

**UNIVERZITET U BEOGRADU  
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET**

Katarina D. Katić

**RAZVOJ IMOBILISANIH BIOKATALIZATORA  
SA NANOCELULOZNIM NOSAČIMA ZA  
PRIMENU U VALORIZACIJI NUSPROIZVODA  
INDUSTRIJE HRANE**

doktorska disertacija

Beograd, 2026.

**UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY**

Katarina D. Katić

**DEVELOPMENT OF IMMOBILIZED  
BIOCATALYSTS BASED ON  
NANOCELLULOSE CARRIERS FOR  
APPLICATION IN THE VALORIZATION OF  
FOOD INDUSTRY BY-PRODUCTS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026

## MENTORI:

---

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

---

Dr Katarina Banjanac, viši naučni saradnik  
Univerzitet u Beogradu, Inovacioni centar  
Tehnološko-metalurškog fakulteta

## ČLANOVI KOMISIJE:

---

Dr Sonja Jakovetić-Tanasković, docent  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

---

Dr Aleksandar Marinković, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

---

Dr Sanja Savić, docent  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

---

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

---

Dr Vesna Lazić, naučni savetnik  
Univerzitet u Beogradu, Institut za nuklearne nauke „Vinča“

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

## **Zahvalnica**

*Put do ove disertacije vodio me je kroz nekoliko laboratorija i dve države, ali nijedan njen deo ne bi bio moguć bez ljudi koji su mi usput pomagali, verovali u mene i delili sa mnom i uspehe i padove. Njima dugujem ovih nekoliko redova.*

*Najpre se zahvaljujem svom mentoru, prof. dr Dejanu Bezbradici. Hvala vam što ste mi poverili temu koja spaja hemiju, biotehnologiju i ideju da i ono što industrija odbacuje može postati vredno, i što ste celom istraživanju dali jasan naučni pravac. Vaše vođstvo i prave reči u pravom trenutku, kroz sva pitanja i sve neuspele eksperimente, usmeravali su me ka pravim odgovorima i oblikovali način na koji danas razmišljam o nauci.*

*Posebnu zahvalnost dugujem svojoj mentorki, dr Katarini Banjanac, koja je sa mnom prošla kroz svaki korak ovog rada, od eksperimenata u laboratoriji do pisanja naučnih radova i same disertacije. Hvala na nesebičnoj, konkretnoj pomoći, na strpljenju i posvećenosti, i na angažovanju u svim situacijama kada je trebalo zasukati rukave i rešiti problem.*

*Veliko hvala mojim kolegicama sa Katedre za biohemijско inženjerstvo i biotehnologiju. Posebno mesto pripada dr Anji Petrov Ivanković i dr Milici Veljković, na prijateljstvu koje smo ostvarile tokom ovog puta, a Milici dodatno hvala što je izvela ispitivanja prebiotske aktivnosti dobijenih oligosaharidnih hidrolizata i što mi je nesebično pomagala i pri izvođenju ostalih eksperimenata i pri pisanju ove disertacije. Ani Vukoičić i dr Milici Simović hvala na srdačnosti i lepim razgovorima koji su me uvek podsećali da iako nisam bila stalno tu, uvek su me gledali kao člana tima. Zahvaljujem se i ostalim članicama tima mog mentora, dr Mariji Čorović i dr Ani Milivojević, na kolegijalnosti i podršci tokom ovih istraživanja. Hvala i svim drugim kolegama sa Katedre sa kojima sam sarađivala tokom studija i izrade ove disertacije.*

*Zahvaljujem se i kolegama iz firme „Bio-ReCell“ u Ljubljani, a naročito svojim nadređenima, koji su mi otvorili vrata svojih laboratorija i omogućili mi da tamo izvedem deo eksperimenata neophodnih za ovu disertaciju.*

*Posebno se zahvaljujem kolegama koji su izveli analize neophodne za karakterizaciju nanoceluloznih nosača. Dr Mileni Milošević sa Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju Univerziteta u Beogradu hvala na snimanju FTIR spektara i na pomoći pri njihovom tumačenju. Dr Slavku Kralju i dr Sebastjanu Nemecu sa Instituta „Jožef Stefan“ u Ljubljani zahvaljujem na snimanju SEM i TEM mikrofografija, koje su omogućile uvid u morfologiju dobijenih nosača.*

