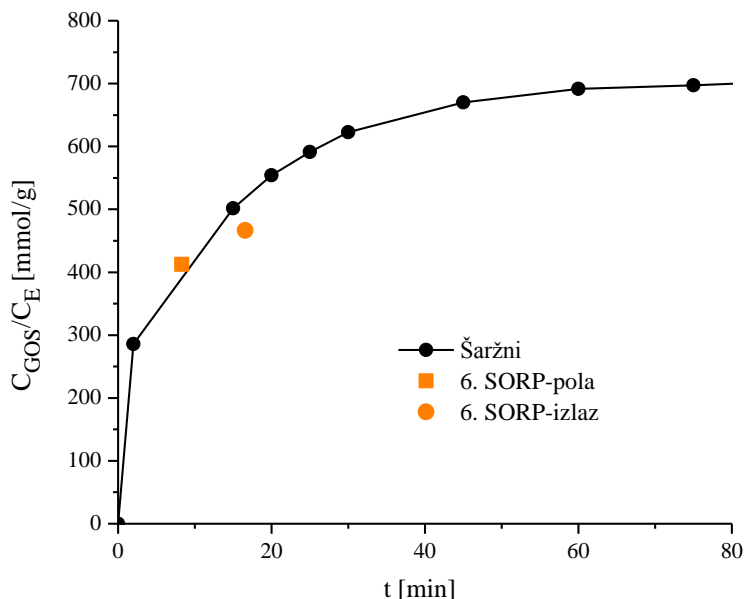
U cilju sagledavanja efikasnosti spiralnog reaktora sa pregradama rezultati eksperimenata biće upoređeni sa rezultatima izvedenim u odgovarajućem šaržnom sistemu. Prvih 5 eksperimenata izvedenih u SORP su upoređeni sa šaržnim eksperimentom u kome je početna koncentracija enzima iznosila 1 mg/ml i to je prikazano na slici 3.36. Važno je naglasiti da je na ordinati prikazana koncentracija GOS po ulaznoj koncentraciji enzima, što predstavlja prinos GOS po enzimu. Takođe, prikazani su rezultati na pola reaktora i na izlazu iz SORP. Eksperimenti 2, 4 i 5 daju bolje prinose od šaržnog za isto vreme odigravanja reakcije, dok eksperimenti 1 i 3 (sa reciklom), daju nešto lošije rezultate (Pravilović i sar. 2023.). Razlog za lošije rezultate sistema sa reciklom je taj što se cevni reaktor sa velikim reciklom približava ponašanju reaktora sa idealnim mešanjem (ulazna koncentracija reaktanta biva razblažena izlaznom). Ovaj rezultat potvrđuje gore navedena zapažanja o manjoj efikasnosti sistema sa reciklom, tj. neopravdanosti njegovog uvođenja, kada je dovoljno velika dužina reaktora, kao što je u ovom slučaju.



Slika 3.36. Prikaz stacionarnih koncentracija u SORP na pola (kvadratići) i na izlazu (kružići) iz reaktora za eksperimente 1-5 i promene koncentracije GOS-a u šaržnom reaktoru sa vremenom

Sa slike 3.36 može se uočiti da je prinos GOS po enzimu veći i za preko 50 % u SORP u odnosu na šaržni, u istom reakcionom vremenu, za eksperimente 2, 4 i 5. S obzirom da je u svim eksperimentima korišćena ista (ili vrlo slična) temperatura, a da je dobro mešanje u šaržnom ostvareno pomoću magnetne mešalice, pitanje je zašto je prinos GOS u SORP veći u odnosu na šaržni, ako je strujanje u SORP blisko klipnom, ali sa određenim odstupanjem od idealnosti. (Podsetnik: idealni šaržni reaktor pokazuje iste karakteristike kao idealni cevni, za isto reakciono vreme i druge uslove.) U eksperimentu 5 je korišćen aktivniji enzim E2, pa je to verovatno osnovni razlog za bolji rezultat u odnosu na ostale eksperimente u kojima je korišćen enzim E1 (u eksperimentu 4 kombinovano E1 i E2). Međutim, dodatni razlog može da bude i veća koncentracija enzima u reaktoru od nominalne, odnosno one na ulazu. Ovo je ustanovljeno i prikazano ranije u delu 3.4, gde su određene koncentracije enzima na izlazu i imobilisanog, čiji je zbir veći od ulazne koncentracije enzima. Ovo je izraženije za eksperiment 2 (u odnosu na 4 i 5, videti tabelu 3.5) koji na slici daje vrlo dobre prinose GOS, a za manje aktivan enzim E1. Na osnovu ovog poređenja može se indirektno potvrditi da je imobilisani enzim aktivan. S tim da na osnovu ograničenog broja eksperimenata i rezultata nije moguće odrediti kolika je aktivnost imobilisanog enzima, a ni precizno koja je količina adsorbovana i na koje vreme, pre nego što se desorbuje.

Pored ovih pet eksperimenata, upoređen je i eksperiment 6 sa koncentracijom E2 od 0,3 mg/ml, u odnosu sa šaržni sistem gde je koncentracija E2 takođe iznosila 0,3 mg/ml. Na slici 3.37 su prikazane stacionarne koncentracije GOS-a po koncentraciji enzima (prinos) u eksperimentu 6 na polovini i na izlazu iz reaktora i odgovarajuće koncentracije u šaržnom reaktoru tokom vremena. Za ovaj eksperiment se može videti da pokazuje slične karakteristike u SORP i u odgovarajućem šaržnom sistemu. Ako se pogledaju vrednosti u tabeli 3.5, može se videti da je u eksperimentu 6 količina imobilisanog enzima mala, pa je sličan rezultat za SORP i enzim logična, te dodatno potvrđuje gore navedene zaključke.

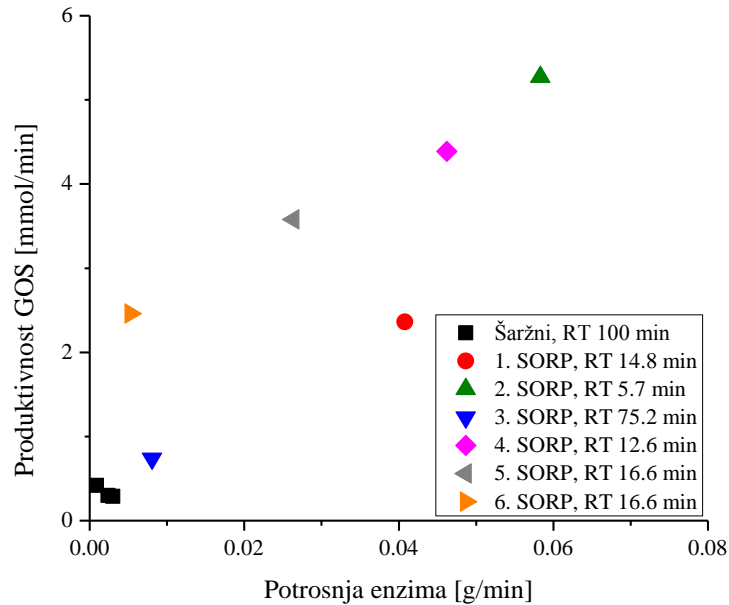


Slika 3.37. Prikaz stacionarnih koncentracija u SORP na pola (kvadratići) i na izlazu (kružići) iz reaktora za eksperiment 6 i promene koncentracije GOS-a u šaržnom reaktoru sa vremenom

Značajno je uporediti i produktivnosti GOS u SORP u odnosu na šaržni sistem, a naročito u odnosu na potrošnju enzima. Za izračunavanje produktivnosti u šaržnom sistemu je usvojeno reakciono vreme od 100 minuta, jer se najčešće oko tog vremena postiže maksimalna koncentracija GOS. Treba naglasiti da to vreme ne uzima u obzir pražnjenje i čišćenje reaktora za novu šaržu, koje u industriji uobičajno traje barem 1 sat. Stoga je realna produktivnost šaržnog sistema još manja od analizirane. Kako bi reproduktivost bila uporediva, korišćene su iste zapremine za SORP i šaržni reaktor.

Na slici 3.38 je prikazana produktivnost GOS-a u mmol/min u zavisnosti od potrošnje enzima u g/min za eksperimente izvedene u SORP i u šaržnom sistemu (crni kvadratići). Sa slike se može zaključiti da je produktivnost u SORP značajno veća u odnosu na onu u šaržnom sistemu i da je povećanje između 50 % pa čak i do 10 puta. Ovo se prvenstveno postiže kontinualnim radom, tj. proticanjem i upotrebom mnogostuko manjih vremena zadržavanja. Eksperimenti sa reciklom (eksperimenti 1 i 3) takođe daju veću produktivnost od šaržnog sistema, ali je ona manja u odnosu na eksperimente bez recikla. Eksperiment 3, koji ima recikl od 93 % i čije ponašanje je najbliže ponašanju PRIM-a (idealno mešanje) ima najslabiju produktivnost sa šaržnim reaktorom. U eksperimentu 1 je odnos recikla 65 % i on daje veću produktivnost od eksperimenta 3, ali manju nego ostali eksperimenti bez recikla (Pravić i sar. 2023.).

Sa slike 3.38 se može videti da produktivnost GOS-a u SORP značajno i linearno raste sa povećanjem potrošnje enzima. Za eksperimente bez recikla produktivnost je duplo veća između najmanje i najveće potrošnje enzima. Ovo je u skladu sa ranijom analizom, gde je pokazano da brzina reakcije raste sa koncentracijom enzima. Takođe je potvrđeno da i protok (ulazni, tj. izlazni) ima uticaja, jer veći protok obezbeđuje veću produktivnost, ali i veću potrošnju enzima. Sa druge strane može se videti da se u šaržnom sistemu troši značajno manja količina enzima. Stoga, ako je potrošnja enzima značajan faktor, odnosno trošak, potrebno je naći optimum između produktivnosti GOS i količine utrošenog enzima. U narednom poglavlju će se izvesti numerička optimizacija, sa ovim ciljevima, a za šta je neophodno prvo postaviti relevantan matematički model kontinualnog spiralnog reaktora sa pregradama i oscilatornim tokom.



Slika 3.38. Zavisnost produktivnosti GOS-a od potrošnje enzima za eksperimente izvedene u SORP i u šaržnom sistemu

Eksperimentalni rezultati u novom tipu reaktora (SORP) pokazuju da je kontinualna proizvodnja moguća i to kao dobra alternativa šaržnom procesu proizvodnje GOS. Rezultati ukazuju na to da je moguće značajno povećati produktivnost u kontinualnom sistemu u odnosu na šaržni. Pri tom je pokazano kako se novi tip intenzifikovanog reaktora može uspešno i brzo konstruisati i realizovati pomoću 3D štampe. SORP omogućava dobro mešanje fluida, što će dodatno biti analizirano, potvrđeno i modelovano u narednom poglavlju teze.

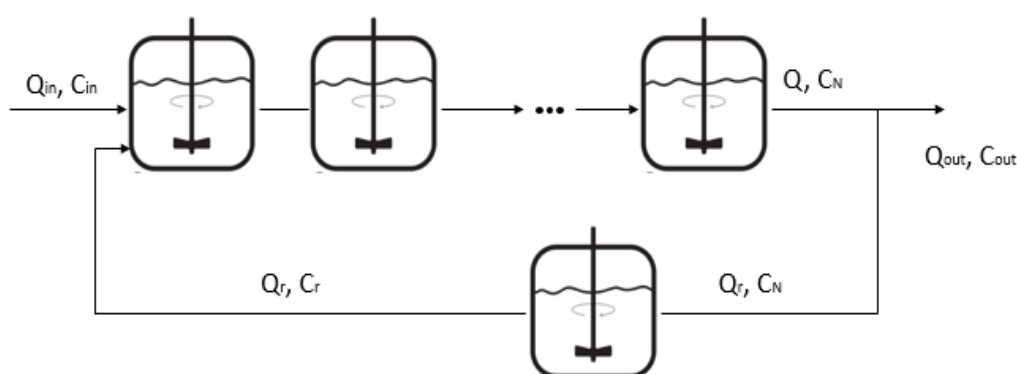
4. MODELOVANJE I OPTIMIZACIJA SINTEZE PREBIOTIKA U KONTINUALNIM REAKTORIMA

4.1. Matematički model spiralnog reaktora sa pregradama - kaskada idealno izmešanih sudova

Analiza načina strujanja fluida u reaktoru je neophodna da bi se mogle predvideti performanse reaktora. Postoje dva granična matematička modela idealnog strujanja: model idealnog klipnog strujanja i model strujanja sa idealnim mešanjem. Idealno klipno strujanje (eng. *plug flow*) podrazumeva tok fluida bez radijalnog gradijenta brzine, kao i bez aksijalne i radijalne disperzije. U ovom slučaju ne postoji aksijalno mešanje u reaktoru, tako da je vreme zadržavanja isto za sve elemente fluida. Sa druge strane, idealno mešanje (eng. *mixed flow*) u reaktoru utiče na to da reaktorska smeša bude potpuno uniformna. Sastav i temperatura izlazne struje su jednaki stanju u reaktoru (Živković 2010). Ova dva modela predstavljaju idealizovanu sliku i nije ih moguće dostići u realnosti, već se teži projektovanju reaktora u kome je strujanje što bliže nekom od idealnih modela. Odstupanje strujanja u realnom reaktoru od idealnog strujanja se opisuje različitim modelima neidealnih strujanja, koji treba dovoljno detaljno da opisuju posmatrani reaktor ali i da bude što jednostavniji (Levenspiel 1999).

Jedan od najčešćih modela opisivanja neidealnog strujanja je kaskadni model. Ovo je jednoparametarski model u kome se reaktor posmatra kao niz protočnih sudova sa idealnim mešanjem (PRIM). Parametar ovog modela je broj sudova N i njegova vrednost određuje koliko je strujanje u posmatranom reaktoru blisko idealnom mešanju ($N=1$) ili idealnom klipnom strujanju ($N \rightarrow \infty$) (Levenspiel 1999).

Za strujanje u reaktoru sa oscilatornim tokom i reciklom se može koristiti nešto složeniji model kaskade sa povratnim tokom fluida u vidu recikla, kao što je prikazano na slici 4.1 (Levenspiel 1999).



Slika 4.1. Prikaz modela kaskade sa povratnim tokom (modifikovano iz Levenspiel 1999)

U reaktoru sa pregradama i oscilatornim tokom se javlja intenzivno radijalno mešanje pre i posle pregrada, kako je to objašnjeno u Poglavlju 1. Shodno tome, može se pretpostaviti da je prostor između pregrada jedan idealno izmešani sud. Shodno tome bi se očekivalo da broj sudova kaskade

bude jednak fizičkom broju elemenata ili ćelija reaktora sa pregradama i oscilatornim tokom. Međutim, istraživanja (Stonestreet i sar. 1999, McGlone i sar. 2015.) su pokazala da broj sudova u kaskadi po modelu nije jednak broju fizičkih ćelija. Broj N je statistički (apstraktni) parametar slike strujanja, odnosno odstupanja od idealnosti i češće je manji od realnog broja ćelija, a u nekim slučajevima je i veći (iako to može delovati kontraintuitivno). Stoga, neophodno je odrediti broj N za spiralni oscilatorni reaktor sa pregradama, za uslove protoka i oscilacija koje su primenjene u ovom istraživanju, što je predstavljeno u delu 3.3 ove teze.

4.1.1. Jednačine materijalnog bilansa za svaki protočni reaktor sa idealnim mešanjem

Model opisanog sistema podrazumeva niz jednačina materijalnog bilansa za svaku posmatranu komponentu ($j = L, GLU, GAL, E, EGAL, GOS_3, GOS_4$) u svakom reaktoru sa idealnim mešanjem u kaskadi. Materijalni bilans za prvi reaktor ($i=1$) se razlikuje u odnosu na ostale reaktore u kaskadi pošto se u njemu odvija mešanje ulazne struje i struje recikla i može se prikazati sledećom jednačinom:

$$V_n \frac{dC_{j,1}}{dt} = Q_{in} C_{j,in} + Q_r C_{j,r} - Q C_{j,1} + V_n r_{j,1} \quad (4.1)$$

gde su: V_n zapremina jednog protočnog reaktora u kaskadi, $C_{j,1}$ koncentracija j -te komponente u prvom reaktoru u kaskadi, Q_{in} ulazni protok u sistem, Q ukupan protok kroz kaskadu i $r_{j,1}$ brzina nastajanja/nestajanja j -te komponente u prvom sudu u kaskadi.

Jednačine materijalnog bilansa za sve ostale reaktore ($i=2, 3, \dots, N$) u kaskadi su prikazane sledećom jednačinom:

$$V_n \frac{dC_{j,i}}{dt} = Q C_{j,i-1} - Q C_{j,i} + V_n r_{j,i} \quad (4.2)$$

gde su: $C_{j,i}$ koncentracija j -te komponente u i -tom reaktoru u kaskadi i $r_{j,i}$ brzina nastajanja/nestajanja j -te komponente u i -tom sudu u kaskadi.

Sam recirulacioni tok (crevo) i pumpa imaju određenu zapreminu u kojoj se takođe odvija reakcija, stoga je neophodno i ove zapremine uvrstiti u model. Uvedena je pretpostavka da je mešanje u ovom dodatnom elementu idealno, pa je model proširen dodavanjem još jednog protočnog reaktora sa idealnim mešanjem na struji recikla, što je prikazano i na slici 4.1. Materijalni bilans za dodatni element struje recikla se može prikazati sledećom jednačinom:

$$V_r \frac{dC_{j,r}}{dt} = Q_r C_{j,N} - Q_r C_{j,r} + V_r r_{j,r} \quad (4.3)$$

gde su: V_r zapremina creva kojim se recikl transportuje, $C_{j,r}$ koncentracija j -te komponente u struji recikla, Q_r protok recikla i $r_{j,r}$ brzina nastajanja/nestajanja j -te komponente u struji recikla.

4.1.2. Proračun zapremine reaktora

Ukupna zapremina reaktora se može izračunati tako što se od proizvoda površine unutrašnjeg poprečnog preseka i dužine reaktora oduzme ukupna zapremina pregrada:

$$V = \frac{d_t^2 \pi}{4} L - V_p (N - 1) \quad (4.4)$$

gde su: d_t unutrašnji prečnik cevi reaktora, L dužina reaktora, N broj sudova u kaskadi i V_p zapremina jedne pregrade koja se može izračunati na sledeći način:

$$V_p = \frac{(d_{p,o}^2 - d_{p,i}^2) \pi}{4} \delta + V_s \quad (4.5)$$

gde su: $d_{p,o}$ i $d_{p,i}$ spoljšnji i unutrašnji prečnik pregrade, δ debljina pregrade i V_s zapremina spojnice kojima je pregrada pričvršćena. Na osnovu završnog rada Mirila 2021. usvojeno je da svaka pregrada ima četiri spojnice pri čemu je raspon jedne 20° . Zapremina spojnica na jednoj pregradi iznosi:

$$V_s = 4 \frac{(d_t^2 - d_{p,o}^2) \pi}{4} \frac{20}{360} \delta \quad (4.6)$$

Zapremina pojedinačnog suda sa idealnim mešanjem V_n se dobija tako što se ukupna zapremina reaktora V podeli sa brojem sudova N .

$$V_n = \frac{V}{N} \quad (4.7)$$

Zapremina dodatnog elementa struje recikla se može izračunati kao zbir zapremine u pumpi i zapremine creva recikla:

$$V = \frac{d_c^2 \pi}{4} L_c + V_{pump} \quad (4.8)$$

gde su: V_{pump} dodatna zapremina u pumpi, a d_c i L_c prečnik i dužina creva recikla.

4.1.3. Proračun protoka i vremena zadržavanja

Ukupan protok kroz kaskadu Q je jednak zbiru ulaznog protoka u sistem (Q_{in}) i protoka recikla koji prolazi kroz membransku pumpu (Q_r).

$$Q = Q_{in} + Q_r \quad (4.9)$$

Protok recikla se može podesiti na osnovu zadatog recirkulacionog odnosa koji može biti izražen u odnosu na ulazni protok ili u odnosu na ukupni protok u kaskadi:

$$R = \frac{Q_r}{Q_{in}} \quad (4.10)$$

$$FR = \frac{Q_r}{Q} \quad (4.11)$$

Takođe se može izračunati vreme zadržavanja u odnosu na ulazni protok u sistem (τ_{in}), koji je zapravo jednak i izlaznom protoku, i u odnosu na ukupni protok kroz kaskadu (*single pass residence time* - τ_s).

$$\tau_{in} = \frac{V}{Q_{in}} \quad (4.12)$$

$$\tau_s = \frac{V}{Q} \quad (4.13)$$

U delu 4.3. će biti predstavljena korelacija kojom se može odrediti broj sudova u kaskadi N u zavisnosti od protoka i dužine reaktora. Naime, parametar N u kaskadnom modelu nema osnovu u nekom fizičkom zakonu, već predstavlja statistički parametar slike strujanja o čemu je bilo reči na početku poglavlja.

Opisani model eksplicitno ne uključuje oscilatorni protok, ali budući da istraživanja strujanja u reaktoru sa pregradama ukazuju na brojne prednosti korišćenja oscilatornog toka, moguće je da ulazni protok ili/i protok recikla bude oscilatoran. Stoga se oscilatorni tok uzima u razmatranje implicitno, preko broja sudova u kaskadi N . Povećanjem protoka oscilatornog toka, ali i neoscilatornog (sekundarnog) uobičajeno se povećava broj sudova N kaskade, tj. strujanje se približava poželjnom klipnom stujanju.

4.2. Modelovanje i optimizacija reaktorskog sistema u softverskom paketu gPROMS

gPROMS (general **PRO**cess **MO**deling **S**ystem) je među najnaprednijim dostupnim softverskim paketima za modelovanje i simulaciju procesa. On pruža mogućnosti inženjerima da kvantifikuju dizajn i rad procesa, što rezultuje poboljšanjem efikasnosti procesa, odnosno smanjenjem operativnih i kapitalnih troškova.

U gPROMS-u postoji jasna distinkcija između dela u kome se postavlja model sistema i dela u kome se definiše kakva je procedura izvršavanja modela, u smislu procesne operacije. Matematički opis ponašanja konkretnog posmatranog sistema se zadaje u okviru sekcije *MODEL*. Svaki projekat u gPROMS-u mora da sadrži minimum jednu sekciju *MODEL*. Ova sekcija se sastoji od nekoliko delova koje je neophodno definisati da bi se u potpunosti opisao konkretan sistem. U delu *PARAMETER* su deklarirani svi parametri sistema, odnosno veličine koje imaju konstantnu vrednost zadatu od strane korisnika i koje se nikada ne izračunavaju u simulacijama. U delu *VARIABLE* su deklarirane promenljive veličine koje opisuju ponašanje sistema. Njihove vrednosti mogu biti naknadno definisane od strane korisnika ili se mogu izračunavati tokom simulacija. U delu *EQUATION* je deklariran set jednačina koje opisuju ponašanje sistema, a u njima figurišu prethodno definisani parametri i promenljive.

U sekciji *VARIABLE TYPES* su definisane vrste promenljivih veličina koje su deklarirane u sekciji *MODEL*, kao što je prikazano u tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Način definisanja vrsta promenljivih veličina.

Ime promenljive	Merna jedinica	Uobičajena vrednost	Donja granica	Gornja granica
Amplituda oscilovanja	dm	0,5	0	1
Koncentracija	mol/m ³	500	-100	5000
Zapreminski protok	l/min	0,01	1e-30	1000
Frekvencija oscilovanja	1/min	0,5	0	5000
Dužina	m	1e-4	1e-6	100

Linearna brzina	dm/min	0,5	0	10000
Molarni protok	mol/s	1,7e-7	0	0,17
Funkcija cilja	-	0,5	1e-30	1000
Brzina reakcije	mol/(m ³ s)	0,17	-1,7	17
Recirkulacioni odnos	-	0,9	0	0,99
Vreme zadržavanja	min	60	1e-30	1e30
Rejnoldsov broj	-	0,5	0	100000
Zapremina	l	1e-5	1e-8	10000
Prinos	-	0,5	0	100

Ovako definisan model se može koristiti u cilju proučavanja ponašanja sistema pod različitim uslovima. U sekciji *PROCESS* su definisani specifični detalji postupka izvršavanja, tj. procesne procedure koje se primenjuju nad prethodno definisanim matematičkim modelom. Jedan projekat u gPROMS-u može da sadrži više *PROCESS* sekcija od kojih svaka definiše jednu operaciju ili aktivnost koju je moguće simulirati (na primer puštanje u rad ili gašenje procesnog sistema). Ova sekcija se sastoji od nekoliko delova sa informacijama koje su neophodne kako bi se definisala željena simulacijska aktivnost. U delu *UNIT* se definiše model čije će se ponašanje simulirati. U delu *SET* se definišu vrednosti procesnih parametara, ukoliko njima nisu dodeljene *DEFAULT* vrednosti u samoj sekciji *MODEL*. U delu *ASSIGN* se definišu vrednosti promenljivih veličina kako bi se zadovoljio uslov jednoznačnosti. Ukoliko je broj nepoznatih veći od broja jednačina sistem je nedovoljno definisan. Tada se može izračunati broj stepeni slobode kao:

$$\text{broj stepeni slobode} = \text{broj nepoznatih veličina} - \text{broj jednačina} \quad (4.14)$$

Da bi problem mogao da se reši neophodno je definisati vrednosti za onoliko promenljivih veličina koliki je broj stepeni slobode u sistemu. U delu *INITIAL* se zadaje protokol, tj. procedura u vremenu koje treba simulirati.

4.2.2. Način izvođenja optimizacija sistema u softverskom paketu gPROMS

Optimizacija se može definisati kao proces pronalaženja najboljeg rešenja za određen konkretan problem uz poštovanje ograničenja sistema. Prilikom dizajna novog procesa ili rekonstrukcije i održavanja postojećeg procesa neophodno je doneti niz odluka čiji je krajnji cilj postizanje minimuma uloženi sredstava ili maksimuma profita. Pošto količina uloženi sredstava i ostvareni profit u praksi često mogu da se predstave kao funkcija manipulativnih promenljivih

procesa, optimizacija se drugačije može definisati kao proces pronalaženja uslova pri kojima pomenuta funkcija cilja postiže ekstremnu vrednost (minimum ili maksimum) (Glandt i sar. 2001.). Prilikom traženja optimalnog rešenja, bitno je poštovati ograničenja koja su zadata ili kroz sam model procesa i/ili kao posebni matematički izrazi. Procesom optimizacije se određuju vrednosti optimizacionih promenljivih (Rao 2009).

Osnovni elementi svakog optimizacionog problema su:

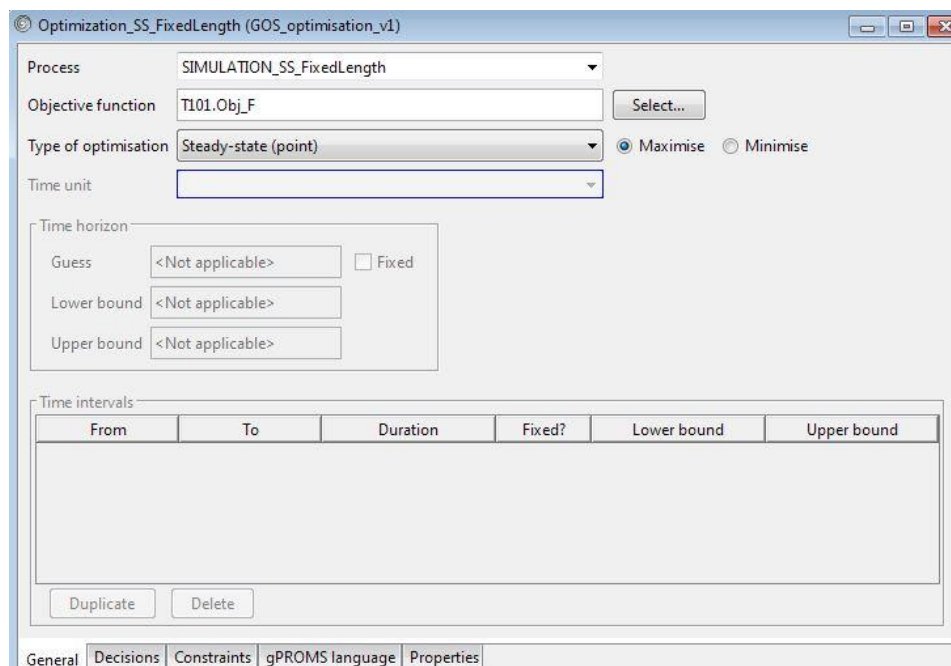
- Matematički model sa ograničenjima
- Funkcija cilja
- Optimizacione (ili kontrolne) promenljive

Na osnovu ograničenja sistema se biraju optimizacione promenljive, odnosno set promenljivih čije se vrednosti optimizuju tako da se ispuni željeni cilj. Funkcija cilja je najčešće maksimum profita, minimum troškova, maksimum željenog proizvoda ili minimum sporednih proizvoda (Venkateswarlu i sar. 2019.).

Prethodno opisan sistem kaskade reaktora sa idealnim mešanjem je optimizovan kako bi se dobili najpovoljniji procesni uslovi. Optimizacija u gPROMS-u se vrši tako što se formira entitet *OPTIMISATION* u okviru već postojećeg projekta. U okviru prozora za optimizaciju postoji više kartica u kojima je moguće podesiti sve neophodne informacije za proces optimizacije (gPROMS - Optimisation Guide, 2012).

Kartica **General** je prikazana na slici 4.2 i sadrži sledeće informacije:

- Proces koji se optimizuje (*Process*),
- Funkcija cilja (*Objective function*) koja se maksimizuje (*Maximise*) ili minimizuje (*Minimize*),
- Tip optimizacije (*Type of optimisation*) koja može biti stacionarna ili dinamička,
- Vremenski horizont (*Time horizon*) gde se zadaje vrednost (*Value*) koja može biti fiksna, ili se mogu zadati donja i gornja granica (*Lower/Upper bound*). Ovaj deo je potrebno zadati samo ukoliko je u pitanju dinamička optimizacija,
- Kontrolni intervali (*Control intervals*) koji omogućavaju da se vremenski horizont deli na više intervala, u slučaju dinamičke optimizacije. Zadaje se trajanje svakog intervala, pri čemu suma trajanja svih kontrolnih intervala mora biti jednaka ukupnom trajanju vremenskog horizonta.

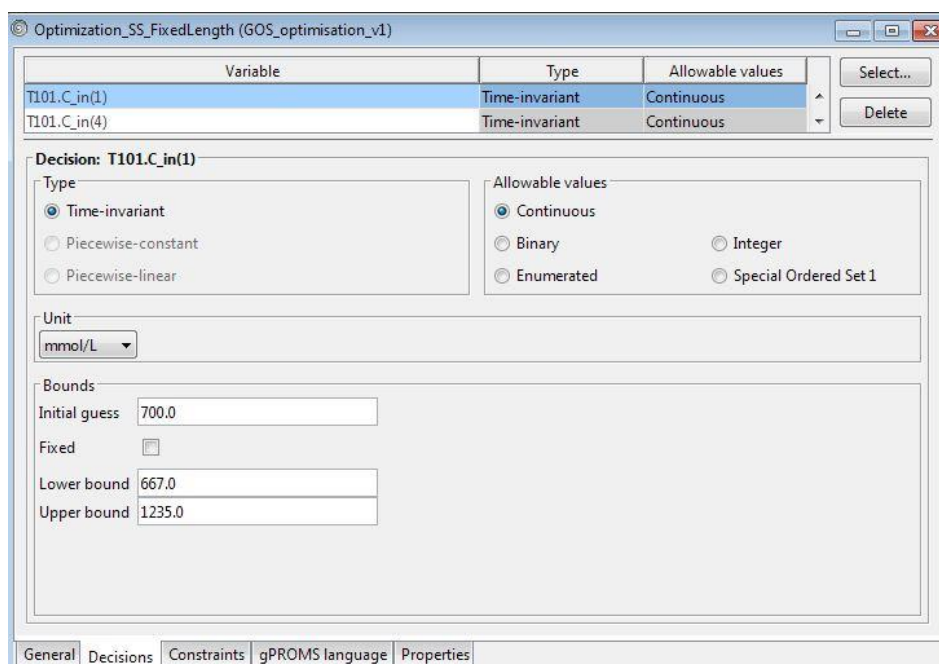


Slika 4.2. Izgled kartice *General*

Kartica **Decisions** je prikazana na slici 4.3 i sadrži sledeće informacije:

- Listu optimizacionih promenljivih (*Variable*), pri čemu se razlikuje više tipova:
 - Promenljive koje su konstantne tokom vremenskog intervala (*Piecewise constant*)
 - Promenljive koje se linearno menjaju tokom vremenskog intervala (*Piecewise linear*)
 - Promenljive čije se vrednosti ne menjaju tokom vremena (*Time-invariant parameters*)
- Za svaku optimizacionu promenljivu se zadaju početna pretpostavka (*Initial guess*), donja i gornja granica (*Lower bound* i *Upper bound*).

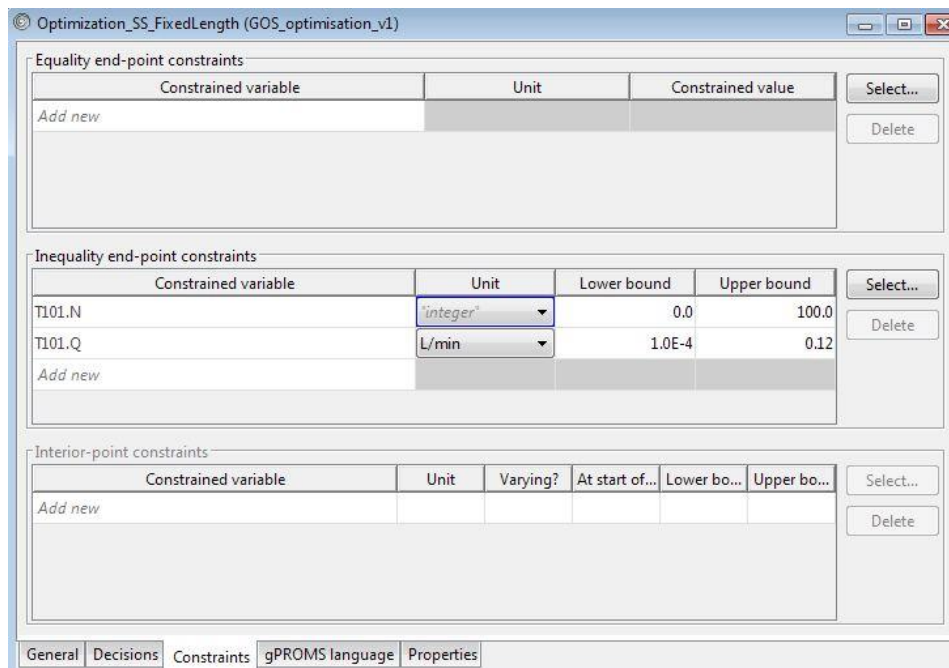
Optimizacionim promenljivim koje su definisane u okviru ove kartice, moraju biti dodeljene vrednosti u okviru **ASSIGN** dela u sekciji **PROCESS**, ali prednost imaju vrednosti koje se zadaju kao početne na kartici **Decisions** u okviru entiteta *Optimisation*.



Slika 4.3. Izgled kartice *Decisions*

Kartica **Constraints** je prikazana na slici 4.4 i sadrži listu dodatnih ograničenja (*Constrained variables*) koja mogu biti:

- Ograničenja tipa jednakosti na kraju vremenskog intervala (*End-point constraints*),
- Ograničenja tipa nejednakosti na kraju vremenskog intervala (*Inequality end-point constraints*), pri čemu je preporuka zadavati ovu vrstu ograničenja, a ne ograničenja tipa jednakosti,
- Unutrašnja ograničenja (*Interior point constraints*), koja je moguće zadati ukoliko je u pitanju dinamička optimizacija, a ukupni vremenski horizont je izdelfen na intervale.



Slika 4.4. Izgled kartice *Constraints*

Kartica *gPROMS language* sadrže sve prethodno pomenute informacije napisane odgovarajućim programskim jezikom gPROMSa.

Metoda koju gPROMS koristi za optimizaciju procesa je sekvencijalno kvadratno programiranje (engl. “sequential quadratic programming (SQP)”). Ovo je iterativna metoda za nelinearno programiranje i smatra se oblikom Njutnove metode. Cilj je da se u svakoj iteraciji nelinearni optimizacioni problem aproksimira kvadratnim programom i rešava primenom metode aktivnih ograničenja.

4.3. Određivanje korelacije koja definiše neidealno strujanje u spiralnom reaktoru sa pregradama

Kao što je ranije pomenuto, potrebno je uspostaviti vezu između oscilatornog i neoscilatornog toka u SORP i modela kaskade sa recirulacijom, tj. da se odredi adekvatan broj sudova u kaskadi za date uslove proticanja. Ova zavisnost je neophodna za opisivanje slike strujanja u sistemu. Zato su izvedeni eksperimenti sa obeleženom supstancom, koji su pokazali da je broj sudova manji od broja segmenata u realnom reaktoru, što znači da mešanje u svakom segmentu nije u potpunosti idealno.

4.3.1. Eksperimenti sa obeleženom supstancom

Eksperimenti sa obeleženom supstancom (OS) su izvedeni u SORP dužine 2m (slika 4.5). Procedura izvođenja eksperimenata je slična proceduri opisanoj u Poglavlju 3.3.2. ove teze. Primarni otvor na početku reaktora se uz pomoć gumenog creva spaja sa membranskom pumpom, koja stvara

oscilatorni tok, a drugi sekundarni otvor se spaja sa peristaltičkom pumpom, koja daje neoscilatorni (sekundarni ili normalan) tok. Pre početka izvođenja eksperimenata, potrebno je izvršiti kalibraciju obe pumpe, što je takođe opisano u Poglavlju 3.3.2. Zatim se vrši punjenje reaktora vodom u vodenom kupatilu i istiskivanje zaostalih mehurova.



Slika 4.5. SORP za eksperimente sa obeleženom supstancom

Kada se završi sa pripremom reaktora, potrebno je u špric uzeti 0,5 ml obeležene supstance. U ovim eksperimentima kao obeležena supstanca je korišćeno metilensko plavo koncentracije 2 g/l. Obeležena supstanca (trejser) se ubacuje u sekundarni otvor na početku reaktora uz pomoć šprica (slika 4.6.a). Proticanje metilenskog plavog kroz SORP je prikazano na slici 4.6.b. Nakon unošenja trejsera približno implusno, fluid se na 2 pozicije u reaktoru uzorkuje u određenim vremenskim intervalima. Uzorkovanje se obavlja sve dok uzeti uzorak ne postane bistar, što je indikacija da nema zaostalog trejsera u reaktoru. Uzorkovanje je vršeno na sekundarnim otvorima neposredno iza U-cevi (na pola) i na izlazu (kraju) reaktora. U tabeli 4.2 su prikazani eksperimentalni uslovi za 20 izvedenih eksperimenata. Oscilatorni protok (Q_0) je bio u opsegu od 0,6 do 7,2 l/h, dok je neoscilatorni, normalni protok (Q_n) bio u opsegu od 0,5 do 2,2 l/h. Za svaki eksperimentalni uslov je urađeno po 2 ili 3 ponavljanja. Uzorci su analizirani spektrofotometrijski (UV/VIS Scanning Model - UV – 3100).



Slika 4.6. Ubacivanje obeležene supstance u SORP (a) i proticanje obeležene supstance kroz SORP (b)

Tabela 4.2. Eksperimentalni uslovi.