*Najtoplije hvala mojoj porodici. Inspiraciju da uopšte krenem ovim putem pronašla sam u svom dedi, dr Branislavu Bileni, čiji me je primer pratio sve ove godine. Bratu Aleksandru hvala na podršci koja traje od kada znam za sebe. I na kraju, ono najvažnije: mami Branki i suprugu Vladanu, hvala vam na ljubavi, strpljenju i nepokolebljivoj veri u mene, koje su bile moja snaga da istrajem.*

*Ovu disertaciju posvećujem svom ocu Dejanu.*

# **Razvoj imobilisanih biokatalizatora sa nanoceluloznim nosačima za primenu u valorizaciji nusproizvoda industrije hrane**

## **Sažetak**

U okviru ove doktorske disertacije razvijeni su nanobiokatalitički sistemi za valorizaciju nusproizvoda prehrambene industrije, zasnovani na imobilizaciji hidrolitičkih enzima na nanocelulozne nosače. Kiselinskom hidrolizom mikrokristalne celuloze dobijeni su nanokristali celuloze (CNC), koji su funkcionalizovani perjodatnom oksidacijom (Ox-CNC) i silanizacijom APTES-om uz aktivaciju glutaraldehydom (amino-CNC i GA-amino-CNC). Struktura i površinska svojstva nosača potvrđeni su SEM, TEM, DLS i FTIR analizama. Na pripremljene nosače imobilisana su četiri industrijska enzimska preparata (Rohalase® SEP-Visco, Pectinex® Ultra SP-L, Alcalase® i Flavourzyme®) adsorpcijom i kovalentnim vezivanjem. Pokazano je da izbor optimalnog nosača zavisi od osobina enzima i ciljanog supstrata. Dobijeni nanobiokatalizatori primenjeni su u hidrolizi frakcija dobijenih iz agroindustrijskih sirovina: ksilanaza imobilisana na Ox-CNC iskorišćena je za proizvodnju ksilooligosaharida (XOS) iz ksilanske frakcije suncokretove sačme, imobilisana pektinaza za proizvodnju pektinskih oligosaharida (POS) iz pektina sačme uljane repice i pogače crne ribizle, dok je sekvencijalnom primenom imobilisanih proteaza dobijen proteinski hidrolizat iz proteinske frakcije suncokretove sačme. Optimizovani nanobiokatalizatori pokazali su visoku operativnu stabilnost tokom višekratne primene, a prebiotski potencijal proizvedenih XOS i POS potvrđen je za tri probiotska mikroorganizma. Dobijeni rezultati pokazuju da se ciljanim izborom funkcionalizacije nanoceluloznog nosača mogu razviti stabilni i višekratno upotrebljivi nanobiokatalizatori za proizvodnju prebiotskih oligosaharida i funkcionalnih proteinskih hidrolizata iz nusproizvoda prehrambene industrije.

**Ključne reči:** nanoceluloza, imobilizacija enzima, ksilooligosaharidi, pektinski oligosaharidi, proteinski hidrolizati, prebiotici, valorizacija nusproizvoda

**Naučna oblast:** Tehnološko inženjerstvo

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

# **Development of immobilized biocatalysts based on nanocellulose carriers for application in the valorization of food industry by-products**

## **Abstract**

Within this doctoral dissertation, nanobiocatalytic systems for the valorization of food-industry by-products were developed, based on the immobilization of hydrolytic enzymes onto nanocellulose carriers. Cellulose nanocrystals (CNC) were obtained by acid hydrolysis of microcrystalline cellulose and subsequently functionalized by periodate oxidation (Ox-CNC) and by silanization with APTES followed by glutaraldehyde activation (amino-CNC and GA-amino-CNC). The structure and surface properties of the carriers were confirmed by SEM, TEM, DLS, and FTIR analyses. Four industrial enzyme preparations (Rohalase<sup>®</sup> SEP-Visco, Pectinex<sup>®</sup> Ultra SP-L, Alcalase<sup>®</sup>, and Flavourzyme<sup>®</sup>) were immobilized onto the prepared carriers by adsorption and covalent binding. It was shown that the choice of the optimal carrier depends on the properties of the enzyme and of the target substrate. The resulting nanobiocatalysts were applied in the hydrolysis of fractions derived from agro-industrial raw materials: xylanase immobilized on Ox-CNC was used for the production of xylooligosaccharides (XOS) from the xylan fraction of sunflower meal, immobilized pectinase for the production of pectic oligosaccharides (POS) from the pectins of rapeseed meal and black currant pomace, while the sequential application of immobilized proteases yielded a protein hydrolysate from the protein fraction of sunflower meal. The immobilized preparations exhibited high operational stability over repeated use, and the prebiotic potential of the produced XOS and POS was confirmed for three probiotic microorganisms. The obtained results demonstrate that, through the targeted choice of nanocellulose carrier functionalization, stable and reusable nanobiocatalysts can be developed for the production of prebiotic oligosaccharides and functional protein hydrolysates from food-industry by-products.