Exp	L, m	Q _o , l/h	Q _n , l/h	Q _{uk} , l/h	f, 1/s	Re _o , -	Re _n , -	τ, s
1	1	1,82	-	1,82	0,32	75,61	-	144,3
2	1	3,60	-	3,60	0,63	149,55	-	72,9
3	1	5,27	-	5,27	0,93	218,72	-	49,9
4	1	2,40	2,2	4,60	0,42	99,70	77,62	57,1
5	1	0,90	-	0,90	0,16	37,39	-	291,7
6	1	2,40	-	2,40	0,42	99,70	-	109,4
7	1	1,20	-	1,20	0,21	49,85	-	218,8
8	1	0,60	-	0,60	0,11	24,93	-	437,6
9	1	4,80	-	4,80	0,84	199,40	-	54,7
10	1	7,20	-	7,20	1,27	299,10	-	36,5
11	1	-	0,54	0,54	-	-	19,05	486,2
12	1	-	1,2	1,20	-	-	42,34	218,8
13	1	-	1,8	1,80	-	-	63,50	145,9
14	1	0,65	1,2	1,85	0,11	27,00	42,34	141,9
15	1	3,00	1,8	4,80	0,53	124,63	63,50	54,7
16	2	1,26	-	1,26	0,22	52,34	-	433,0
17	2	3,68	-	3,68	0,65	152,87	-	148,3
18	2	7,2	-	7,20	1,27	299,10	-	75,8
19	2	3,1	1,8	4,90	0,55	128,78	63,50	111,3
20	2	0,65	1,2	1,85	0,11	27,00	42,34	294,9

Uzorci fluida se iz reaktora uzimaju u određenim vremenskim intervalima, u zavisnosti od ukupnog protoka tečnosti u reaktoru, i analiziraju se. Zapremina uzetih uzoraka je bila oko 1 ml - dovoljna, a mala količina koja ne utiče na ukupni protok tečnosti i njen način proticanja kroz reaktor. Apsorbansa uzoraka određuje se spektrofotometrijski primenom UV-VIS spektrofotometra na talasnoj dužini od 664 nm. Iz izmerenih vrednosti apsorbance jednostavno se izračunavaju koncentracije OS u analiziranim uzorcima primenom prethodno određene kalibracione prave. Kalibraciona prava se određuje na osnovu poznatih koncentracija OS. Za željeni opseg koncentracije OS, utvrđena je linearna zavisnost između absorbance i koncentracije.

Eksperimentalna raspodela starosti fluida koji napušta sud (E_{exp}) se računa uz pomoć izraza:

$$E_{exp}(t) = \frac{Q \cdot c(t)}{m_t} \quad (4.15)$$

gde je m_t ukupna količina obeležene supstance (eng. tracer) u sistemu, Q ukupni zapreminski protok, a $C(t)$ koncentracija obeležene supstance na izlazu.

4.3.2. Estimacija parametara korelacije za broj sudova u kaskadi N

Kao što je ranije opisano, parametar N u kaskadi idealno izmešanih sudova definiše efikasnost mešanja unutar SORP-a, a funkcija je Rejnoldsovog broja oscilatornog dela toka (Re_o) i Rejnoldsovog broja normalnog (tj. neoscilatornog) dela toka (Re_n). Povećanje efikasnosti mešanja, izraženo brojem sudova, nastaje povećanjem protoka, kako oscilatornog, tako i normalnog, kao što je navedeno ranije u tekstu. Međutim, povećanje protoka smanjuje vreme zadržavanja, a time i konverziju. Stoga je moguće naći optimalne uslove, dovoljno male protoke da obezbede dovoljno vreme zadržavanja, a sa druge strane daju strujanje koje ne odstupa drastično od idealnog klipnog. U cilju kvantifikacije efikasnosti mešanja predložena je korelacija koja povezuje odnos virtuelnog broja sudova (N) i fizičkog broja segmenata (N_t). Parametri korelacije su dobijeni na osnovu rezultata opisanih eksperimenata sa obeleženom supstancom, primenom optimizacije (tzv. Estimacija parametara). Pre nego što se odrede parametri korelacije, neophodno je odrediti vrednosti N za različite uslove protoka (eksperimentalne rezultate u tabeli 4.1), što je izvedeno na način opisan ispod.

$E(t)$ funkcija je povezana sa brojem N preko opšte analitičke jednačine kaskadnog modela:

$$E_{mod}(t) = \frac{1}{\bar{t}} \left(\frac{t}{\bar{t}} \right)^{N-1} \frac{N^N}{(N-1)!} e^{-tN/\bar{t}} \quad (4.16)$$

gde \bar{t} predstavlja teorijsko vreme zadržavanja (određuje se kao V/Q), a N broj sudova u kaskadi. Ovaj model ima samo jedan parametar koji treba odrediti – N , dok su svi ostali članovi poznati, pri čemu je N funkcija Re_o i Re_n . Ispitano je nekoliko različitih oblika korelacija za N , koje su predstavljene u tabeli 4.3. Cilj je bio postaviti korelaciju što jednostavnijeg oblika, sa manjim brojem podesivih parametara. Kvalitet predviđanja je određen na osnovu vrednosti funkcije cilja, čiji se minimum traži, koja predstavlja zbir kvadrata razlika $E(t_j)_i^{exp}$ i $E(t_j)_i^{mod}$ za sve tačke:

$$F_{obj} = \sum_{i=1}^{N_{exp}} \sum_{j=1}^{N_{uz}} (E(t_j)_i^{exp} - E(t_j)_i^{mod})^2 \quad (4.17)$$

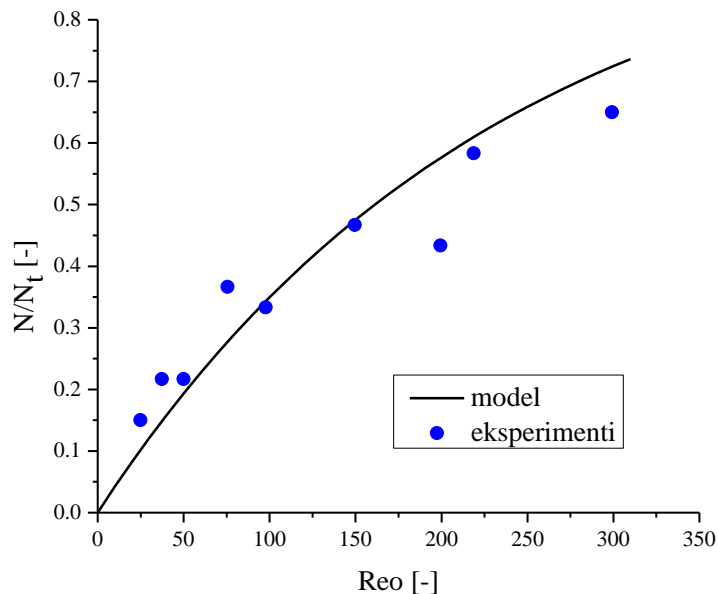
gde je N_{exp} broj eksperimenata (uključujući i duplikate), a N_{uz} broj uzoraka za svaki eksperiment. Eksperimenti su uključivali 20 kombinacija uslova protoka i dužine reaktora, sa različitim kombinacijama oscilatornih i neoscilatornih komponenti strujanja (tabela 4.2). Svaki eksperiment je imao 2-3 ponavljanja i 15-25 uzoraka. Tako je za procenu korelacionih parametara korišćeno ukupno 831 tačaka. Estimacija parametara je urađena korišćenjem hibridnog genetskog algoritma u Matlab-u 2023a (ga metoda, praćena pretragom gradijenta `fminsearch`).

Na osnovu kvalitativne i kvantitativne analize peta korelacija sa određenim vrednostima parametara K_1 i K_2 je izabrana kao najbolja. Ova korelacija uključuje eksponencijalni član, koji se smanjuje sa povećanjem Re_o i Re_n , pri čemu se vrednost N približava fizičkom broju segmenata N_t . Ovaj eksperimentalni trend i dobro slaganje korelacije 5 sa njim se može videti na slici 4.7. Eksperimentalne N vrednosti prikazane na slici 4.7 su određene direktnim estimiranjem tog parametra fitovanjem jednačine 4.16 na podatke iz pojedinačnih eksperimenata, uz pomoć funkcije cilja 4.17 u Matlabu i naredbe `fminbnd` (određivanje minimuma nelinearne funkcije u zadatom intervalu

nezavisne promenljive). Na osnovu ove procedure su određene vrednosti N za sve eksperimente, što je prikazano u tabeli P.1 u Prilogu teze.

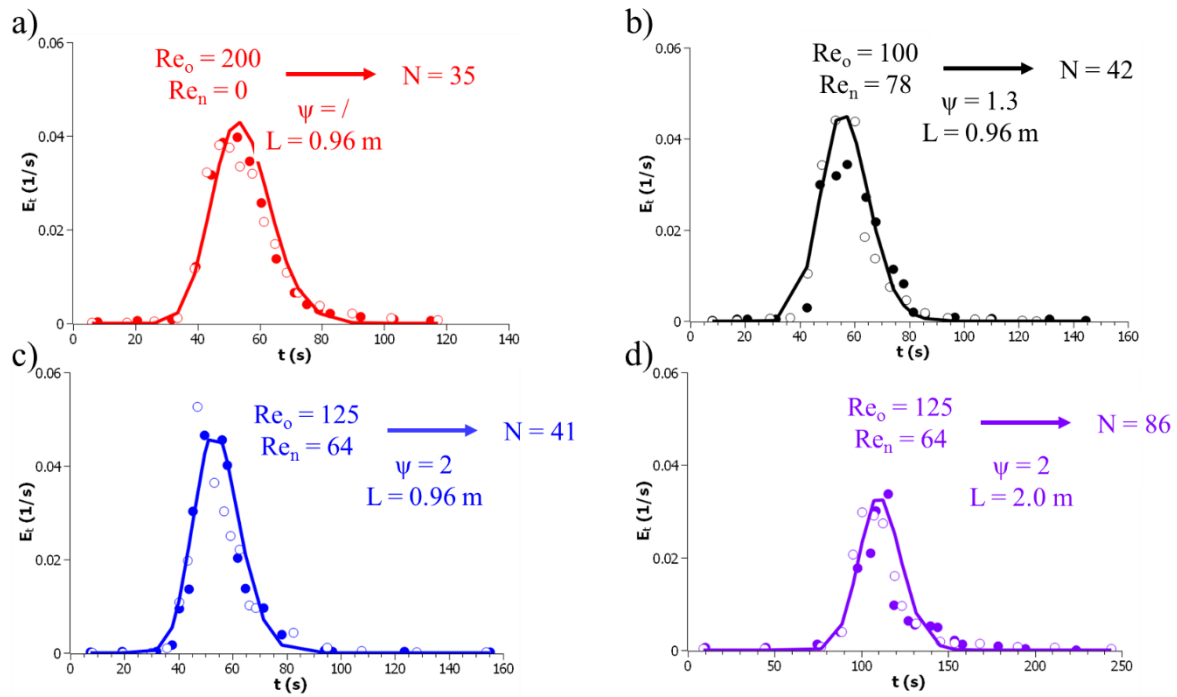
Tabela 4.3. Optimalni parametri za različite predložene korelacije.

Korelacija		a_1	K_1	K_2
1.	$\frac{N}{N_t} = K_1(Re_t)^{a_1}$	0,26	0,18	–
2.	$\frac{N}{N_t} = K_1(Re_o + Re_n)^{a_1}$	0,25	0,18	–
3.	$\frac{N}{N_t} = (K_1Re_o + K_2Re_n)^{a_1}$	0,32	0,0013	0,0061
4.	$\frac{N}{N_t} = (K_1Re_o + K_2Re_n)^{0.5}$	–	0,0025	0,013
5.	$\frac{N}{N_t} = 1 - e^{(-K_1Re_o - K_2Re_n)}$	–	0,0043	0,0097



Slika 4.7. Promena odnosa N/N_t određenog korelacijom broj 5 (tabela 4.3), u funkciji uslova proticanja Re_o

Primer slaganja eksperimentalnih E kriva i modela kaskade sa N vrednostima izračunatim na osnovu korelacije 5 je dat na slici 4.8, za 4 izabrana eksperimenta, pri različitim kombinacijama oscilatornog i neoscilatornog protoka. Može se uočiti dobro slaganje rezultata, čime je potvrđena adekvatnost predloženog modela.



Slika 4.8. Poređenje rezultata eksperimenata sa obeleženom supstancom i kaskadnog modela za SORP. $E(t)$ krive za eksperimente: a) Br. 9, $Re_o = 200$, $Re_n = 0$, b) Br. 4, $Re_o = 100$, $Re_n = 78$, c) Br. 15, $Re_o = 125$, $Re_n = 64$, d) Br. 19, $Re_o = 125$, $Re_n = 64$

4.4. Korekcija kinetike za različite aktivnosti enzima i validacija modela (enzim E1 i E2)

Kao što je u prethodnim poglavljima već spomenuto, prilikom izvođenja eksperimenata u SORP, korišćene su različite bočice enzima sa drugačijim aktivnostima, što je označeno sa E1 i E2. Parametri kinetičkog modela opisanog u Poglavlju 2.1. su dobijeni u šaržnom reaktoru upotrebom enzima iz prve bočice, što je označeno sa E0. Kako je ovaj kinetički model u simulacijama pokazao odstupanja u vrednostima koncentracija komponenti u odnosu na eksperimente izvedene u SORP gde su korišćeni enzimi E1 i E2, izvedena je korekcija (modifikacija) kinetičkog modela i parametara za različite aktivnosti enzima. U master radu Ljujić 2023. su detaljnije pokazani različiti oblici korekcije. Najbolji rezultati su dobijeni kada se kinetički parametri za reakciju hidrolize množe jednim faktorom (a_1), a kinetički parametri za reakciju transgalaktozilacije drugim faktorom (a_2). Faktor a_1 množi konstante brzina k_1 , k_2 i k_3 , dok faktor a_2 množi konstante brzina k_4 , k_5 , k_6 i k_7 . Optimalna vrednost ovih parametara je određena numeričkom optimizacijom, gde je funkcija cilja suma kvadrata odstupanja rezultata po modelu i eksperimentalnih, pomoću Matlab funkcija ga i $fminsearch$. Modifikovane jednačine brzina reakcije su:

$$r_{C_L} = -a_1 \cdot k_1 C_E C_L + a_1 \cdot k_2 C_{EGAL} C_{GLU} - a_2 \cdot k_4 C_{EGAL} C_L + a_2 \cdot k_5 C_E C_{GOS_3} \quad (4.18)$$

$$r_{C_{GLU}} = a_1 \cdot k_1 C_E C_L - a_1 \cdot k_2 C_{EGAL} C_{GLU} \quad (4.19)$$

$$r_{C_{GAL}} = a_1 \cdot k_3 C_{EGAL} \quad (4.20)$$

$$r_{C_E} = -a_1 \cdot k_1 C_E C_L + a_1 \cdot k_2 C_{EGAL} C_{GLU} + a_1 \cdot k_3 C_{EGAL} + a_2 \cdot k_4 C_{EGAL} C_L - a_2 \cdot k_5 C_E C_{GOS_3} + a_2 \cdot k_6 C_{EGAL} C_{GOS_3} - a_2 \cdot k_7 C_E C_{GOS_4} \quad (4.21)$$

$$r_{C_{EGAL}} = a_1 \cdot k_1 C_E C_L - a_1 \cdot k_2 C_{EGAL} C_{GLU} - a_1 \cdot k_3 C_{EGAL} - a_2 \cdot k_4 C_{EGAL} C_L + a_2 \cdot k_5 C_E C_{GOS_3} - a_2 \cdot k_6 C_{EGAL} C_{GOS_3} + a_2 \cdot k_7 C_E C_{GOS_4} \quad (4.22)$$

$$r_{C_{GOS_3}} = a_2 \cdot k_4 C_{EGAL} C_L - a_2 \cdot k_5 C_E C_{GOS_3} - a_2 \cdot k_6 C_{EGAL} C_{GOS_3} + a_2 \cdot k_7 C_E C_{GOS_4} \quad (4.23)$$

$$r_{C_{GOS_4}} = a_2 \cdot k_6 C_{EGAL} C_{GOS_3} - a_2 \cdot k_7 C_E C_{GOS_4} \quad (4.24)$$

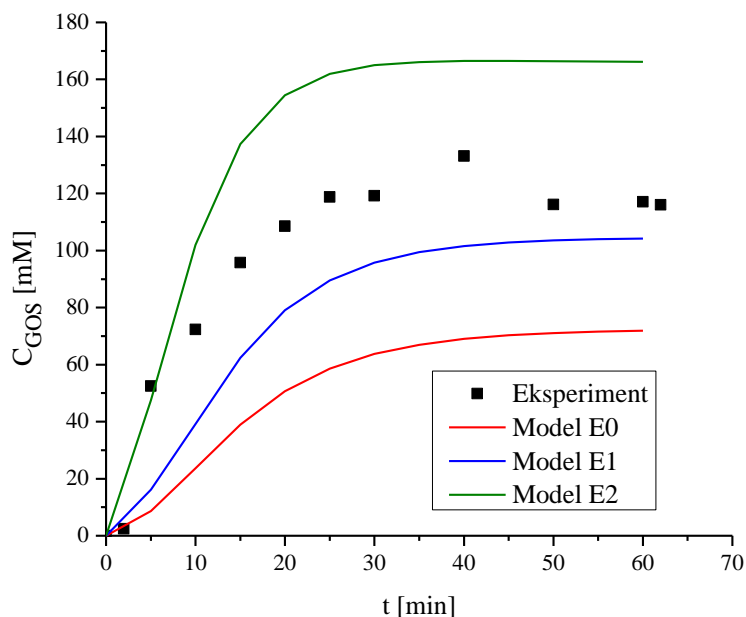
Na taj način je pored parametara kinetičkog modela sa originalnim enzimom E0, dobijen model E1, koji ima faktore korekcije aktivnosti $a_1=1,295$ i $a_2=1,88$. Ovi faktori su dobijeni estimacijom parametara na osnovu šaržnih eksperimenata izvedenih sa enzimom E1 ($C_E=0,8$ mg/ml, $C_E=1$ mg/ml i $C_E=1,5$ g/l).

Zatim je predložena i korekcija modela sa enzimom E2, koji je imao modifikovane faktori korekcije aktivnosti $a_1=4,185$ i $a_2=7,069$. Oni su određeni na osnovu šaržnih eksperimenata izvedenih sa enzimom E2 ($C_E=0,16$ mg/ml, $C_E=0,3$ mg/ml, $C_E=0,8$ mg/ml i $C_E=1,5$ mg/ml).

Slaganje eksperimenata sa rezultatima sva tri modela E0, E1 i E2 je prikazano na osnovu vrednosti stacionarnih stanja svih komponenti u tabelama 1-4 u Prilogu ove teze. U tabelama su takođe prikazani i parametri i uslovi u SORP. Parametri kinetičkog modela određeni za enzim E0 nisu pokazali dobro slaganje ni za jedan kontinualni eksperiment. Za eksperiment 1 najbolje slaganje se dobija kada se koristi model E1. Za eksperimente 2 i 3 se slična slaganja dobijaju sa modelom E1 i modelom E2. Za eksperiment 4 se bolje slaganje dobija za model E1 (korišćen enzim pomešan iz stare i nove bočice). Za eksperimente 5 i 6 se najbolja slaganja dobijaju kada se upotrebi model E2.

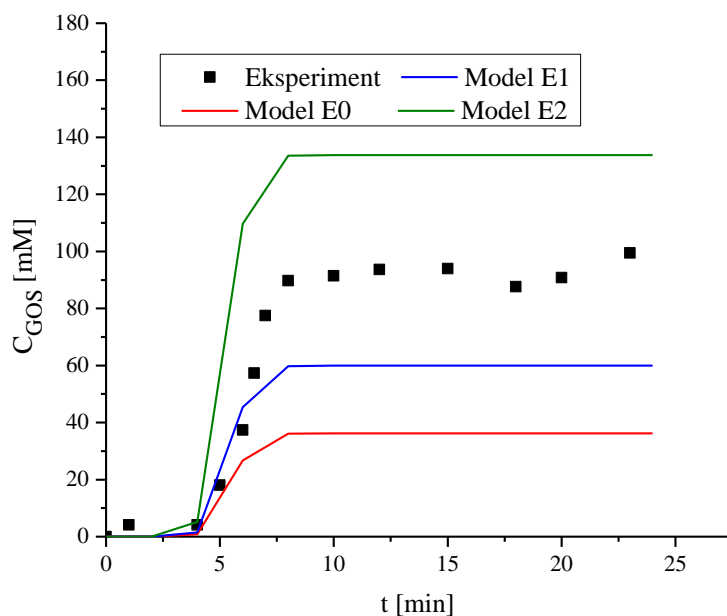
Da bi se potvrdila slaganja eksperimentalnih rezultata i modela, prikazani su grafici promene koncentracije GOS-a sa vremenom u SORP. Pri tome je korišćen model kaskade N reaktora sa reciklom (jednačine 4.1 - 4.3), korelacija za određivanje N (jednačina 5 iz tabele 4.3), uz modele kinetike (E0, E1 i E2). Na svakom grafiku (slike 4.9 – 4.14) se mogu uočiti eksperimentalni rezultati (crne tačke) i tri krive koje predstavljaju modele E0 (crvena), E1 (plava) i E2 (zelena kriva).

Sa slike 4.19. se može zaključiti da model E1 najbolje opisuje eksperiment 1 izveden u SORP (potvrda rezultata iz tabela P.2-P.5 iz Priloga teze).

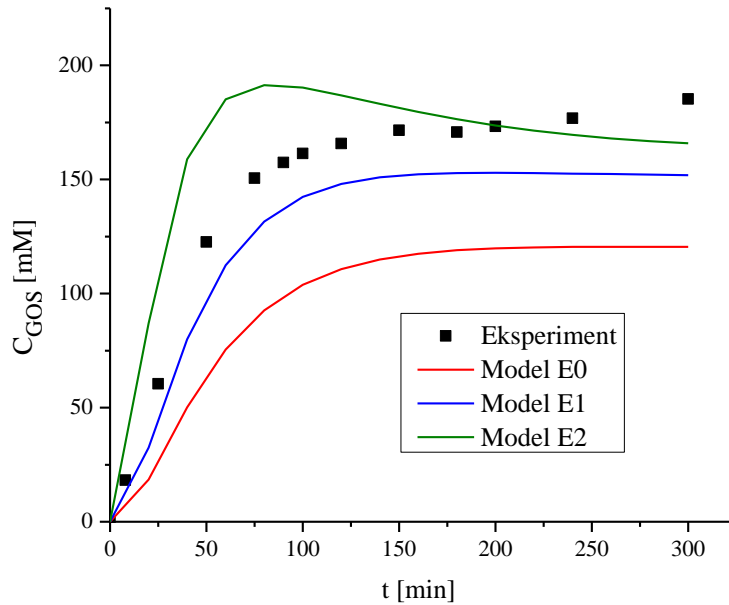


Slika 4.9. Promena koncentracije GOS po modelu i u eksperimentu 1 sa vremenom

Za eksperimente 2 i 3 (slike 4.10 i 4.11), eksperimentalne tačke se nalaze između modela E1 i E2, ali je izabran model E1, jer su eksperimenti rađeni sa enzimom koji ima manju aktivnost. Za treći eksperiment je trend promene koncentracije GOS-a sa vremenom sličan modelu E1, dok model E2 pokazuje maksimum koncentracije GOS-a, pa zatim ta koncentracija blago opada do isteka vremena reakcije (zeleno kriva, slika 4.11), što se ne slaže za izvedenim eksperimentom, a to je trend koji se javlja pri upotrebi enzima veće aktivnosti.

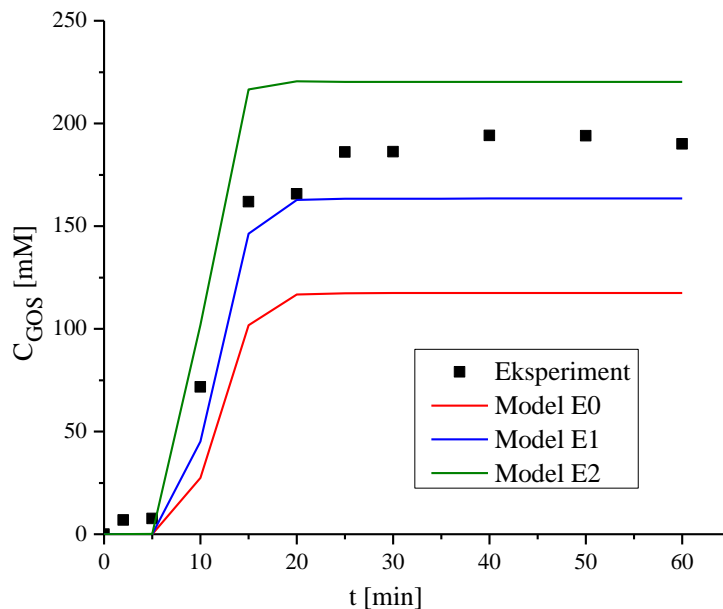


Slika 4.10. Promena koncentracije GOS po modelu i u eksperimentu 2 sa vremenom



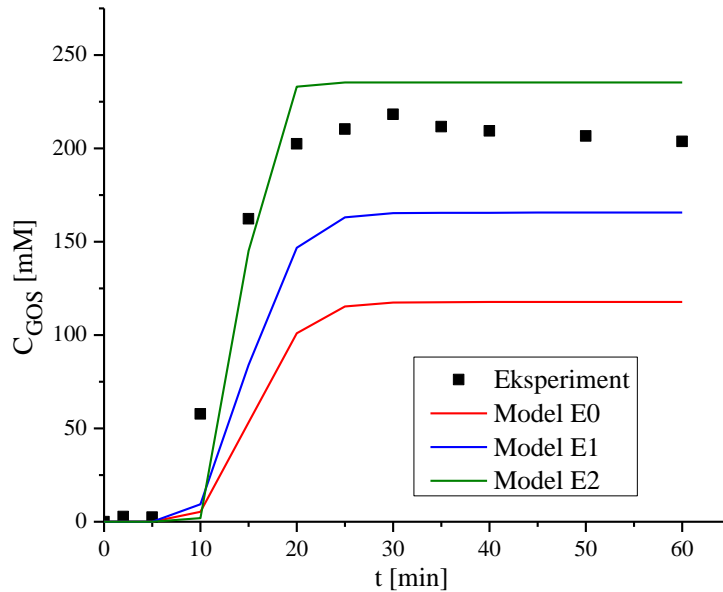
Slika 4.11. Promena koncentracije GOS po modelu i u eksperimentu 3 sa vremenom.

Validacija eksperimenta 4 je bila najproblematičnija, jer je korišćen enzim pomešan iz bočice sa E1 i bočice sa E2. Kao što se vidi sa slike 4.12, eksperimentalne tačke se nalaze između modela E1 i E2, ali je kao bolji izabran model E1 zbog boljeg slaganja ostalih komponenti.

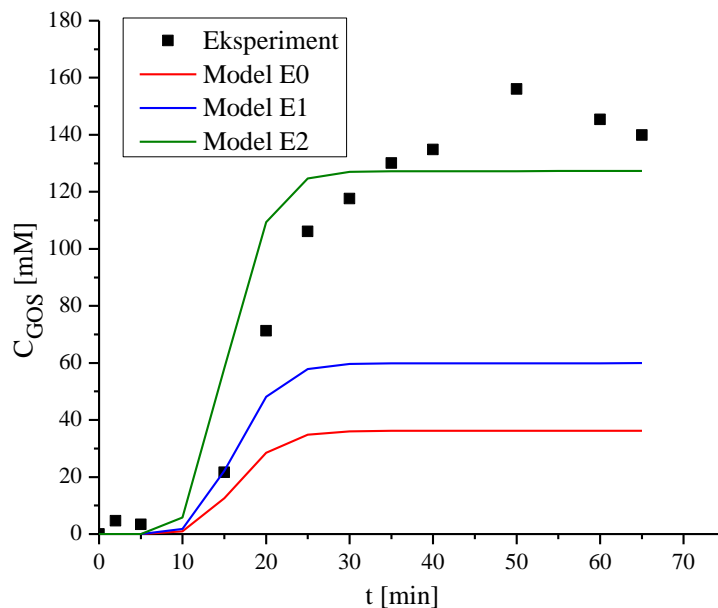


Slika 4.12. Promena koncentracije GOS po modelu i u eksperimentu 4 sa vremenom

Za eksperimente 5 i 6 (slike 4.13 i 4.14) se može jasno videti da model E2 daje vrlo dobro slaganje sa eksperimentima, kako za prikazane garfike promene koncentracije GOS-a sa vremenom, tako i za promene koncentracije ostalih komponenti sa vremenom (prilog teze). Za eksperiment 5 se stacionarno stanje uspostavlja posle 20 min, što pokazuje i model E2 (zeleno kriva).



Slika 4.13. Promena koncentracije GOS po modelu i u eksperimentu 5 sa vremenom



Slika 4.14. Promena koncentracije GOS po modelu i u eksperimentu 6 sa vremenom

Na osnovu prikazanih rezultata može se uočiti određeno odstupanje modela od eksperimenata. Razlozi mogu da budu različiti:

a) U eksperimentima su korišćeni enzimi različitih aktivnosti (pa čak i izmešani, kao u eksperimentu 4), a kinetički model je korigovan na osnovu manjeg broja šaržnih eksperimenata. Ovo neslaganje se odnosi na vrednosti u stacionarnom stanju (platoi linija, posle dužeg vremena).

b) Model SORP uključuje korelaciju za N koja takođe unosi izvesnu grešku u predviđanju. Ovo se ogleda u neslaganju S krive po eksperimentu i modelu (brži / sporiji porast koncentracije).

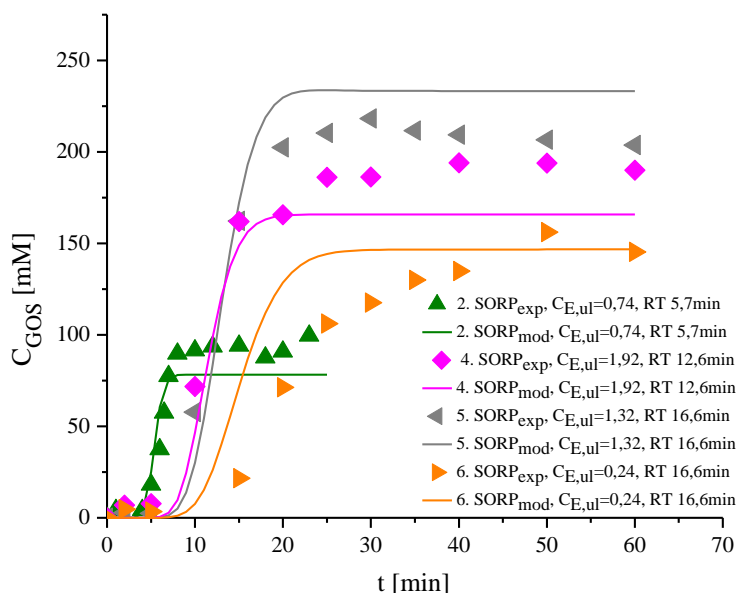
c) Eksperimenti u SORP su složeni i postoji realna mogućnost izvesne eksperimentalne greške. Osim toga, za određivanje GOS je analitička HPLC metoda manje pouzdana zbog relativno malih vrednosti koncentracija.

U svakom slučaju, model dobro pokazuje trendove dinamičkog ponašanja i promena vrednosti u stacionarnom stanju, pa se može primeniti u daljim analizama i optimizaciji, uz određenu nesigurnost (rezervu).

4.5. Dinamičke simulacije reaktora za sintezu prebiotika

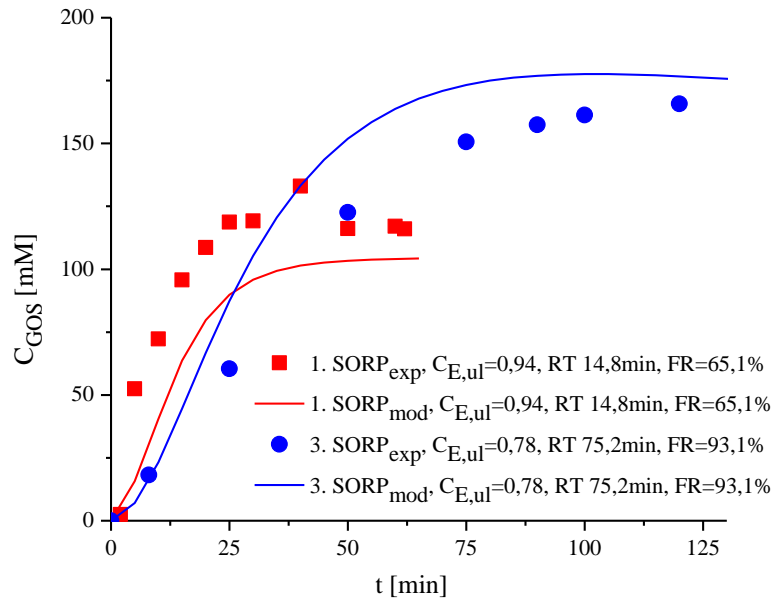
Dinamičke simulacije SORP su rađene u programskom paketu gPROMS za 6 eksperimenata sa uslovima datim u tabeli 3.2 (Poglavlje 3.3). Kako je u prethodnom poglavlju opisano, za eksperimente 1, 2 i 3 je izabran model E1, dok je za eksperimente 4, 5 i 6 izabran model E2. Za opis neidealnog strujanja je korišćena korelacija za N broj 5 data u tabeli 4.3.

Na slici 4.15 je prikazano slaganje eksperimentalnih rezultata i modela promene koncentracije GOS-a sa vremenom za eksperimente 2, 4, 5 i 6. Stacionarno stanje se u svim eksperimentima postiže posle približno dva vremena zadržavanja i može se videti da odabrani modeli dobro prate promene koncentracije GOS-a sa vremenom, odnosno da je neidealno strujanje dobro predviđeno modelom kaskade i brojem N određenim po korelaciji (mogući razlozi za odstupanja su dati na kraju prethodnog dela 4.4). Svi prikazani eksperimenti su izvedeni bez upotrebe recikla.



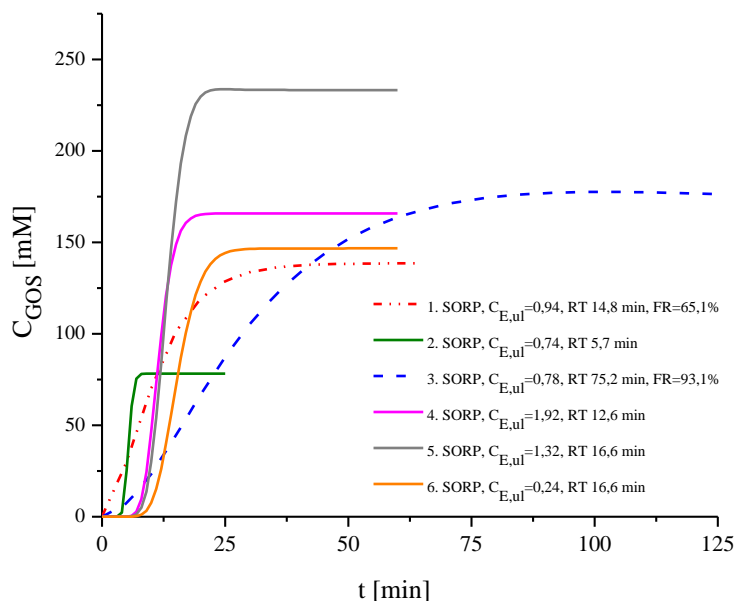
Slika 4.15. Slaganje eksperimentalnih rezultata (simboli) i modela (linije) za eksperimente 2, 4, 5 i 6 izvedene bez upotrebe recikla (RT predstavlja vreme zadržavanja)

Na slici 4.16 je prikazano slaganje eksperimentalnih rezultata i odabranih modela za eksperimente 1 i 3 u kojima je korišćen recikl. Eksperiment 3 je trajao 6 sati, ali je na grafiku prikazano prvih 125 min, jer je tada uspostavljeno stacionarno stanje. Prihvatljivo slaganje eksperimenata i modela je potvrđeno i u ovim eksperimentima.



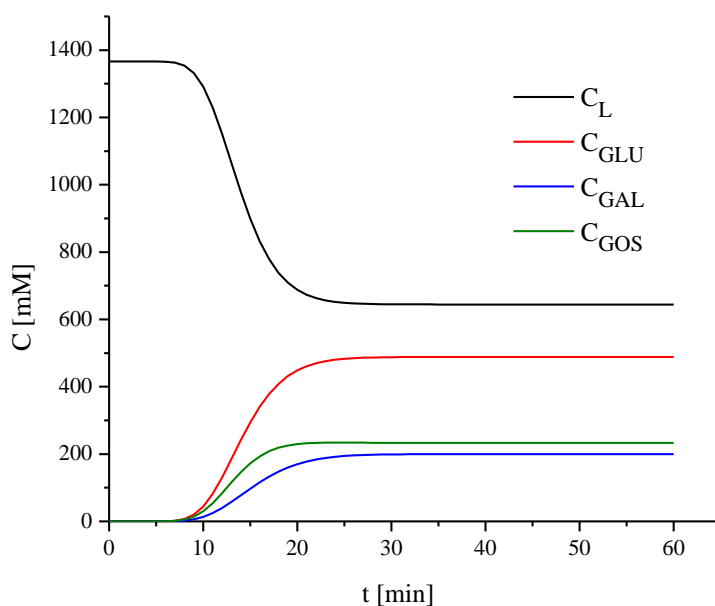
Slika 4.16. Slaganje eksperimentalnih rezultata (simboli) i modela (linije) za eksperimente izvedene sa reciklom

Na slici 4.17 je prikazana promena koncentracije GOS-a sa vremenom po modelu za sve eksperimente. Drugi eksperiment je rađen sa najvećim ulaznim protokom, stacionarno stanje je postignuto posle 10 minuta, posle približno dva srednja vremena zadržavanja. Može se uočiti da je nagib promene koncentracije GOS-a u eksperimentu 2 strmiji u odnosu na one u eksperimentima 1 i 3, iako su ukupni protoci kroz reaktor slični. U prvom i trećem eksperimentu je veći protok postignut reciklom i na taj način se razblažuju koncentracije reaktanta (laktoze) u prvom delu reaktora, tako da se efekat dužeg vremena zadržavanja (koji je prisutan u eksperimentu 1 i naročito u eksperimentu 3) donekle umanjuje. Takođe, i u ostalim eksperimentima bez recikla, uočljiv je oštar nagib krive koji ukazuje na dobro mešanje i usku raspodelu vremena zadržavanja, koja potiče od većeg protoka kroz reaktor. U eksperimentima 1, 4, 5 i 6 je bilo slično vreme zadržavanja, ali je najviše proizvoda nastalo u 5. eksperimentu, što je posledica kako aktivnijeg enzima E2 (nego u 1. eksperimentu) tako i veće ulazne koncentracije enzima.



Slika 4.17. Promena koncentracije GOS sa vremenom po modelu

Na slici 4.18 je prikazana promena koncentracije svih komponenti sa vremenom po modelu za eksperiment 5, u kome je nastalo najviše GOS-a, a i proreagovalo najviše laktoze. Koncentracija reaktanta (laktoze) opada, dok koncentracija proizvoda raste. Stacionarno stanje je za sve komponente uspostavljeno posle 20-tak minuta, što odgovara vrednosti od približno dva vremena zadržavanja. U 5. eksperimentu je za kratko vreme postignuta koncentracija GOS-a od oko 200 mM, što potvrđuje da SORP ima potencijal za kontinualnu proizvodnju GOS-a, sa dobrim prinosima u kratkim vremenima zadržavanja.