**Keywords:** nanocellulose, enzyme immobilization, xylooligosaccharides, pectic oligosaccharides, protein hydrolysates, prebiotics, by-product valorization

**Scientific field:** Technological engineering

**Scientific subfield:** Biochemical engineering and biotechnology

# SADRŽAJ

|           |                                                                  |    |
|-----------|------------------------------------------------------------------|----|
| 1         | UVOD .....                                                       | 1  |
| 2         | TEORIJSKI DEO.....                                               | 3  |
| 2.1       | POJAM, SVRHA I METODE IMOBILIZACIJE ENZIMA.....                  | 3  |
| 2.1.1     | Metode imobilizacije enzima .....                                | 3  |
| 2.1.2     | Nosači za imobilizaciju enzima .....                             | 5  |
| 2.1.2.1   | Neorganski nosači za imobilizaciju .....                         | 5  |
| 2.1.2.2   | Organski nosači za imobilizaciju .....                           | 5  |
| 2.2       | CELULOZA KAO NOSAČ ZA IMOBILIZACIJU ENZIMA .....                 | 6  |
| 2.2.1     | Celuloza .....                                                   | 6  |
| 2.2.2     | Nanoceluloza.....                                                | 7  |
| 2.2.3     | Hemijska modifikacija celuloze i nanoceluloze.....               | 8  |
| 2.2.3.1   | Oksidacija celuloze .....                                        | 8  |
| 2.2.3.2   | Silanizacija celuloze.....                                       | 9  |
| 2.2.3.3   | Druge metode .....                                               | 10 |
| 2.2.4     | Imobilisani enzimi na celuloznim i nanoceluloznim nosačima ..... | 10 |
| 2.3       | ENZIMI ZA OBRADU NUSPROIZVODA INDUSTRIJE HRANE .....             | 12 |
| 2.3.1     | Hemicelulaze.....                                                | 12 |
| 2.3.2     | Pektinaze .....                                                  | 14 |
| 2.3.3     | Proteolitički enzimi .....                                       | 15 |
| 2.3.3.1   | Endopeptidaze .....                                              | 16 |
| 2.3.3.2   | Egzopeptidaze .....                                              | 16 |
| 2.3.4     | Primena enzima u obradi nusproizvoda industrije hrane .....      | 16 |
| 2.4       | NUSPROIZVODI INDUSTRIJE HRANE.....                               | 17 |
| 2.4.1     | Uljarice.....                                                    | 17 |
| 2.4.1.1   | Suncokret i uljana repica.....                                   | 18 |
| 2.4.2     | Bobičasto voće .....                                             | 22 |
| 2.4.2.1   | Pogača crne ribizle .....                                        | 23 |
| 2.4.3     | Ključne komponente nusproizvoda industrije hrane.....            | 24 |
| 2.4.3.1   | Ugljeni hidrati .....                                            | 24 |
| 2.4.3.1.1 | Celuloza .....                                                   | 25 |
| 2.4.3.1.2 | Hemiceluloza .....                                               | 25 |
| 2.4.3.1.3 | Pektinski polisaharidi.....                                      | 27 |
| 2.4.3.2   | Proteini .....                                                   | 28 |
| 2.5       | FRAKCIONISANJE NUSPROIZVODA INDUSTRIJE HRANE .....               | 28 |

|         |                                                                                                 |    |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.5.1   | Koncept biorafinerije .....                                                                     | 28 |
| 2.5.2   | Frakcionisanje kao ključni korak u biorafinerijskom pristupu .....                              | 30 |
| 2.6     | PROTEINSKI HIDROLIZATI.....                                                                     | 31 |
| 2.6.1   | Definicija i klasifikacija hidrolizata proteina.....                                            | 31 |
| 2.6.2   | Primena hidrolizata proteina .....                                                              | 32 |
| 2.7     | PREBIOTICI.....                                                                                 | 32 |
| 2.7.1   | Definicija prebiotika i podela.....                                                             | 32 |
| 2.7.2   | Oligosaharidi.....                                                                              | 33 |
| 2.7.2.1 | Ksilooligosaharidi (XOS) .....                                                                  | 35 |
| 2.7.2.2 | Pektinski oligosaharidi (POS).....                                                              | 36 |
| 2.8     | CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....                                                                       | 37 |
| 3       | EKSPERIMENTALNI DEO .....                                                                       | 39 |
| 3.1     | MATERIJALI I OPREMA .....                                                                       | 39 |
| 3.1.1   | Materijali.....                                                                                 | 39 |
| 3.1.2   | Oprema.....                                                                                     | 41 |
| 3.2     | METODE .....                                                                                    | 43 |
| 3.2.1   | Dobijanje, modifikacija i karakterizacija nanoceluloze.....                                     | 43 |
| 3.2.1.1 | Dobijanje nanoceluloze.....                                                                     | 43 |
| 3.2.1.2 | Oksidacija nanoceluloze sa natrijum-perjodatom .....                                            | 43 |
| 3.2.1.3 | Silanizacija nanoceluloze za uvođenje amino grupa.....                                          | 43 |
| 3.2.1.4 | Karakterizacija .....                                                                           | 43 |
| 3.2.1.5 | Određivanje koncentracije aldehidnih grupa na nosaču Ox-CNC .....                               | 44 |
| 3.2.1.6 | Analiza trodimenzionalne strukture enzima .....                                                 | 44 |
| 3.2.2   | Metode imobilizacije.....                                                                       | 44 |
| 3.2.2.1 | Procedura za aktivaciju nosača glutaraldehydom: .....                                           | 44 |
| 3.2.2.2 | Imobilizacija enzima na nanocelulozu .....                                                      | 45 |
| 3.2.3   | Određivanje proteina.....                                                                       | 45 |
| 3.2.3.1 | Metoda po Bredfordu .....                                                                       | 45 |
| 3.2.4   | Određivanje enzimske aktivnosti .....                                                           | 46 |
| 3.2.4.1 | Određivanje aktivnosti ksilanaze i pektinaze.....                                               | 46 |
| 3.2.4.2 | Određivanje hidrolitičke aktivnosti proteaza u reakciji hidrolize azokazeina .....              | 47 |
| 3.2.4.3 | Određivanje hidrolitičke aktivnosti proteaza u reakciji hidrolize L-leucin-p-nitroanilida ..... | 47 |
| 3.2.4.4 | Desorpcija enzima sa nosača.....                                                                | 48 |
| 3.2.5   | Frakcionisanje nusproizvoda prehrambene industrije.....                                         | 48 |
| 3.2.5.1 | Dobijanje ksilana iz suncokretove sačme .....                                                   | 48 |