Slika 4.18. Promena koncentracije komponenti sa vremenom po modelu za eksperiment 5

Ukupno, rezultati eksperimenata i modela potvrđuju da upotreba recikla nije opravdana, jer se zadovaljavajući prinosi GOS mogu postići bez recirkulacije, sa manjim vremenima zadržavanja. Velike vrednosti protoka recikla razblažuju koncentraciju reaktanta laktoze na ulazu, što vodi manjoj konverziji i pronosu GOS. Osim toga upotrebom recikla se povećava vreme do uspostavljanja stacionarnog stanja, tj. period puštanja sistema u rad, što je takođe nepovoljno sa strane kontinualne operacije. Kao što se na slici 4.17 može uočiti za eksperiment broj 3, sa velikim odnosom recikla Fr , vreme puštanja u rad je čak oko 100 minuta, a do tog vremena prinos GOS je ispod željenog, tj. maksimalnog. Sa druge strane, manji protoci oscilatornog i normalnog toka, koji su korišćeni u eksperimentima 2, 4 i 5 u SORP daju odlično mešanje (strma S kriva, vidi sliku 4.17), što pokazuje da nije neophodno povećavati ukupan protok kroz SORP pomoću recikla da bi se ostvarilo kretanje blisko idealnom klipnom. Ovo je obezbeđeno dobrom konstrukcijom reaktora sa spiralom i pregradama, kao i primenom oscilatornog toka.

Rezultati na slici 4.18 takođe pokazuju da je ključni faktor za povećanje produktivnosti GOS aktivnost enzima (najveći prinos za eksperiment 5 sa aktivnošću E2), što je očekivan rezultat. Pored toga, ekperimentalni trend prikazan na slici 3.38 pokazuje da produktivnost GOS značajno i skoro linearno raste sa potrošnjom enzima. S obzirom na to da je cilj da se kontinualno proizvede što veća količina GOS u datom reaktoru, u narednom delu će se izvesti numerička optimizacija uslova. Osim produktivnosti, cena potrošnje enzima može da igra značajnu ulogu u proizvodnji, što će takođe biti razmotreno u optimizaciji.

4.6. Numerička optimizacija spiralnog reaktora sa pregradama za sintezu prebiotika

U ovom delu su prikazani rezultati numeričkih optimizacija za dobijanje maksimalne proizvodnosti GOS -a u SORP date zapremine ($V = 0,29 \text{ l}$, $L=4 \text{ m}$). Optimizacione promenljive su ulazni protok u sistem (Q_{in}), protok struje recikla (Q_r), koncentracije laktoze i enzima u ulaznoj struji ($C_{in,L}$ i $C_{in,E}$). Ograničenja za minimalne i maksimalne vrednosti koncentracija laktoze ($C_{in,L}=667-1235 \text{ mmol/l}$ i $C_{in,E}=5.59 \cdot 10^{-4}-2.236 \cdot 10^{-3} \text{ mmol/l}$) su postavljena tako da se slažu sa opsegom koncentracija koji je korišćen u kinetičkim ispitivanjima sinteze GOS u šaržnom sistemu (Poglavlje 2). Ograničenja su data modelom kaskade prikazanim jednačinama 4.1-4.3, uz upotrebu korelacije broj 5 (tabela 4.3) koja definiše broj sudova u nizu N , a shodno protocima oscilatornog i normalnog toka (R_{eo} i R_{en}). U optimizacijama su korišćeni korigovani kinetički modeli E1 i E2. Granice za protoke Q_{in} i Q_r su postavljeni u širokom opsegu, od jako malih vrednosti (bliskih nuli), do onih velikih koji su korišćeni za određivanje korelacije za N .

Izvršen je veći broj optimizacija uz upotrebu pet funkcija cilja, a u tezi su prikazani samo reprezentativni rezultati za izabrane dve funkcije cilja definisane izrazima:

$$Fobj_1 = X \cdot Y_{GOS/Lak} \cdot \frac{Q_{in}}{V} \quad (4.25)$$

$$Fobj_2 = X \cdot Y_{GOS/Enz} \cdot \frac{Q_{in}}{V} \quad (4.26)$$

pri čemu je X konverzija laktoze, $Y_{GOS/Lak}$ prinos GOS računat na ulaznu koncentraciju laktoze, a $Y_{GOS/Enz}$ prinos GOS računat na ulaznu koncentraciju enzima, V je zapremina reaktora, a Q_{in} ulazni protok. Jednačine za konverziju laktoze i prinos GOS su dalje prikazane:

$$X = (C_{in,L} - C_{out,L}) \cdot 100 / C_{in,L} \quad (4.27)$$

$$Y_{GOS/Lak} = C_{GOS} / C_{in,L} \cdot 100 \quad (4.28)$$

$$Y_{GOS/Enz} = C_{GOS} / C_{in,E} \cdot 100 \quad (4.29)$$

Obe funkcije cilja su definisane tako da daju rešenje sa maksimalnom produktivnošću GOS (proizvod ulaznog protoka Q_{in} i prinosa Y) u reaktoru date (fiksirane) zapremine, uz maksimalnu moguću konverziju laktoze (umnožitelj). Razlika između funkcija cilja je ta što F_{obj2} uzima u obzir potrošnju enzima, jer je prinos Y dat po koncentraciji enzima. Treba napomenuti da funkcije F_{obj1} i F_{obj2} imaju iste jedinice (1/s), ali da nisu direktno uporedive, jer je koncentracija enzima u mM značajno manja od koncentracije GOS i laktoze.

U optimizacijama su korišćene kao početne pretpostavke maksimalne ulazne koncentracije laktoze $C_{in,L} = 1235 \text{ mM}$ i odsustva recikla $Q_R = 0.0001 \text{ l/min}$, jer su ove vrednosti očekivane iz prethodnih analiza. Međutim, u više optimizacija ove vrednosti su varirane, kako bi se testiralo moguće postojanje drugog optimuma (lokalni minimum). Za svaki od ova dva parametra definisano je po nekoliko vrednosti, te su optimizacije izvršene za sve kombinacije početnih pretpostavki. Optimizacija je izvedena u paketu gPROMS, a način zadavanja optimizacionog problema i metode koje koristi ovaj softver su prikazane u delu 4.2.2. Rezultati optimizacija dobijeni sa različitim početnim pretpostavkama su se slagali u potpunosti. Rezultati optimizacija su predstavljani prema odabranoj funkciji cilja za dva modela E1 i E2 u tabeli 4.4.

Tabela 4.4. Rezultati optimizacija za F_{obj1} i F_{obj2} .

Parametri	E1 F_{obj1}	E1 F_{obj2}	E2 F_{obj1}	E2 F_{obj2}
$C_{in,L}$ [mM]	1235	1235	1235	1235
$C_{E,in} \cdot 10^3$ [mM]	2,236	2,21	2,236	1,044
Q_{in} [ml/min]	41,5	41,5	119,9	68,3
FR [%]	0	0	0	0
F_{obj} [1/s]	38,9	21,5	148,8	82,2
C_{optGOS} [mM]	123,6	122,9	143,7	130,8
τ_{in} [min]	7,02	7,02	2,43	4,27
N	9,0	9,0	21,0	13,0
X [%]	27,3	27,1	31,1	28,0
Y [%]	10,0	9,95	11,6	10,6
P [mmol/min]	5,13	5,10	17,2	8,93

Iz tabele 4.4 se može zaključiti da je sve eksperimente potrebno izvoditi sa maksimalnom koncentracijom laktoze od 1235 mM, što je bilo očekivano na osnovu kinetičkih ispitivanja (Poglavlje 2). Takođe, ono što je i optimizacijom potvrđeno je da za datu dužinu reaktora od 4 m, nije potrebno uvođenje struje recikla, reakcija se odvija relativno brzo, a da je mešanje zadovoljavajuće i za manje protoke.

Za enzim E1 dobijeni su vrlo slični rezultati za F_{obj1} i F_{obj2} , što ukazuje da je za manje aktivan enzim, dominantan član proizvodnosti GOS u odnosu na član koji smanjuje potrošnju enzima. Rezultati se dobro slažu sa onim dobijenim u eksperimentima gde je korišćen E1 - vrednosti su između onih dobijenih u eksperimentu 2 i eksperimentu 4 (vidi tabelu 3.9). Optimizacija povećava proizvodnost GOS povećanjem protoka kroz sistem (manje vreme zadržavanja), dok koncentracija GOS ostaje na nešto nižim vrednostima u odnosu na maksimalno moguće, koje su skoro postignute u eksperimentu 4 ($C_{GOS} = 190 \text{ mM}$). Koncentracija enzima E1 za obe funkcije cilja je na maksimalnim vrednostima (2 g/l).

Za aktivniji enzim E2, ako se posmatra F_{obj1} , velika produktivnost GOS-a se ostvaruje (17,2 mmol/min) za kratko vreme zadržavanja od samo 2,4 min. Optimizacija pokazuje da treba povećati ulazni protok na čak 119,9 ml/min što znatno skraćuje vreme zadržavanja, a postignuta koncentracija GOS-a je i dalje relativno velika i iznosi 143,7 mM. Takođe, kako bi se ostvarila ovako velika produktivnost neophodno je koristiti maksimalnu koncentraciju enzima od 2 g/l (0,002236 mmol/l). Ovakvi uslovi nisu bili zadati u eksperimentima sa E2, jer je u eksperimentu 5 korišćeno mnogo duže vreme zadržavanja od 16,6 min (manji ulazni protok) i manja koncentracija enzima od 1,5 g/l, pa je dobijena mnogo manja produktivnost od 3,58 mmol GOS/min, iako je postignuta maksimalno moguća koncentracija GOS od 204 mM, kao i konverzija laktoze od 52,5 % (tabela 3.9). Slično kao i kod E1, veća produktivnost se postiže povećanjem protoka, dok koncentracija (prinos) GOS i konverzija laktoze ostaju na nižim vrednostima. Treba napomenuti da ukoliko bi se razmatrali troškovi separacije nakon reakcije, da bi moguće optimalno ukupno rešenje više težilo uslovima iz eksperimenta 5 (veća koncentracija GOS i konverzija laktoze). U tom slučaju funkciju cilja bi trebalo preformulisati. Rezultat za E2 i F_{obj1} bi poželjno bilo potvrditi u eksperimentu, sa dobijenim uslovima kratkog vremena zadržavanja, te velike produktivnosti.

Funkcija cilja F_{obj2} pokazuje da se ulazna koncentracija enzima E2 može smanjiti na 0,001044 mmol/l, odnosno 0,93 g/l, što je duplo manja koncentracija u odnosu na onu dobijenu pomoću F_{obj1} . Ako se uzme u obzir i manji protok na ulazu (68,3 ml/min) za ovaj slučaj se dobija potrošnja enzima koja je za 73,2 % manja od one za F_{obj1} . Za ovaj slučaj ostvaruje se nešto niža koncentracija GOS-a od 130,8 mM za vreme zadržavanja od 4,27 min. Stoga je produktivnost GOS-a niža, 8,93 mmol/min, što je 52 % vrednosti od one za F_{obj1} . Ovo jasno ukazuje na kompromisno rešenje, u slučaju kada je potrošnja enzima značajni trošak. Ako se rezultat za F_{obj2} uporedi sa eksperimentima izvedenim sa E2, može se zaključiti da se u odnosu na eksperiment 5 može dodatno smanjiti koncentracija enzima, a još više smanjiti vreme zadržavanja (skoro 4 puta). Eksperiment 6 je izveden sa drastično manjom koncentracijom enzima od 0,3 g/l. U tom slučaju je dobijen sličan prinos GOS i konverzija laktoze kao u optimizaciji sa F_{obj2} , ali u dosta dužem vremenu zadržavanja od 16,6 min, koji pak daje malu produktivost GOS od svega 2,46 mmol GOS / min. Ovo pokazuje da, za slučaj da je trošak za enzim najznačajniji faktor, procesni uslovi se mogu postaviti slično kao u eksperimentu 6, ali po cenu niske produktivnosti GOS. Svi rezultati uazuju da je kompromisno rešenje (te ukupni optimum) dobijeno sa aktivnijim enzimom E2 i F_{obj2} (poslednja kolona u tabeli 4.4).

Ovo ispitivanje je pokazalo da optimizacija uslova procesa može da pomogne kod odabira parametara tako da se za optimalno vreme zadržavanja i efikasno mešanje u SORP postigne velika produktivnost GOS-a, uz optimalnu potrošnju enzima.

5. ZAKLJUČAK

Proizvodnja prebiotika i njen osnovni korak – enzimska sinteza, danas se odvija u šaržnim sistemima. U ovoj tezi je potvrđen dokaz koncepta da se proces proizvodnje prebiotika može prevesti sa šaržnog na kontinualni, uz povećanje produktivnosti (vidi sliku 3.38). U eksperimentima je dobijen vrlo dobar prinos GOS-a korišćenjem inovativnog spiralnog reaktora sa pregradama (SORP), čiji su dizajn, 3D štampa i ispitavanje strujanja prikazani u ovoj tezi. Bilo je potrebno osmisliti konfiguraciju kontinualnog reaktora koji će zadovoljiti uslove reakcije sinteze GOS-a i definisati optimalne parametre rada reaktora.

U ovoj tezi je prvo ispitana i prikazana detaljna kinetička analiza reakcije dobijanja GOS korišćenjem enzima β -galaktozidaze iz *A. Orizae* u laboratorijskom šaržnom sistemu. Predloženo je nekoliko sličnih mikrokinetičkih modela, koji sadrže između 5 i 8 kinetičkih parametara, a koji su određeni na osnovu eksperimentalnih podataka, korišćenjem hibridnog genetskog algoritma (GA). Pokazalo se da predloženi kinetički modeli 1 i 2 daju najbolje rezultate u pogledu vrednosti srednjih grešaka u odnosu na eksperimentalne podatke. U prvom koraku, enzim (E) i laktoza (L) formiraju kompleks enzim-galaktoza (EGAL) i glukozu (GLU), gde EGAL služi kao prekursor za druge korake. U drugom koraku, kompleks enzim-galaktoza se razlaže na enzim i galaktozu (GAL). U trećem koraku kompleks EGAL reaguje sa laktozom i formira trisaharide (GOS3). U poslednjem, četvrtom koraku, EGAL stupa u interakciju sa GOS3 da bi se formirali tetrasaharidi (GOS4) i ostali viši GOSovi. Model 2 je izabran za dalju analizu, koji pretpostavlja da je drugi korak (razgradnja kompleksa enzim-galaktoza) nepovratan i samim tim ima jednu kinetičku konstantu, tj. parametar manje za određivanje. Izbor modela 2 dodatno je opravdan činjenicom da su izračunate brzine reakcija za model 1 pokazale da se povratna reakcija, korak razlaganje EGAL kompleksa ($EGAL \leftrightarrow E + GAL$), može zanemariti. Ovaj model je dao veoma dobro kvantitativno i kvalitativno slaganje profila koncentracija komponenti u vremenu za čitav niz testiranih uslova. Kinetika formiranja GOS je veoma dobro predviđena korišćenjem predloženog modela, uključujući početne brzine formiranja GOS, maksimalne vrednosti koncentracija GOS, a zatim i njegovo smanjenje usled reverzibilnih reakcija. Detaljno je analiziran efekat dva glavna parametra procesa, početne koncentracije laktoze i enzima. Pokazalo se da maksimalna koncentracija GOS zavisi od početne koncentracije laktoze (raste sa porastom laktoze), dok koncentracija enzima određuje vreme u kome se taj maksimum postiže, kao i brzinu razgradnje GOS. Analiza između dve kompetitivne reakcije - transgalaktozilacije i hidrolize laktoze, potvrdila je pozitivan efekat povećanja koncentracije laktoze na afinitet transgalaktozilacije.

Zatim je prikazana detaljna kinetička analiza sinteze FOS korišćenjem enzima Pectinex® Ultra SP'L iz *A. Aculeatus*, takođe u laboratorijskom šaržnom sistemu. S obzirom na to da struktura i sinteza FOS ima sličnosti sa GOS, predložen je analogni mehanizam nastajanja. Izvedeno je nekoliko sličnih mikrokinetičkih modela, čiji su kinetički parametri određeni na analogan način kao i za GOS. Model, koji je dao najbolje rezultate u pogledu vrednosti srednjih grešaka u odnosu na eksperimentalne tačke, sastoji se od četiri reakcije. U prvoj reakciji se saharoza (Sah) vezuje za prazno mesto na enzimu (E), pri čemu nastaje kompleks enzim-fruktoza (EF) uz oslobađanje molekula glukoze (G). Pretpostavljeno je da je ova reakcija povratna, tako da slobodna glukoza i kompleks enzim-fruktoza mogu da reaguju uz nastajanje molekula saharoze i oslobađanja mesta na enzimu. Drugi korak podrazumeva paralelnu reakciju hidrolize u kojoj nastaju slobodan molekul fruktoze (F) i slobodan enzim (E) iz formiranog kompleksa EF. U trećoj, takođe povratnoj reakciji, kompleks enzim-fruktoza reaguje sa molekulom saharoze pri čemu nastaje molekul 1-kestoze (GF2) uz oslobađanje aktivnog mesta na enzimu. U poslednjoj reakciji molekul GF2 reaguje sa kompleksom

enzim-fruktoza i formira molekul nistoze (GF3) i slobodan enzim, što je analizom utvrđeno da je nepovratan korak. Predloženi kinetički model, označen sa H, ima veoma dobro kvantitativno i kvalitativno slaganje profila koncentracija komponenti za širok opseg testiranih uslova. Zatim je analiziran efekat dva glavna parametra procesa, početne koncentracije saharoze i enzima. Modelom je dobro predviđen uticaj oba parametra na brzinu nastajanja FOS i konverziju saharoze, uključujući početne (velike) brzine formiranja FOS, maksimalnu koncentraciju FOS i njeno naknadno smanjenje usled dominacije reakcije hidrolize. Pokazano je, slično kao i kod sinteze GOS, da početna koncentracija saharoze u velikoj meri utiče na maksimalni nivo koncentracije FOS, ali da koncentracija enzima utiče na vremenski period u kome se taj maksimum postiže, kao i brzinu razgradnje FOS. Analiza između dve kompetitivne reakcije, transfruktozilacije i hidrolize saharoze, potvrdila je pozitivan efekat povećanja koncentracije saharoze na afinitet transfruktozilacije. Predloženi kinetički model koji je jednostavan i lak za primenu u praksi.

Rezultati eksperimenata izvedenih u SORP (dužine 4 m, prečnika 10 mm, sa 124 segmenta između pregrada) su potvrdili uspešnost sistema za kontinualnu proizvodnju GOS-a, uz postizanje visokih koncentracija željenog proizvoda (od 100 mM do 200 mM GOS u zavisnosti od uslova eksperimenta). Potvrđeni su kinetički nalazi da veća koncentracija enzima daje sličnu koncentraciju GOS-a u stacionarnom stanju, jedino se vrednost proizvoda dostiže ranije. U svim eksperimentima je korišćena maksimalno moguća koncentracija laktoze od 1235 mM (400 g/l), a u skladu sa prethodnim kinetičkim ispitavanjem.

Sa povećanjem protoka kroz SORP, mešanje se intenzivira, a vreme zadržavanja se skraćuje, te se stacionarne koncentracije laktoze i proizvoda dostižu brže. Pokazano je da je potrebna približno dvostruka vrednost vremena zadržavanja do uspostavljanja stacionarnih koncentracija u svim eksperimentima izvedenim u SORP. Eksperimentalni rezultati sa reakcijom takođe pokazuju da je mešanje dobro, jer su koncentracione krive strme, a naročito za uslove većeg protoka.