|           |                                                                                                                  |    |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.5.2   | Dobijanje pektina iz sačme uljane repice.....                                                                    | 49 |
| 3.2.5.3   | Dobijanje pektina iz pogače crne ribizle.....                                                                    | 49 |
| 3.2.5.4   | Dobijanje proteinske frakcije suncokretove sačme.....                                                            | 50 |
| 3.2.6     | Primena imobilisanih i slobodnih enzima u reakcijama hidrolize frakcija nusproizvoda prehrambene industrije..... | 50 |
| 3.2.6.1   | Hidroliza ksilana pomoću enzima Rohalase® SEP-Visco .....                                                        | 50 |
| 3.2.6.2   | Hidroliza pektina pomoću enzima Pectinex® Ultra SP-L .....                                                       | 51 |
| 3.2.6.3   | Hidroliza proteinske frakcije suncokretove sačme pomoću enzima Alcalase® i Flavourzyme® .....                    | 51 |
| 3.2.6.4   | Ciklusi primene imobilisanog enzima.....                                                                         | 52 |
| 3.2.7     | Analitičke metode .....                                                                                          | 52 |
| 3.2.7.1   | HPLC analiza ksilooligosaharida.....                                                                             | 52 |
| 3.2.7.2   | DNS analiza hidrolizata pektina .....                                                                            | 52 |
| 3.2.7.3   | Određivanje stepena hidrolize ninhidrinskom metodom .....                                                        | 53 |
| 3.2.7.4   | HPLC analiza hidrolizata proteina.....                                                                           | 53 |
| 3.2.7.5   | SDS-PAGE analiza hidrolizata proteina .....                                                                      | 53 |
| 3.2.8     | Određivanje prebiotske aktivnosti .....                                                                          | 54 |
| 4         | REZULTATI I DISKUSIJA .....                                                                                      | 55 |
| 4.1       | HEMIJSKA MODIFIKACIJA NANOCELULOZNIH NOSAČA .....                                                                | 56 |
| 4.2       | KARAKTERIZACIJA NANOCELULOZNIH NOSAČA .....                                                                      | 57 |
| 4.3       | IMOBILIZACIJA HIDROLITIČKIH ENZIMA NA NANOCELULOZNE NOSAČE...61                                                  |    |
| 4.3.1     | Imobilizacija enzimskog preparata Rohalase® SEP-Visco na nanocelulozne nosače63                                  |    |
| 4.3.1.1   | Imobilizacija preparata Rohalase® SEP-Visco adsorpcijom na nemodifikovanu nanocelulozu .....                     | 65 |
| 4.3.1.1.1 | Uticaj pH vrednosti na efikasnost imobilizacije preparata Rohalase® SEP-Visco adsorpcijom na CNC.....            | 66 |
| 4.3.1.1.2 | Efikasnost imobilizacije proteina Rohalase® SEP-Visco na CNC.....                                                | 68 |
| 4.3.1.1.3 | Efikasnost imobilizacije aktivnosti preparata Rohalase® SEP-Visco na CNC                                         | 69 |
| 4.3.1.1.4 | Kinetika imobilizacije preparata Rohalase® SEP-Visco na CNC .....                                                | 70 |
| 4.3.1.2   | Imobilizacija preparata Rohalase® SEP-Visco adsorpcijom na amino-modifikovanu nanocelulozu .....                 | 71 |
| 4.3.1.2.1 | Uticaj pH vrednosti na adsorpciju preparata Rohalase® SEP-Visco na amino-CNC                                     | 72 |
| 4.3.1.2.2 | Efikasnost imobilizacije proteina preparata Rohalase® SEP-Visco na amino-CNC                                     | 73 |
| 4.3.1.2.3 | Efikasnost imobilizacije aktivnosti preparata Rohalase® SEP-Visco na amino-CNC                                   | 74 |
| 4.3.1.2.4 | Kinetika adsorpcije preparata Rohalase® SEP-Visco na amino-CNC .....                                             | 75 |

|           |                                                                                                                            |     |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.3.1.3   | Uporedna analiza adsorpcije preparata Rohalase® SEP-Visco na CNC i amino-CNC                                               | 76  |
| 4.3.1.4   | Kovalentna imobilizacija preparata Rohalase® SEP-Visco na oksidovanu nanocelulozu .....                                    | 78  |
| 4.3.1.4.1 | Efikasnost imobilizacije proteina preparata Rohalase® SEP-Visco na Ox-CNC                                                  | 79  |
| 4.3.1.4.2 | Efikasnost imobilizacije aktivnosti preparata Rohalase® SEP-Visco na Ox-CNC                                                | 81  |
| 4.3.1.4.3 | Kinetika kovalentne imobilizacije preparata Rohalase® SEP-Visco na Ox-CNC                                                  | 82  |
| 4.3.1.4.4 | Desorpcija preparata Rohalase® SEP-Visco imobilisanog na Ox-CNC .....                                                      | 82  |
| 4.3.1.5   | Kovalentna imobilizacija preparata Rohalase® SEP-Visco na GA-aktiviranu amino-modifikovanu nanocelulozu.....               | 83  |
| 4.3.1.5.1 | Efikasnost imobilizacije proteina preparata Rohalase® SEP-Visco na GA-amino-CNC .....                                      | 84  |
| 4.3.1.5.2 | Efikasnost imobilizacije aktivnosti preparata Rohalase® SEP-Visco na GA-amino-CNC .....                                    | 86  |
| 4.3.1.5.3 | Kinetika imobilizacije preparata Rohalase® SEP-Visco na GA-amino-CNC..                                                     | 87  |
| 4.3.1.5.4 | Desorpcija preparata Rohalase® SEP-Visco imobilisanog na GA-amino-CNC                                                      | 88  |
| 4.3.1.6   | Uporedna analiza kovalentne imobilizacije preparata Rohalase® SEP-Visco na Ox-CNC i GA-amino-CNC.....                      | 88  |
| 4.3.1.7   | Poređenje imobilizacije adsorpcijom i kovalentne imobilizacije preparata Rohalase® SEP-Visco na nanocelulozne nosače ..... | 90  |
| 4.3.2     | Imobilizacija enzimskog preparata Pectinex® Ultra SP-L na nanocelulozne nosače                                             | 91  |
| 4.3.2.1   | Imobilizacija preparata Pectinex® Ultra SP-L adsorpcijom na nemodifikovanu nanocelulozu .....                              | 93  |
| 4.3.2.1.1 | Uticaj pH vrednosti na efikasnost imobilizacije preparata Pectinex® Ultra SP-L adsorpcijom na CNC .....                    | 93  |
| 4.3.2.1.2 | Efikasnost imobilizacije proteina preparata Pectinex® Ultra SP-L na CNC....                                                | 94  |
| 4.3.2.1.3 | Efikasnost imobilizacije aktivnosti preparata Pectinex® Ultra SP-L na CNC .                                                | 95  |
| 4.3.2.1.4 | Kinetika imobilizacije preparata Pectinex® Ultra SP-L na CNC .....                                                         | 96  |
| 4.3.2.2   | Imobilizacija preparata Pectinex® Ultra SP-L adsorpcijom na amino-modifikovanu nanocelulozu .....                          | 98  |
| 4.3.2.2.1 | Uticaj pH vrednosti na efikasnost imobilizacije preparata Pectinex® Ultra SP-L adsorpcijom na amino-CNC.....               | 98  |
| 4.3.2.2.2 | Efikasnost imobilizacije proteina preparata Pectinex® Ultra SP-L na amino-CNC .....                                        | 99  |
| 4.3.2.2.3 | Efikasnost imobilizacije aktivnosti preparata Pectinex® Ultra SP-L na amino-CNC .....                                      | 100 |
| 4.3.2.2.4 | Kinetika adsorpcije preparata Pectinex® Ultra SP-L na amino-CNC .....                                                      | 101 |