Pored toga, nezavisni eksperimenti sa obeleženom supstancom su takođe potvrdili dobro mešanje u SORP, te da je strujanje tečnosti u SORP relativno blisko klipnom, uz određena odstupanja koja zavise od protoka oscilatornog, kao i normalnog (nesocilatornog) toka. U radu je pokazano da model kaskade idealno izmešanih sudova u nizu dobro opisuje strujanje, uz adekvatno određen broj sudova N . Na osnovu eksperimentalno određenih N , predložena je bezdimenziona korelacija koja daje vezu između virtuelnog broja sudova N i Rejnoldsovih brojeva oscilatornog (Re_o) i normalnog toka (Re_n). Tako je postavljen ukupan dinamički model, koji koristi prethodno razvijen model kinetike (opisan iznad i u poglavlju 2) sa korekcijom za aktivnost enzima (E1 i E2), uz model kaskade sa brojem sudova N koji se unapred određuje pomoću predložene korelacije. Ovaj model može predvideti dinamičko ponašanje sistema i korišćen je u optimizacijama, za određivanje optimalnih uslova rada. Dinamički model SORP je validiran poređenjem sa eksperimentima i pokazano je da daje prihvatljivo dobro slaganje sa eksperimentalno određenim koncentracijama laktoze i svih proizvoda.

Kada posmatramo eksperimente u kojima je korišćen recikl, može se zaključiti da je uloga recikla u tome da intenzivira mešanje, jer se recirkulacijom povećava protok kroz reaktor, čak i pri vrlo malim ulaznim (te izlaznim) protocima. Na taj način se mogu obezbediti velika vremena zadržavanja, što je povoljno za spore biohemijske reakcije, uz dobro mešanje u sistemu. Međutim, sa povećanjem protoka recikla, ponašanje sistema se približava ponašanju jednog protočnog reaktora sa idealnim mešanjem (PRIM), jer veći recikl smanjuje koncentraciju laktoze, te se prinos GOS u izlaznoj struji smanjuje u odnosu na maksimalno moguću (koji se postiže u šaržnom ili idealno klipnom reaktoru). Tako da se upotrebom recikla vreme zadržavanja značajno može povećati, ali se produktivnost GOS mnogostruko smanjuje u odnosu na eksperiment broj 2, koji ima sličnu vrednost ukupnog protoka, no bez recikla. Ovaj rezultat potvrđuje da recikl nije neophodan, u slučaju da je dužina reaktora 4 m (koja je korišćena u tezi). Za kraće reaktore uvođenje recikla bi moglo imati opravdanosti.

U eksperimentima je analizirano i ponašanje enzima u SORP. Enzim se u toku reakcije ne troši, pa bi nakon uspostavljanja stacionarnog stanja, ulazna koncentracija trebalo da bude jednaka izlaznoj. Na osnovu rezultata eksperimenta u kome je ulazio samo enzim koncentracije 2 mg/ml (eksperiment bez reakcije), a na kraju eksperimenta od 60 min je dobijena koncentracija enzima od 1,7 mg/ml. Stoga je zaključeno da deo enzima ostaje u reaktoru. Rezultati ovog i ostalih izvedenih eksperimenata ukazuju da je moguće da se na zidove reaktora vezuje enzim, i to više u prvoj polovini reaktora, koji se zatim tokom vremena polako oslobađa. Analiza materijalnog bilansa enzima, kao i koncentracioni profili prikazani u delu 3.4, potvrđuju razliku ulazne i izlazne mase enzima, odnosno da se određena, a ne mala, količina enzima zadržava u reaktoru. Veće zadržavanje enzima je uočeno za eksperimente sa reciklom i u prvim eksperimentima (sa E1 enzimom).

Za eksperimente bez recikla (eksperimente 2, 4 i 5) prelazak sa šaržnog na kontinualni način proizvodnje pokazao je bolje rezultate u vrednostima konverzije laktoze, selektivnosti i proizvodnosti. Kada su rezultati u SORP upoređeni sa onim u šaržnom reaktoru (videti sliku 3.36), koji su izvedeni u staklenom sudu, gde nema imobilizacije, pokazano je da SORP daje bolje rezultate (veće prinose GOS) za ista reakciona vremena i nominalne koncentracije enzima (ulazna koncentracija enzima u SORP i šaržni). To može da ukaže da je enzim imobilisan na zidove SORP takođe aktivan. Prinos GOS po enzimom je veći i za preko 50% u SORP u odnosu na šaržni, u istom reakcionom vremenu. Ipak, u simulacijama i optimizacijama je korišćena nominalna koncentracija enzima, jer nema pouzdanih podataka da li je i koliko vezanog enzima aktivno u reakciji.

Numerička optimizacija je dala optimalne ulazne protoke i ulazne koncentracije enzima. Korišćene su dve funkcije cilja, jedna koja daje maksimalnu proizvodnost GOS u datoj zapremini u odnosu na konverziju laktoze, i druga koja slično daje maksimalnu proizvodnost GOS, ali dodatno u odnosu na koncentraciju enzima. U oba slučaja optimizacija je potvrdila da nije potrebno uvoditi recikl, kao i da treba koristiti maksimalno moguću koncentraciju laktoze. Za enzim E2 (aktivniji) optimizacija daje veliku produktivnost GOS od 17 mmol/min u kratkom vremenu zadržavanja od svega 2,4 min i uz upotrebu maksimalne koncentracije enzima. Druga funkcija cilja daje manju produktivnost GOS od oko 9 mmol/min u dužem vremenu zadržavanja od oko 4,3 min, ali uz uštedu enzima, jer je koncentracija duplo manja, a potrošnja (protok) enzima za 73,2 % manja u odnosu na prvu funkciju cilja. Eksperimentalni rezultati se dosta dobro slažu sa onima dobijenim u optimizacijama, s tim što je preporučljivo izvesti dodatne eksperimente sa uslovima koji su dobijeni pomoću druge funkcije cilje i E2 (gore diskutovani rezultati).

Na osnovu prikazanih rezultata, SORP se pokazao kao atraktivno rešenje za intenzifikaciju procesa proizvodnje GOS-a u kontinualnom režimu rada. Poželjno je da se u dodatnim ispitivanjima detaljnije ispita zadržavanje enzima na zidove 3D štampanog SORP od kompozitnog polimera. U slučaju potvrde aktivnosti vezanog enzima, kontrolisana imobilizacija može otvoriti nove mogućnosti za intenzifikaciju procesa GOS, uz dodatnu uštedu enzima.

LITERATURA

1. Adlercreutz, P. Comparison of lipases and glycoside hydrolases as catalysts in synthesis reactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 513 - 519, 2017
2. Aimacaña C. M. C., Numerička optimizacija kontinualnog intenzifikovanog reaktora za proizvodnju galaktooligosaharida, Master rad, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2022
3. Albayrak, N.; Yang, S. T. Production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae* beta-galactosidase immobilized on cotton cloth, *Biotechnology and Bioengineering*, 77, 8 – 19, 2002
4. Alvarado-Huallanco M.B., F. Maugeri-Filho, Kinetics and modeling of fructooligosaccharide synthesis by immobilized fructosyltransferase from *Rhodotorula* sp, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85, 1654 - 1662, 2010
5. Antošová M., M. Polakovič, Fructosyltransferases: The Enzymes Catalyzing Production of Fructooligosaccharides, *Chemical Papers*, 55(6), 350 – 358, 2001
6. Bianchi P., J. D. Williams, C. O. Kappe, Oscillatory flow reactors for synthetic chemistry applications, *Journal of Flow Chemistry*, 10, 475 – 490, 2020
7. Bogdanović M., Određivanje parametara kintičkog modela enzimske transgalaktolizacije laktoze, Završni rad, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2019
8. Boon M.A., A.E.M. Janssen, K. van't Riet, Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides, *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 271 - 281, 2000
9. Brownawell A. M., W. Caers, G. R. Gibson, C. W. C. Kendal, K.D. Lewis, Y. Ringel, J. L. Slavin, Prebiotics and Health Benefits of Fiber: Current Regulatory Status, Future Research and Goals, *The Journal of Nutrition*, 142(5), 962 - 974, 2012
10. Bukur D.B., M. Mandić, B. Todić, N. Nikačević, Pore diffusion effects on catalyst effectiveness and selectivity of cobalt based Fischer-Tropsch catalyst, *Catalysis Today* 343, 146 – 155, 2020
11. Caicedo L., E. Silva, O. Sanchez, Semibatch and continuous fructooligosaccharides production by *Aspergillus* sp. N74 in a mechanically agitated airlift reactor, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84, 650 – 656, 2008
12. Cao T., M. Pázmándi, I. Galambos, Z. Kovács, Continuous Production of Galacto-Oligosaccharides by an Enzyme Membrane Reactor Utilizing Free Enzymes, *Membranes*, 10, 203, 2020
13. Cajnko, M. M.; Oblak, J.; Grilc, M.; Likozar, B. Enzymatic bioconversion process of lignin: mechanisms, reactions and kinetics, *Bioresource Technology*, 340, 125655, 2021
14. Carevic M., M. Corovic, M. Mihailovic, K. Banjanac, A. Milisavljevic, D. Velickovic, D. Bezbradica, Galacto-oligosaccharide synthesis using chemically modified β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* immobilised onto macroporous amino resin, *International Dairy Journal*, 54, 50 - 57, 2016
15. Carević M., M. Vukašinović Sekulić, K. Banjanac, A. Milivojević, M. Čorović, D. Bezbradica, Produkcija i karakterizacija β -galaktozidaze iz *Lactobacillus acidophilus*, *Advanced Technologies*, 6(1), 5- 13, 2017
16. Carević M., Proizvodnja i imobilizacija mikrobnih β -galaktozidaza za primenu u transgalaktozacionim reakcijama, Doktorska disertacija, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2016

17. Cinar K., G. Gunes, H. Ali Gulec, Enzymatic synthesis of prebiotic carbohydrates from lactose: Kinetics and optimization of transgalactosylation activity of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*, *Journal of Food Process Engineering*, e13435, 2020
18. Córdova A., C. Astudillo, C. Vera, C. Guerrero, A. Illanes, Performance of an ultrafiltration membrane bioreactor (UF-MBR) as a processing strategy for the synthesis of galacto-oligosaccharides at high substrate concentrations, *Journal of Biotechnology*, 223, 26 – 35, 2016
19. Crittenden R., M. J. Playne, *Modifying the Human Intestinal Microbiota with Prebiotics*, *Gastrointestinal Microbiology*, 2006
20. Davani-Davari D., M. Negahdaripour, I. Karimzadeh Mostafa Seifan, M. Mohkam, S. J. Masoumi, A. Berenjian, Y. Ghasemi, Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications, *Probiotics and Functional Foods*, 8(3), 92, 2019
21. Di Serio M., C. Maturo, E. De Alteriis, P. Parascandola, R. Tesser, E. Santacesaria, Lactose hydrolysis by immobilized - galactosidase: the effect of the supports and the kinetics, *Catalysis Today*, 79 - 80, 333–339, 2003
22. Duan K.J., J.S. Chen, D.C. Sheu, Kinetic studies and mathematical model for enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose, *Enzyme and Microbial Technology*, 16, 334 - 339, 1994
23. Ebrahimi M., L. Placido, L. Engel, K. Shams Ashaghi, P. Czermak, A novel ceramic membrane reactor system for the continuous enzymatic synthesis of oligosaccharides, *Desalination*, 250, 1105 – 1108, 2010
24. Fogler H. S., *Elements of Chemical Reaction Engineering*, Prentice-Hall of India, 1999
25. Gao X., J. Wua, D. Wua, Rational design of the beta-galactosidase from *Aspergillus oryzae* to improve galactooligosaccharide production. *Food Chemistry*, 286, 362 - 367, 2019
26. Glandt E. D., M. T. Klein, T. F. Edgar, *Optimization of chemical processes*, McGraw Hill, New York, 2001
27. Gonzalez-Catano F., L. Tovar-Castro, E. Castano-Tostado, C. Regalado-Gonzalez, B. Garcia-Almendarez, A. Cardador-Martínez, S. Amaya-Llano, Improvement of Covalent Immobilization Procedure of β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for Galactooligosaccharides Production: Modeling and Kinetic Study, *Biotechnology Progress*, 33 (6), 1568 - 1578, 2017
28. González-Delgado I., M.J. López-Muñoz, G. Morales, Y. Segura, Optimisation of the synthesis of high galacto-oligosaccharides (GOS) from lactose with β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*, *International Dairy Journal*, 61, 211 - 219, 2016
29. Gosling A., G.W. Stevens, A.R. Barber, S.E. Kentish, S.L. Gras, 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*, 59 (7), 3366 - 3372, 2011
30. gPROMS Model Builder Guide, Process Systems Enterprise Limited, 2012
31. 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*, 72, 206 – 212, 2011
32. Guio F., L.D. Rugeles, S.E. Rojas, M.P. Palomino, M.C. Camargo, O.F. Sánchez, Kinetic Modeling of Fructooligosaccharide Production Using *Aspergillus oryzae* N74, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167, 142 – 163, 2012
33. Gupta J., M. Agarwal, A. K. Dalai, Intensified transesterification of mixture of edible and nonedible oils in reverse flow helical coil reactor for biodiesel production, *Renewable Energy*, 134, 509 – 525, 2018
34. Harvey A.P., M.R. Mackley, P. Stonestreet, Operation and optimization of an oscillatory flow continuous reactor, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 40, 5371 – 5377, 2001

35. Ibrahim O. O., Functional Oligosaccharide: Chemical Structure, Manufacturing, Health Benefits, Applications and Regulations, *Journal of Food Chemistry & Nanotechnology*, 4(4), 65 - 76, 2018
36. Ikwebe J., A. P Harvey, Enzymatic saccharification of cellulose: a study of mixing and agitation in an oscillatory baffled reactor and a stirred tank reactor, *Biofuels*, 6, 203 – 208, 2015
37. Jankovic T., Razvoj kinetičkog modela i optimizacija kontinualnog intenzifikovanog reaktora za proizvodnju prebiotika, Master rad, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2022
38. Jenab E., M. Omidghane, P. Mussone, D.H. Armada, J. Cartmell, C. Montemagno, Enzymatic conversion of lactose into galacto-oligosaccharides: The effect of process parameters, kinetics, foam architecture, and product characterization, *Journal of Food Engineering*, 222, 63 - 72, 2018
39. Jung K.H., J.W. Yun, K.R. Kang, J.Y. Lim, J.H. Lee, Mathematical model for enzymatic production of fructo-oligosaccharides from sucrose, *Enzyme and Microbial Technology*, 11, 491 - 494, 1989
40. Kashyap R., T. Palai, P.K. Bhattacharya, Kinetics and model development for enzymatic synthesis of fructo-oligosaccharides using fructosyltransferase, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38, 2417 - 2426, 2015
41. Khandekar D.C., T. Palai, A. Agarwal, P.K. Bhattacharya, Kinetics of sucrose conversion to fructo-oligosaccharides using enzyme (invertase) under free condition, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37, 2529 – 2537, 2014
42. Kim C.S., E.S. Ji, D.K. Oh, A new kinetic model of recombinant β - galactosidase from *Kluyveromyces lactis* for both hydrolysis and transgalactosylation reactions, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 316, 738 - 473, 2004a
43. Kumar A., I. A. Udugama, C. L. Gargalo, and K. V Gernaey, Why Is Batch Processing Still Dominating the Biologics Landscape? Towards an Integrated Continuous Bioprocessing Alternative, *Processes*, 8(12), 2020
44. Lee W-C., C-J. Chiang, P-Y. Tsai, Kinetic Modeling of Fructo-oligosaccharide Production Catalyzed by Immobilized β -Fructofuranosidase, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 38, 2564 - 2570, 1999
45. Levenspiel O., *Chemical Reaction Engineering*, John Wiley & Sons, 1999
46. Ljujić P., Eksperimentalna analiza i validacija modela sinteze galaktooligosaharida u hibridnom heliks reaktoru sa oscilatornim tokom, Završni master rad, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2023
47. Lorenzoni S.G.A., L. F. Aydos, M. P. Klein, M. A.Z. Ayub, R. C. Rodrigues, P. F. Hertz, Continuous production of fructooligosaccharides and invert sugar by chitosan immobilized enzymes: Comparison between in fluidized and packed bed reactors, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 111, 51 – 55, 2015
48. Louis P., H.J. Flint, C. Michel, How to manipulate the microbiota: Prebiotics, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp 119 - 142, 2016
49. Luo J. Z., G. W. Chu, Y. Luo, H. K. Zou, G. J. Li, J. F. Chen, Experimental investigations of liquid-liquid dispersion in a novel helical tube reactor, *Chemical Engineering Process*, 117, 162 – 170, 2017
50. Luo J. Z., Y. Luo, G. W. Chu, M. Arowo, Y. Xiang, B. C. Sun, J. F. Chen, Micromixing efficiency of a novel helical tubular reactor: CFD prediction and experimental characterization, *Chemical Engineering*, 155, 386 – 396, 2016
51. Macfarlane GT, Steed H, Macfarlane S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics *Journal of Applied Microbiology*, 104(2), 305 – 344, 2008
52. Mandić M., B. Todić, L. Živanić, N. Nikačević, D.B. Bukur, Effects of catalyst activity, particle size and shape, and process conditions on catalyst effectiveness and methane

- selectivity for Fischer–Tropsch reaction: a modeling study, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 56(10), 2733 – 2745, 2017
53. Markowiak P., K. Slizewska, Effects of Prebiotics, Prebiotics and Synbiotics on Human Health, *Nutrients*, 9(9), 1021, 2017
54. Martínez-Villaluenga, C.; Cardelle-Cobas, A.; Corzo, N.; Olano, A.; Villamiel, M. Optimization of conditions for galactooligosaccharide synthesis during lactose hydrolysis by β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozym 3000 L HP G), *Food Chemistry*, 107, 258 - 264, 2008
55. Martins G. N., M. M. Ureta, E. E. Tymczynszyn, P. C. Castilho, A. Gomez-Zavaglia, Technological Aspects of the Production of Fructo and Galacto-Oligosaccharides, *Enzymatic Synthesis and Hydrolysis, Frontiers in Nutrition*, 6, 1 - 24, 2019
56. McDonough J. R., A. N. Phan, A. P. Harvey, Rapid process development using oscillatory baffled mesoreactors – A state-of-the-art review, *Chemical Engineering Journal*, 265, 110 – 121, 2015
57. McDonough J. R., S. Murta, R. Law, A. P. Harvez, Oscillatory fluid motion unlocks plug flow operation in helical tube reactors at lower Reynolds numbers ($Re < 10$), *Chemical Engineering*, 358, 643 – 657, 2018
58. McGlone T., N. E. B. Briggs, C. A. Clark, C. J. Brown, J. Sefcik, A. J. Florence, Oscillatory Flow Reactors (OFRs) for Continuous Manufacturing and Crystallization, *Organic Process Research & Development*, 19(9), 1186 - 1202, 2015
59. Michel M., R. Rodríguez-Jasso, C. Aguilar, S. Gonzalez-Herrera, A. Flores- Gallegos, R. Rodríguez-Herrera, Fructosyltransferase Sources, Production, and Applications for Prebiotics Production, *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*, Chapter 9, pp 169 - 189, 2016
60. Mirilo Đ., 3D štampa novih konfiguracija cevnih reaktora sa oscilatornim tokom za intenzifikaciju procesa proizvodnje galaktooligosaharida, Završni rad, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2021
61. Mirilo Đ., Projektovanje, konstruisanje i puštanje u rad heliks reaktora sa pregradama za kontinualnu proizvodnju galaktooligosaharida, Završni master rad, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2022
62. Mozaffar Z., K. Nakanishi, R. Matsuno, Continuous production of galactooligosaccharides from lactose using immobilized β galactosidase from *Bacillus circulans*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 25, 224 - 228, 1986
63. Mueller I., G. Kiedorf, E. Runne, A. Seidel-Morgenstern, C. Hamel, Synthesis, kinetic analysis and modelling of galacto-oligosaccharides formation, *Chemical Engineering Research and Design*, 130, 154 - 166, 2018
64. Mussatto SI, Mancilha I. Non-digestible oligosaccharides: a review. *Carbohydrate Polymers*, 68(3), 587 – 597, 2007.
65. Ni X., M.R. Mackley, A.P. Harvey, P. Stonestreet, M.H.I. Baird, N.V. Rama Rao, Mixing through oscillations and pulsations - a guide to achieving process enhancements in the chemical and process industries, *Chemical Engineering Research and Design*, 81(A), 373 – 383, 2003.
66. Nikačević N., A.E.M. Huesman, P.M.J. Van den Hof, A. I. Stankiewicz, Opportunities and challenges for process control in process intensification, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 52, 1 – 15, 2012
67. Nikačević N., B. Todić, M. Mandić, M. Petkovska, D.B. Bukur, Optimization of forced periodic operations in milli-scale fixed bed reactor for Fischer-Tropsch synthesis, *Catalysis Today*, 343, 156 – 164, 2020
68. Nikačević N., L. Thielen, A. Twerda, P. M. J. Van den Hof, CFD analysis and flow model reduction for surfactant production in helix reactor, *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 21, 35 – 44, 2015