|             |                                                                                                                |     |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.3.2.3     | Uparedna analiza adsorpcije preparata Pectinex® Ultra SP-L na CNC i amino-CNC                                  | 102 |
| 4.3.2.4     | Kovalentna imobilizacija preparata Pectinex® Ultra SP-L na oksidovanu nanocelulozu .....                       | 104 |
| 4.3.2.4.1   | Efikasnost imobilizacije proteina preparata Pectinex® Ultra SP-L na Ox-CNC                                     | 104 |
| 4.3.2.4.2   | Efikasnost imobilizacije aktivnosti preparata Pectinex® Ultra SP-L na Ox-CNC                                   | 106 |
| 4.3.2.4.3   | Kinetika kovalentne imobilizacije preparata Pectinex® Ultra SP-L na Ox-CNC                                     | 107 |
| 4.3.2.4.4   | Desorpcija preparata Pectinex® Ultra SP-L imobilisanog na Ox-CNC .....                                         | 108 |
| 4.3.2.5     | Kovalentna imobilizacija preparata Pectinex® Ultra SP-L na GA-aktiviranu amino-modifikovanu nanocelulozu ..... | 108 |
| 4.3.2.5.1   | Efikasnost imobilizacije proteina preparata Pectinex® Ultra SP-L na GA-amino-CNC .....                         | 109 |
| 4.3.2.5.2   | Efikasnost imobilizacije aktivnosti preparata Pectinex® Ultra SP-L na GA-amino-CNC .....                       | 110 |
| 4.3.2.5.3   | Kinetika imobilizacije preparata Pectinex® Ultra SP-L na GA-amino-CNC.                                         | 111 |
| 4.3.2.6     | Uparedna analiza kovalentne imobilizacije preparata Pectinex® Ultra SP-L na Ox-CNC i GA-amino-CNC .....        | 112 |
| 4.3.2.7     | Poređenje adsorpcije i kovalentne imobilizacije preparata Pectinex® Ultra SP-L na nanocelulozi .....           | 113 |
| 4.3.3       | Imobilizacija proteaza na nanocelulozu .....                                                                   | 114 |
| 4.3.3.1     | Imobilizacija enzimskog preparata Alcalase® .....                                                              | 115 |
| 4.3.3.1.1   | Kovalentna imobilizacija preparata Alcalase® na oksidovanu nanocelulozu                                        | 117 |
| 4.3.3.1.1.1 | Efikasnost imobilizacije proteina preparata Alcalase® na Ox-CNC .....                                          | 117 |
| 4.3.3.1.1.2 | Efikasnost imobilizacije aktivnosti preparata Alcalase® na Ox-CNC ....                                         | 118 |
| 4.3.3.1.1.3 | Kinetika kovalentne imobilizacije preparata Alcalase® na Ox-CNC .....                                          | 119 |
| 4.3.3.1.1.4 | Desorpcija kovalentno vezanog preparata Alcalase® na Ox-CNC .....                                              | 120 |
| 4.3.3.1.2   | Kovalentna imobilizacija preparata Alcalase® na GA-aktiviranu amino-modifikovanu nanocelulozu .....            | 120 |
| 4.3.3.1.2.1 | Efikasnost imobilizacije proteina preparata Alcalase® na GA-amino-CNC                                          | 120 |
| 4.3.3.1.2.2 | Efikasnost imobilizacije aktivnosti preparata Alcalase® na GA-amino-CNC                                        | 121 |
| 4.3.3.1.2.3 | Kinetika imobilizacije preparata Alcalase® na GA-amino-CNC .....                                               | 122 |
| 4.3.3.1.2.4 | Desorpcija kovalentno vezanog preparata Alcalase® na GA-amino-CNC                                              | 123 |
| 4.3.3.1.3   | Uparedna analiza kovalentne imobilizacije preparata Alcalase® na Ox-CNC i GA-amino-CNC .....                   | 124 |

|             |                                                                                                                                                 |     |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.3.3.2     | Imobilizacija enzimskog preparata Flavourzyme® .....                                                                                            | 125 |
| 4.3.3.2.1   | Kovalentna imobilizacija preparata Flavourzyme® na oksidovanu nanocelulozu<br>126                                                               |     |
| 4.3.3.2.1.1 | Efikasnost imobilizacije proteina preparata Flavourzyme® na Ox-CNC                                                                              | 126 |
| 4.3.3.2.1.2 | Efikasnost imobilizacije proteolitičke aktivnosti preparata Flavourzyme®<br>na Ox-CNC                                                           | 127 |
| 4.3.3.2.1.3 | Efikasnost imobilizacije egzopeptidazne aktivnosti preparata<br>Flavourzyme® na Ox-CNC .....                                                    | 128 |
| 4.3.3.2.1.4 | Kinetika kovalentne imobilizacije preparata Flavourzyme® na Ox-CNC<br>130                                                                       |     |
| 4.3.3.2.1.5 | Desorpcija preparata Flavourzyme® imobilisanog na Ox-CNC .....                                                                                  | 131 |
| 4.3.3.2.2   | Kovalentna imobilizacija preparata Flavourzyme® na GA-aktiviranu amino-<br>modifikovanu nanocelulozu .....                                      | 132 |
| 4.3.3.2.2.1 | Efikasnost imobilizacije proteina preparata Flavourzyme® na<br>GA-amino-CNC .....                                                               | 132 |
| 4.3.3.2.2.2 | Efikasnost imobilizacije endopeptidazne aktivnosti preparata<br>Flavourzyme® na GA-amino-CNC .....                                              | 133 |
| 4.3.3.2.2.3 | Efikasnost imobilizacije egzopeptidazne aktivnosti preparata<br>Flavourzyme® na GA-amino-CNC .....                                              | 134 |
| 4.3.3.2.2.4 | Kinetika imobilizacije preparata Flavourzyme® na GA-amino-CNC.....                                                                              | 135 |
| 4.3.3.2.2.5 | Desorpcija preparata Flavourzyme® imobilisanog na GA-amino-CNC .                                                                                | 136 |
| 4.3.3.2.3   | Uporedna analiza kovalentne imobilizacije preparata Flavourzyme® na<br>Ox-CNC i GA-amino-CNC .....                                              | 137 |
| 4.3.3.3     | Poređenje kovalentne imobilizacije preparata Alcalase® i Flavourzyme® na<br>oksidovanoj i GA-aktiviranoj amino-modifikovanoj nanocelulozi ..... | 138 |
| 4.4         | PRIMENA IMOBILISANIH ENZIMA .....                                                                                                               | 139 |
| 4.4.1       | Primena imobilisanog preparata Rohalase® SEP Visco u hidrolizi ksilanske frakcije<br>suncokretove sačme .....                                   | 140 |
| 4.4.1.1     | Analiza aktivnosti i stabilnosti imobilisanog enzima .....                                                                                      | 140 |
| 4.4.1.2     | Analiza prebiotske aktivnosti proizvoda hidrolize.....                                                                                          | 144 |
| 4.4.2       | Primena imobilisanog preparata Pectinex® Ultra SP L u hidrolizi pektina .....                                                                   | 147 |
| 4.4.2.1     | Primena imobilisanog Pectinex® Ultra SP-L u hidrolizi pektina sačme uljane repice<br>147                                                        |     |
| 4.4.2.1.1   | Analiza efikasnosti u hidrolizi pektina iz sačme uljane repice .....                                                                            | 147 |
| 4.4.2.2     | Primena imobilisanog Pectinex® Ultra SP-L u hidrolizi pektina crne ribizle .....                                                                | 151 |
| 4.4.2.2.1   | Analiza aktivnosti u hidrolizi pektina crne ribizle .....                                                                                       | 151 |
| 4.4.2.3     | Analiza stabilnosti imobilisanog preparata Pectinex® Ultra SP-L.....                                                                            | 153 |
| 4.4.2.4     | Analiza prebiotske aktivnosti proizvoda hidrolize pektina.....                                                                                  | 154 |
| 4.4.2.5     | Poređenje hidrolize različitih pektinskih supstrata .....                                                                                       | 160 |

|       |                                                                                                                  |     |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.4.3 | Primena imobilisanih preparata Alcalase® i Flavourzyme® u hidrolizi proteinske frakcije suncokretove sačme ..... | 161 |
| 5     | ZAKLJUČAK .....                                                                                                  | 167 |
| 6     | LITERATURA.....                                                                                                  | 169 |

# 1 UVOD

Rastući globalni izazov upravljanja nusproizvodima prehrambene industrije predstavlja jedan od značajnih izazova današnjice, ali istovremena otvara prostor za razvoj inovativnih biotehnoloških rešenja. Enzimaska obrada omogućava transformaciju ovih materijala u proizvode visoke dodate vrednost. Ovaj pristup je u skladu sa svetskim naporima za smanjenje količine otpada, i sa principima cirkularne bioekonomije.

Imobilizacija enzima, je jedna od ključnih strategija za njihovu industrijsku primenu, pre svega radi unapređenja stabilnosti enzima, i omogućavanja njegove višestruke upotrebe, što je od izuzetnog ekonomskog značaja [1]. Imobilizacija enzima donosi i niz dodatnih prednosti u industriji hrane: bolju kontrolu enzimske reakcije, eliminaciju potrebe za termičkom inaktivacijom enzima i jednostavnije prečišćavanje proizvoda [2]. Nanomaterijali su posebno atraktivni za imobilizaciju enzima zbog velike specifične površine koja omogućava vezivanje značajne količine enzima [3]. U novijim istraživanjima, nanoceluloza privlači posebnu pažnju naučne zajednice kao održiv i ekološki prihvatljiv nosač za imobilizaciju enzima [4]. Nanoceluloza se izdvaja kao izuzetno atraktivan nosač zbog sledećih karakteristika [5]:

1. Dobija se iz obnovljivih izvora, relativno jednostavnim postupcima;
2. Ekonomski je isplativija u poređenju sa sintetičkim polimerima;
3. Biodegradabilna je što je čini ekološki prihvatljivom.