69. Oberlintner, A.; Likožar, B.; Novak, U. Hydrophobic functionalization reactions of structured cellulose nanomaterials: Mechanisms, kinetics and in silico multi-scale models, *Carbohydrate Polymers*, 259, 117742, 2021
70. Palai T., P.K. Bhattacharya, Kinetics of lactose conversion to galactooligosaccharides by β -galactosidase immobilized on PVDF membrane, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 115, 668 – 673, 2013
71. Palai T., S. Mitra, P.K. Bhattacharya, Kinetics and design relation for enzymatic conversion of lactose into galacto-oligosaccharides using commercial grade β –galactosidase, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114 (4), 418 - 423, 2012
72. Paul E. L., V. A. Atiemo-Obeng, S. M. Kresta, *Handbook of industrial mixing*, Science and Practice, John Wiley & Sons, 2004
73. Petzelbauer I., B. Splechtna, B. Nidetzky, Development of an Ultrahigh-Temperature Process for the Enzymatic Hydrolysis of Lactose. III. Utilization of Two Thermostable β -Glycosidases in a Continuous Ultrafiltration Membrane Reactor and Galacto-Oligosaccharide Formation Under Steady-State Conditions, *Biotechnology and Bioengineering*, 77(4), 394 – 404, 2002
74. Pham N.H., Modeling of enzyme-catalysed processes: galactooligosaccharide formation and NAD(P)H oxidation as examples, *Bec, University of Natural Resources and Life Sciences*, 2015.
75. Phan A. N., A. Harvey, J. Lavender, Characterisation of fluid mixing in novel designs of mesoscale oscillatory baffled reactors operating at low flow rates (0.3–0.6ml/min), *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 50(30), 254 - 263, 2011
76. Pottratz I., I.Müller, C. Hamel, Potential and Scale-Up of Pore-Through-Flow Membrane Reactors for the Production of Prebiotic Galacto-Oligosaccharides with Immobilized β -Galactosidase, *Catalysts*, 12(7), 2022
77. Pravić R., B. Todić, M. Simović, D. Bezbradica, N. Nikačević, Continuous production of prebiotics using a novel 3D printed spiral oscillatory baffled reactor, 8th European Process Intensification Conference, Warsaw, Poland, 2023.
78. Pravić R., B. Todić, M. Simović, K. Banjanac, D. Bezbradica, and N. Nikacevic, Kinetic Model for Galacto-Oligosaccharide Synthesis, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 61(38), 14189 - 14198, 2022
79. Pravić R., T. Janković, C. M. C. Aimacaña, B. Todić, M. Simović, D. Bezbradica, N. Nikačević, Optimization of an intensified reactor for the continuous production of prebiotics, 14th European Congress of Chemical Engineering and 7th European Congress of Applied Biotechnology, Berlin, Germany, 2023.
80. Pravić R., T. Jankovic, M. Veljkovic, B. Todić, M. Simović, D. Bezbradica, N. Nikacevic, Micro-kinetic model of fructo-oligosaccharide synthesis for prebiotic products, *AIChE Journal*, 69(9), e18122, 2023
81. Rao S. S., *Engineering Optimization Theory and Practice*, John Wiley and Sons, 2009
82. Rios-Solis, L.; Morris, P.; Grant, C.; Odeleye, A. O. O.; Hailes, H. C.; Ward, J. M.; Dalby, P. A.; Baganz, F.; Lye, G. J. Modelling and optimisation of the one-pot, multi-enzymatic synthesis of chiral amino-alcohols based on microscale kinetic parameter determination, *Chemical Engineering Science*, 122, 360 - 372, 2015,
83. Rocha O., C. Nobre, A. Dominguez, D. Torres, N. Faria, L. Rodrigues, J.A. Teixeira, E.C. Ferreira, I.A. Rocha, Dynamical Model for the Fermentative Production of Fructooligosaccharides, in 10th International Symposium on Process Systems Engineering – PSE2009. Ed. de Brito Alves RM, do Nascimento CAO and Biscaia EC Jr, Salvador-Bahia, Brazil, pp 1827-1832, 2009
84. Rojahn, P.; Nigam, K. D. P.; Schael, F. Experimental study and kinetic modeling of continuous flow conversion of fructose to 5- (chloromethyl)furfural using micro- and millistructured coiled flow inverter, *Chemical Engineering Journal*, 450, 138243, 2022
85. Rozen A., J. Kopytowski, Experimental study of micromixing in curved tubereactors by the reactive tracer method, *Chemical Engineering Research and Design*, 160, 335 – 350, 2020

86. Sangeetha P.T., M.N. Ramesh, S.G. Prapulla, Maximization of fructooligosaccharide production by two stage continuous process and its scale up, *Journal of Food Engineering*, 68, 57 – 64, 2005
87. Sánchez-Martínez MJ, Soto-Jover S, Antolinos V, MartínezHernández GB, Lopez-Gomez A. Manufacturing of short-chain fructooligosaccharides: from laboratory to industrial scale, *Food Engineering Reviews*, 12, 149 – 172, 2020
88. Schorsch J., M. Kinnaert, R. Fekih-Salem, L. Dewasme, C.C. Castro, A.Vande Wouwer, Identification and optimal control of fructo-oligosaccharide production, *IFAC PapersOnLine*, 51(18), 678 – 683, 2018
89. Schultz G., R. Alexander, F. V. Lima, R. C. Giordano, M.A. Ribeiro, Kinetic modeling of the enzymatic synthesis of galacto-oligosaccharides: Describing galactobiose formation, *Food and Bioproducts Processing*, 127, 1 – 13, 2021
90. Sen D., A. Sarkar, S. Das, R. Chowdhury, C. Bhattacharjee, Batch Hydrolysis and Rotating Disk Membrane Bioreactor for the Production of Galacto-oligosaccharides: A Comparative Study, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 51, 10671 – 10681, 2012
91. Sharma P S., Verma, N. Agarwai, Miraculous Health Benefits of Prebiotics, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(6), 1544 - 1553, 2012
92. Shin H.-J., J.-M. Park, J.-W. Yang, Continuous production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Bullera singularis* fi-galactosidase immobilized in chitosan beads, *Process Biochemistry*, 33(8), 787 – 792, 1998
93. 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 & Therapeutics*, 29, 508 - 518, 2009
94. Slavnić D., B. Bugarski, N. Nikačević, Solids flow pattern in continuous oscillatory baffled reactor, *Chemical Engineering & Processing: Process Intensification*, 135, 108 – 119, 2019
95. Slavnić D., Dinamika strujanja tečnosti i čestica u reaktorima sa oscilatornim tokom i primena na biohemijsku reakciju uz upotrebu imobilisanih enzima, doktorska disertacija, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2020
96. Slavnic D., L. Živkovic, A. Bjelic, B. Bugarski, N. Nikacevic, Residence time distribution and Peclet number correlation for continuous oscillatory flow reactors, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 92, 2178 – 2188, 2017
97. Stamenić M., V. Dikić, M. Mandić, B. Todić, D.B. Bukur, N.M. Nikačević, Multiscale and multiphase model of fixed bed reactors for Fischer–Tropsch synthesis: intensification possibilities study, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 56(36), 9964 – 9979, 2017
98. Stamenić M., V. Dikić, M. Mandić, B. Todić, D.B. Bukur, N.M. Nikačević, Multiscale and multiphase model of fixed-bed reactors for Fischer–Tropsch synthesis: optimization study, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 57(9), 3149 – 3162, 2018.
99. Stonestreet P., P. M. J. Van Der Veeke, The Effects of Oscillatory Flow and Bulk Flow Components on Residence Time Distribution in Baffled Tube Reactors, *Chemical Engineering Research and Design*, 77(8), 671 - 684, 1999
100. Tešić D., Ispitivanje uticaja parametara oscilatornog toka na strujanje fluida u kontinualnim reaktorima za proizvodnju galakto-oligosaharida, Završni rad, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2021
101. Timite B., C. Castelain, H. Peerhossaini, Pulsatile viscous flow in a curved pipe: Effects of pulsation on the development of secondary flow, *International Journal of Heat and Fluid Flow*, 31(5), 879 – 896, 2010
102. Todic B., M. Mandic, N. Nikacevic, D.B. Bukur, Effects of process and design parameters on heat management in fixed bed Fischer-Tropsch synthesis reactor, *Korean Journal of Chemical Engineering*, 35, 875 – 889, 2018
103. Tzortzis G., J. Vulevic, Galacto-Oligosaccharide Prebiotics. In: Charalampopoulos D., Rastall RA, editors. *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*, New York: Springer NY; pp. 207 - 244, 2009.

104. Vega R., M.E. Zuniga-Hansena, A new mechanism and kinetic model for the enzymatic synthesis of short-chain fructooligosaccharides from sucrose, *Biochemical Engineering Journal*, 8, 158 – 165, 2014
105. Venkateswarlu C., S. E. Jujavarapu, *Stochastic Optimization Methods and Applications to Chemical, Biochemical, Pharmaceutical and Environmental Processes*, Elsevier, 2019
106. Vera C., A. Cordova, C. Aburto, C. Guerrero, S. Suarez, A. Illanes, Synthesis and purification of galacto-oligosaccharides: state of the art, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32:197, 2016
107. Vera C., C. Guerrero, A. Illanes, Determination of the transgalactosylation activity of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase: Effect of pH, temperature, and galactose and glucose concentrations, *Carbohydrate Research*, 346 (6), 745 - 752, 2011
108. Vulevic, J.; Juric, A.; Tzortzis, G.; Gibson, G. R. A mixture of transgalactooligosaccharides reduces markers of metabolic syndrome and modulates the fecal microbiota and immune function of overweight adults, *The Journal of Nutrition*, 143, 324–331, 2013
109. Warmerdam A., E. Benjamins, T. Leeuv, T. Broekhuis, R. Boom, A. Janssen Galacto-oligosaccharide production with immobilized b-galactosidase in a packed-bed reactor vs. free b-galactosidase in a batch reactor, *Food and Bioproducts Processing*, 92, 383 – 392, 2014
110. Zambelli P., L. Tamborini, S. Cazzamalli, A. Pinto, S. Arioli, S. Balzaretto, F. J. Plou, L. Fernandez-Arrojo, F. Molinari, P. Conti, D. Romano, An efficient continuous flow process for the synthesis of a non-conventional mixture of fructooligosaccharides, *Food Chemistry*, 190, 607 – 613, 2016
111. Zheng H., Z. Yan, S. Chu, J. Chen, Continuous synthesis of isobornyl acetate catalyzed by a strong acid cation exchange resin in an oscillatory flow reactor, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 134, 1 – 8, 2018
112. Zhou Q.Z., X.D. Chen, X. Li, Kinetics of lactose hydrolysis by betagalactosidase of *Kluyveromyces lactis* immobilized on cotton fabric, *Biotechnology and Bioengineering*, 81 (2), 127–133, 2003
113. Živković I. T., *Osnovi reaktorskog inženjerstva*, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2010
114. Živković L., A. Pohar, B. Likozar, N. Nikačević, Kinetics and reactor modeling for CaO sorption-enhanced high-temperature water–gas shift (SE–WGS) reaction for hydrogen production, *Applied energy*, 178, 844-855, 2016
115. Živković L., A. Pohar, B. Likozar, N. Nikačević, Reactor conceptual design by optimization for hydrogen production through intensified sorption-and membrane-enhanced water-gas shift reaction, *Chemical Engineering Science*, 211, 115174, 2020
116. Živkovic L., N. Nikacevic, A method for reactor synthesis based on process intensification principles and optimization of superstructure consisting of phenomenological modules, *Chemical Engineering Research and Design*, 113, 189 – 205, 2016

Prilog

Tabela P.1. Eksperimentalno dobijene vrednosti N.

Exp	L, m	Q _o , l/h	Q _n , l/h	Q _{uk} , l/h	f, 1/s	Re _o , -	Re _n , -	τ, s	N _{exp}
1	0.96	1.82	-	1.82	0.32	75.61	-	144.3	22
2	0.96	3.6	-	3.6	0.63	149.55	-	72.9	28
3	0.96	5.27	-	5.27	0.93	218.72	-	49.9	35
4	0.96	2.4	2.2	4.6	0.42	99.7	77.62	57.1	38
5	0.96	0.9	-	0.9	0.16	37.39	-	291.7	13
6	0.96	2.4	-	2.4	0.42	99.7	-	109.4	20
7	0.96	1.2	-	1.2	0.21	49.85	-	218.8	13
8	0.96	0.6	-	0.6	0.11	24.93	-	437.6	9
9	0.96	4.8	-	4.8	0.84	199.4	-	54.7	26
10	0.96	7.2	-	7.2	1.27	299.1	-	36.5	39
11	0.96	-	0.54	0.54	-	-	19.05	486.2	6
12	0.96	-	1.2	1.2	-	-	42.34	218.8	15
13	0.96	-	1.8	1.8	-	-	63.5	145.9	37
14	0.96	0.65	1.2	1.85	0.11	27	42.34	141.9	43
15	0.96	3	1.8	4.8	0.53	124.63	63.5	54.7	48
16	2	1.26	-	1.26	0.22	52.34	-	433	25
17	2	3.68	-	3.68	0.65	152.87	-	148.3	53
18	2	7.2	-	7.2	1.27	299.1	-	75.8	69
19	2	3.1	1.8	4.9	0.55	128.78	63.5	111.3	62
20	2	0.65	1.2	1.85	0.11	27	42.34	294.9	46

Tabela P.2. Poređenje stacionarnih koncentracija GOS-a u SORP i koncentracija dobijenih po modelu za E0, E1 i E2.

Broj exp	C _{GOS, stac.} [mmol/l] exp	C _{GOS, stac.} [mmol/l] model E0	C _{GOS, stac.} [mmol/l] model E1	C _{GOS, stac.} [mmol/l] model E2	SPG između exp i modela E0 [%]	SPG između exp i modela E1 [%]	SPG između exp i modela E2 [%]
1.	116.03	72.12	104.26	166.19	37.8	10.1	43.2
2.	99.44	36.22	59.94	133.82	63.6	39.7	34.6
3.	185.22	120.49	151.96	165.82	34.9	17.9	10.5
4.	190.04	117.48	163.48	220.24	38.2	14	15.9
5.	203.73	117.78	165.65	235.27	42.2	18.7	15.4
6.	139.86	36.26	59.93	127.31	74.1	57.2	8.9

Tabela P.3. Poređenje stacionarnih koncentracija laktoze u SORP i koncentracija dobijenih po modelu za E0, E1 i E2.

Broj exp	C _{L,stac.} [mmol/l] exp	C _{L,stac.} [mmol/l] model E0	C _{L,stac.} [mmol/l] model E1	C _{L,stac.} [mmol/l] model E2	SPG između exp i modela E0 [%]	SPG između exp i modela E1 [%]	SPG između exp i modela E2 [%]
1.	961.8	1065.8	990.08	784.5	10.8	2.9	18.4
2.	973.5	1147.8	1094	896.3	17.9	12.4	7.9
3.	700.2	904.8	821.9	691.8	29.2	17.4	1.2
4.	790.4	952.9	843.5	610.6	20.6	6.7	22.7
5.	667.2	1026	913	654.8	53.8	36.8	1.9
6.	897.8	1174	1120.7	942.3	30.8	24.8	4.9

Tabela P.4. Poređenje stacionarnih koncentracija glukoze u SORP i koncentracija dobijenih po modelu za E0, E1 i E2.

Broj exp	C _{GLU,stac.} [mmol/l] exp	C _{GLU,stac.} [mmol/l] model E0	C _{GLU,stac.} [mmol/l] model E1	C _{GLU,stac.} [mmol/l] model E2	SPG između exp i modela E0 [%]	SPG između exp i modela E1 [%]	SPG između exp i modela E2 [%]
1.	222	139.1	182.7	136.3	37.3	17.7	38.6
2.	193.7	65	95	218.9	66.4	51	13
3.	451.3	274.7	326.1	453	39.1	27.7	0.4
4.	302.7	228.6	292	468.1	24.5	3.5	54.6
5.	486.7	222.3	287.4	476	54.3	40.9	2.2
6.	242.6	64.5	94.4	205.3	73.4	61.1	15.4

Tabela P.5. Poređenje stacionarnih koncentracija galaktoze u SORP i koncentracija dobijenih po modelu za E0, E1 i E2.

Broj exp	C _{GAL,stac.} [mmol/l] exp	C _{GAL,stac.} [mmol/l] model E0	C _{GAL,stac.} [mmol/l] model E1	C _{GAL,stac.} [mmol/l] model E2	SPG između exp i modela E0 [%]	SPG između exp i modela E1 [%]	SPG između exp i modela E2 [%]
1.	51.4	61.5	66.6	127.5	19.6	29.6	148
2.	53.3	27.9	32.7	71.8	47.6	38.6	34.7
3.	161.5	135.2	143.2	259.7	16.3	11.3	60.8
4.	118.6	101	107.5	196.3	14.8	9.4	65.5
5.	186.9	94.9	101.4	187.3	49.2	45.2	0.2
6.	75.5	27.4	32.1	66	63.8	57.5	12.2

Biografski podaci

Radoslava N. Pravilović (devojačko Stojanović), diplomirani inženjer tehnologije, rođena je 17.03.1982. godine u Smederevu. Osnovnu školu „Dr Jovan Cvijić“ završila je u Smederevu, kao i Gimnaziju (prirodno-matematički smer), a za uspehe tokom školovanja nagrađena je Vukovom diplomom. Studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu započela je školske 2001/2002. godine, a diplomirala na smeru Hemijsko inženjerstvo 2006. godine sa prosečnom ocenom 9,22. Diplomski rad pod nazivom “Određivanje otpora prenosu mase pri difuziji lidokain-hidrohlorida iz mikročestica” odbranila je sa ocenom 10,00 pod mentorstvom dr Srđana Pejanovića.

Školske 2006/2007. godine upisala je doktorske studije na smeru Biohemijsko inženjerstvo pod mentorstvom dr Branka Bugarskog, red. prof, i položila sve ispite predviđene planom i programom doktorskih studija sa prosečnom ocenom 10,00, uključujući i završni ispit. Doktorsku tezu pod naslovom „Difuzija polifenolnih jedinjenja iz mikročestica dobijenih različitim tehnikama inkapsulacije“ odbranila je u junu 2016. godine na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu.

Školske 2017/2018. godine je ponovo upisala doktorske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu na smeru Hemijsko inženjerstvo pod mentorstvom dr Nikole Nikačevića, red. prof. Položila je sve predviđene ispite na doktorskim studijama, kao i završni ispit sa prosečnom ocenom 10,00.

Naučno-istraživački rad Radoslave Pravilović je započeo 2007. godine kada je kao istraživač-stipendista uključena u istraživanja projekta Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije u okviru projekta osnovnih istraživanja pod nazivom „Interakcija imobilisanih ćelija, tkiva i biološki aktivnih molekula u bioreaktorskim sistemima“ (broj projekta OI142075). Od februara 2011. do danas dr Radoslava Pravilović je zaposlena na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu, i to najpre u zvanju istraživač-pripravnik, zatim istraživač saradnik (od 2012.), pa naučni saradnik (od juna 2017.), a od 1. marta 2018. u zvanju asistent. Bila je angažovana na projektu integralnih i interdisciplinarnih istraživanja iz oblasti poljoprivrede i hrane: „Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti“, Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (broj projekta III 46010) od 2011. do 2019. godine. Pored ovoga, učestvovala je i na dva međunarodna Eureka projekta (sa Republikom Slovenijom, broj projekata E!4486 i E!6750), na dva bilateralna projekta iz programa naučne i tehnološke saradnje Republike Srbije i drugih zemalja i to kao istraživač na projektu (bilateralni projekti sa Republikom Slovenijom i Republikom Hrvatskom), kao i na jednom Horizon projektu. Od januara 2022. je angažovana na projektu Fonda za nauku IDEJE pod nazivom: „Prebiotics for functional food and bioactive cosmetics produced in intensified enzymatic processes“ (PrIntPrEnzy), a od septembra 2022. na međunarodnom Horizon projektu: „Tvining za intenzivirane enzimske procese za proizvodnju funkcionalne hrane koja sadrži prebiotike i bioaktivne kozmetičke proizvode - TwinPrebioEnz”.

Radoslava Pravilović od školske 2007/2008. godine do danas učestvuje u nastavi u izvođenju računskih vežbi iz nekoliko predmeta pri katedri za Hemijsko inženjerstvo na Tehnološko-metalurškom fakultetu („Osnovi automatskog upravljanja“, „Modelovanje i simulacija procesa“, „Programiranje“, „Sistemi automatskog upravljanja procesima“, „Merenje i upravljanje procesima“, „Upravljanje procesima u farmaceutskoj industriji“), kao i u izvođenju eksperimentalnih vežbi („HI laboratorija“ i „Tehnološke operacije“). Učestvovala je u eksperimentalnom radu i obradi rezultata nekoliko završnih i master radova studenata na Katedri za hemijsko inženjerstvo.

Dr Radoslava Pravilović je u svom dosadašnjem radu publikovala 43 bibliografske jedinice uključujući i doktorsku disertaciju. Do sada je objavila: radove u časopisima međunarodnog značaja (M21a – jedan rad, M21 - jedan rad, M22 - četiri rada, M23 - četiri rada, M24 – jedan rad), saopštenja sa skupova međunarodnog značaja štampana u celini (M33 - četrnaest saopštenja), saopštenja sa

skupova međunarodnog značaja štampana u izvodu (M34 - deset saopštenja), radove u časopisima nacionalnog značaja (M52 – jedan rad), saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u celini (M63 - jedno saopštenje), saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64 - tri saopštenja), kao i dva poglavlja u knjigama međunarodnog značaja (M13).

Kao rezultat rada na doktorskoj disertaciji, dr Radoslava Pravilović je objavila dva naučna rada u istaknutim međunarodnim časopisima (M22) i tri saopštenja sa skupova međunarodnog značaja štampana u izvodu (M34).

Sadržaj slika

Slika 1.1: Načini delovanja prebiotika (adaptirano iz Crittenden i Playne 2006.).....	2
Slika 1.2: Struktura GOS-a.....	3
Slika 1.3: Pojednostavljen mehanizam sinteze GOS.....	4
Slika 1.4: Struktura FOS-a.....	8
Slika 1.5: Pojednostavljen mehanizam sinteze FOS (preuzeto iz Martins i sar. 2019).....	9
Slika 1.6: Šematski prikaz kontinualne proizvodnje GOS pomoću reaktora sa pakovanim slojem (preuzeto i modifikovano iz Shin i sar. 1998).....	15
Slika 1.7: Šematski prikaz kontinualne proizvodnje GOS pomoću membranskog bioreaktora (preuzeto i modifikovano iz Sen i sar. 2012).....	16
Slika 1.8: Reaktor sa oscilatornim tokom fluida (preuzeto iz Zheng i sar. 2018.).....	17
Slika 1.9: Različite konfiguracije pregrada unutar ROT (preuzeto iz Bianchi i sar. 2020.).....	17
Slika 1.10: Faze u formiranju vrtloga u reaktoru sa pregradama: (a) početak udarnog talasa (b) dostizanje maksimalne brzine udarnog talasa (c) početak dejstva povratnog talasa (d) maksimalno izraženo dejstvo povratnog talasa (preuzeto iz McDonough i sar. 2018.).....	18
Slika 1.11: Spiralni reaktor (preuzeto iz Kumar 2020.).....	20
Slika 1.12: Šematski prikaz Dean-ovih vrtloga (preuzeto iz McDonough i sar. 2018.).....	20
Slika 1.13: Metodologija za brzi razvoj optimizovanih enzimskih procesa (projekat IDEJE PrintPrEnzi).....	23
Slika 2.1: Tipični izgled hromatograma za sintezu GOS-a korišćenjem HPLC.....	26
Slika 2.2: Odnosi brzina direktnih i povratnih reakcija za model 1 za početnu koncentraciju laktoze od 40 mas. % i početnu koncentraciju enzima od 1 mg/ml.....	32
Slika 2.3: Rezultati modela 2 (linija) i eksperimentalne vrednosti (tačke) za reakciju sa slobodnim enzimom: početna koncentracija rastvora laktoze 30 mas.% i enzima 1 mg/ml.....	33
Slika 2.4: Zavisnost koncentracije (a) i konverzije (b) laktoze po eksperimentu i modelu 2 pri različitim početnim koncentracijama laktoze.....	34
Slika 2.5: Zavisnost koncentracije (a) i konverzije (b) laktoze po eksperimentu i modelu 2 pri različitim početnim koncentracijama enzima.....	35
Slika 2.6: Zavisnost koncentracije GOS po eksperimentu i modelu 2 pri različitim početnim koncentracijama laktoze (a) i enzima (b).....	36
Slika 2.7: Mehanizam enzimski katalizovane reakcije transformacije laktoze putem transgalaktozilacije i hidrolize.....	37
Slika 2.8: Efekat početne koncentracije laktoze na TGH odnos pri početnoj koncentraciji enzima od: a) 0,5 mg/ml; b) 1,0 mg/ml i c) 2,0 mg/ml.....	38
Slika 2.9: Efekat početne koncentracije enzima na TGH odnos pri početnoj koncentraciji laktoze od: a) 20 mas.%; b) 30 mas.% i c) 40 mas.%.....	39
Slika 2.10: Eksperimentalna aparatura za sintezu FOS (preuzeto iz master rada Janković 2022.).....	40
Slika 2.11: Mehanizam enzimski katalizovane reakcije transformacije saharoze putem transfruktozilacije i hidrolize.....	42

Slika 2.12: Odnosi brzina direktnih i povratnih reakcija za model A za početnu koncentraciju saharoze od 400 g/l i početnu koncentraciju enzima od 1 zap.%.....	48
Slika 2.13: Rezultati modela H (linije) i eksperimentalne vrednosti (tačke) za reakciju sa slobodnim enzimom: početna koncentracija rastvora saharoze 400 g/l i enzima a) 1 zap.%, b) 2 zap.% i c) 3 zap.%.....	50
Slika 2.14: Zavisnost koncentracije saharoze po eksperimentu i modelu H: (a) pri različitim početnim koncentracijama saharoze za početnu koncentraciju enzima od 2 zap.% i (b) pri različitim početnim koncentracijama enzima za početnu koncentraciju saharoze od 400 g/l.....	51
Slika 2.15: Zavisnost koncentracije FOS po eksperimentu i modelu H: (a) pri različitim početnim koncentracijama saharoze za početnu koncentraciju enzima od 2 zap.% i (b) pri različitim početnim koncentracijama enzima za početnu koncentraciju saharoze od 400 g/l.....	53
Slika 2.16: Zavisnost prinosa FOS sa vremenom pri različitim početnim koncentracijama enzima.....	54
Slika 2.17: Efekat početne koncentracije saharoze na TFH odnos pri početnoj koncentraciji enzima od: a) 1 zap.%; b) 2 zap.% i c) 5 zap.%.....	55
Slika 2.18: Efekat početne koncentracije enzima na TFH odnos pri početnoj koncentraciji saharoze od 400 g/l.....	56
Slika 3.1: a) Izgled spiralnog oscilatornog reaktora sa pregradama, b) izgled pregrada.....	57
Slika 3.2: SORP korišćen u eksperimentima.....	58
Slika 3.3: Element za povezivanje.....	58
Slika 3.4: Prikaz geometrije: a) reaktorske jedinice, b) pregrada.....	61
Slika 3.5: (a) Dizajn nosača, (b) geometrija reaktorskih jedinica.....	61
Slika 3.6: Formlabs Form 3+ 3D štampač.....	62
Slika 3.7: Odštampani spiralni element.....	62
Slika 3.8: Izgled reaktorskog sistema u toku rada.....	64
Slika 3.9: Priprema rastvora laktoze.....	65
Slika 3.10: Reakcija proteina sa anjonskim oblikom boje komasi plava G-250.....	67
Slika 3.11: Promena koncentracije laktoze i proizvoda na izlazu iz reaktora sa vremenom za eksperiment 1.....	68
Slika 3.12: Promena koncentracije laktoze i proizvoda na izlazu iz reaktora sa vremenom za eksperiment 2.....	69
Slika 3.13: Promena koncentracije laktoze i proizvoda na izlazu iz reaktora sa vremenom za eksperiment 3.....	70
Slika 3.14: Promena koncentracije laktoze i proizvoda na izlazu iz reaktora sa vremenom za eksperiment 4.....	70
Slika 3.15: Promena koncentracija laktoze i proizvoda na izlazu iz reaktora sa vremenom za eksperiment 5.....	71
Slika 3.16: Promena koncentracija GOS na izlazu iz reaktora sa vremenom za eksperimente 1 i 4....	71
Slika 3.17: Promena koncentracija GOS na izlazu iz reaktora sa vremenom za eksperimente 5 i 6....	72
Slika 3.18: Promena koncentracija GOS na pola i na izlazu iz reaktora sa vremenom za eksperiment 4.....	73

Slika 3.19: Promena koncentracije GOS na pola i na izlazu iz reaktora sa vremenom za eksperiment 3.....	73
Slika 3.20: Promena koncentracija laktoze sa vremenom za sve eksperimente.....	74
Slika 3.21: Promena koncentracija GOS sa vremenom za sve eksperimente.....	74
Slika 3.22: Promena koncentracije enzima na izlazu iz reaktora sa vremenom.....	75
Slika 3.23: Promena koncentracije enzima sa vremenom za eksperiment samo sa enzimom. Ulazna (željena) koncentracija enzima je prikazana crnom linijom.....	76
Slika 3.24: Promena koncentracije enzima i koncentracije GOS za SORP sa vremenom za eksperiment 4.....	77
Slika 3.25: Promena koncentracije enzima i koncentracije GOS za SORP sa vremenom za eksperiment 5.....	77
Slika 3.26: Promena koncentracije GOS u šaržnom reaktoru za različite početne koncentracije enzima E2.....	79
Slika 3.27: Promena koncentracije laktoze u šaržnom reaktoru za različite početne koncentracije enzima E2.....	80
Slika 3.28: Promena koncentracije GOS u šaržnom reaktoru za različite početne koncentracije enzima E1.....	81
Slika 3.29: Promena koncentracije GOS u šaržnom reaktoru za koncentraciju enzima E1 i E2 od 0,8 mg/ml.....	81
Slika 3.30: Promena koncentracije GOS u šaržnom reaktoru za koncentraciju enzima E1 i E2 od 1,5 mg/ml.....	82
Slika 3.31: Promena koncentracije GOS u šaržnom reaktoru za koncentracija enzima E1 od 0,8 mg/ml i enzima E2 od 0,16 mg/ml.....	83
Slika 3.32: Promena koncentracije laktoze u šaržnom reaktoru za koncentraciju enzima E1 od 0,8 mg/ml i enzima E2 od 0,16 mg/ml.....	83
Slika 3.33: Promena koncentracije glukoza i galaktoze u šaržnom reaktoru za koncentraciju enzima E1 od 0,8 mg/ml i enzima E2 od 0,16 mg/ml.....	84
Slika 3.34: Promena koncentracije GOS u šaržnom reaktoru za koncentraciju enzima E1 od 1,5 mg/ml i enzima E2 od 0,3 mg/ml.....	84
Slika 3.35: Promena koncentracije laktoze u šaržnom reaktoru za koncentraciju enzima E1 od 1,5 mg/ml i enzima E2 od 0,3 mg/ml.....	85
Slika 3.36: Prikaz stacionarnih koncentracija u SORP na pola (kvadratići) i na izlazu (kružići) iz reaktora za eksperimente 1-5 i promene koncentracije GOS-a u šaržnom reaktoru sa vremenom.....	88
Slika 3.37: Prikaz stacionarnih koncentracija u SORP na pola (kvadratići) i na izlazu (kružići) iz reaktora za eksperiment 6 i promene koncentracije GOS-a u šaržnom reaktoru sa vremenom.....	89
Slika 3.38: Zavisnost produktivnosti GOS-a od potrošnje enzima za eksperimente izvedene u SORP i u šaržnom sistemu.....	90
Slika 4.1: Prikaz modela kaskade sa povratnim tokom (modifikovano iz Levenspiel 1999)	91
Slika 4.2: Izgled kartice <i>General</i>	96
Slika 4.3: Izgled kartice <i>Decisions</i>	97
Slika 4.4: Izgled kartice <i>Constrains</i>	98
Slika 4.5: SORP za eksperimente sa obeleženom supstancom.....	99

Slika 4.6: Ubacivanje obeležene supstance u SORP (a) i proticanje obeležene supstance kroz SORP (b)	99
Slika 4.7: Promena odnosa N/N_t određenog korelacijom broj 5 (tabela 4.3), u funkciji uslova proticanja Reo.....	102
Slika 4.8: Poređenje rezultata eksperimenata sa obeleženom supstancom i kaskadnog modela za SORP. E(t) krive za eksperimente: a) br. 9, Reo = 200, Ren = 0, b) br. 4, Reo = 100, Ren = 78, c) br. 15, Reo = 125, Ren = 64, d) br. 19, Reo = 125, Ren = 64.....	103
Slika 4.9: Promena koncentracije GOS po modelu i u eksperimentu 1 sa vremenom.....	105
Slika 4.10: Promena koncentracije GOS po modelu i u eksperimentu 2 sa vremenom.....	105
Slika 4.11: Promena koncentracije GOS po modelu i u eksperimentu 3 sa vremenom.....	106
Slika 4.12: Promena koncentracije GOS po modelu i u eksperimentu 4 sa vremenom.....	106
Slika 4.13: Promena koncentracije GOS po modelu i u eksperimentu 5 sa vremenom.....	107
Slika 4.14: Promena koncentracije GOS po modelu i u eksperimentu 6 sa vremenom.....	107
Slika 4.15: Slaganje eksperimentalnih rezultata (simboli) i modela (linije) za eksperimente 2, 4, 5 i 6 izvedene bez upotrebe recikla (RT predstavlja vreme zadržavanja).....	108
Slika 4.16: Slaganje eksperimentalnih rezultata (simboli) i modela (linije) za eksperimente izvedene sa reciklom.....	109
Slika 4.17: Promena koncentracije GOS sa vremenom po modelu.....	110
Slika 4.18: Promena koncentracije komponenti sa vremenom po modelu za eksperiment 5.....	110

Sadržaj tabela

Tabela 1.1. Mehanizmi reakcije sinteze GOS-a korišćeni u literaturi.....	5
Tabela 1.2. Mehanizmi reakcije sinteze FOS-a korišćeni u literaturi.....	10
Tabela 2.1. Procesni uslovi izvedenih eksperimenata.....	25
Tabela 2.2. Različiti mehanizmi sinteze GOS-a.....	27
Tabela 2.3. Vrednosti kinetičkih parametara ispitanih modela.....	31
Tabela 2.4. Odstupanja modela po komponentama za model 2. Sve vrednosti su date u %.....	32
Tabela 2.5. Procesni uslovi izvedenih eksperimenata.....	41
Tabela 2.6. Različiti mehanizmi sinteze FOS-a.....	42
Tabela 2.7. Srednja relativna procentualna greška (SRPG) za sve komponente i sve ispitane modele. Sve vrednosti su date u %.....	45
Tabela 2.8. Vrednosti konstante brzine reakcije sa intervalom poverenja od 95 % za model H.....	45
Tabela 2.9. Vrednosti kinetičkih parametara ispitanih modela.....	46
Tabela 2.10. T-test za model H.....	47
Tabela 2.11. Srednja relativna procentualna greška (SRPG) za model H. Sve vrednosti su date u %.....	49
Tabela 3.1. Geometrijske karakteristike spiralnog oscilatornog reaktora sa pregradama (SORP).....	60
Tabela 3.2. Procesni uslovi u izvedenim eksperimentima.....	65
Tabela 3.3. Stacionarne koncentracije svih komponenti u izvedenim eksperimentima u SORP.....	68
Tabela 3.4. Koncentracije enzima u eksperimentima u SORP.....	75
Tabela 3.5. Materijalni bilansi enzima u eksperimentima u SORP.....	78
Tabela 3.6. Konverzija, selektivnost i prinos u šaržnim eksperimentima.....	80
Tabela 3.7. Koncentracije komponenti posle 15 min za koncentraciju enzima E1 i enzima E2 od 1,5 mg/ml.....	85
Tabela 3.8. Koncentracije komponenti posle 15 min za koncentraciju enzima E1 i enzima E2 od 0,8 mg/ml.....	86
Tabela 3.9. Konverzija, selektivnost, prinos i produktivnost u eksperimentima izvedenim u SORP.....	86
Tabela 4.1. Način definisanja vrsta promenljivih veličina.....	94
Tabela 4.2. Eksperimentalni uslovi.....	100
Tabela 4.3. Optimalni parametri za različite predložene korelacije.....	102
Tabela 4.4. Rezultati optimizacija za F_{obj1} i F_{obj2}	112

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Име и презиме аутора **Радослава Н. Правић**

Број индекса **4042/2017**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Интензификација процеса континуалне производње пребиотских

олигосахарида

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

Потпис аутора

У Београду, 22.04.2024.

ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКОГ РАДА

Име и презиме аутора Радослава Н. Правић

Број индекса 4042/2017

Студијски програм Хемијско инжењерство

Наслов рада Интензификација процеса континуалне производње пребиотских олигосахарида

Ментор проф. др Никола Никачевић

Потписани/а: Радослава Правић

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, 22.04.2024.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

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

Интензификација процеса континуалне производње пребиотских олигосахарида

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, 22.04.2024.

1. **Ауторство.** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација на Универзитету у Београду и налаза у извештају генерисаном од стране софтвера IThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „**Интензификација процеса континуалне производње пребиотских олигосахарида**“ ауторке и кандидаткиње **др Радославе Правиловић**, констатујем да подударање текста износи свега 7 %. Од тога највећи део подударности долази из ранијих дисертација на које се надовезује ова теза, конкретно дисертација Данијеле Славнић из 2020. године (409 речи, око 1 %) и Милице Царевић из 2016. (60 речи, око 0.1 %). Остале подударности (укупно око 6 %) проистичу у највећој мери из научних радова коју су представљени у прегледу литературе, а мањим делом из других поглавља, где су анализирани резултати. Научни радови из извештаја, као и остали у дисертацији, су адекватно цитирани и наведени у списку литературе. За велику већину радова из литературе подударност је испод 20 речи.

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

Београд, 08.05.2024.

Ментор



Др Никола Никачевић, редовни професор

Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет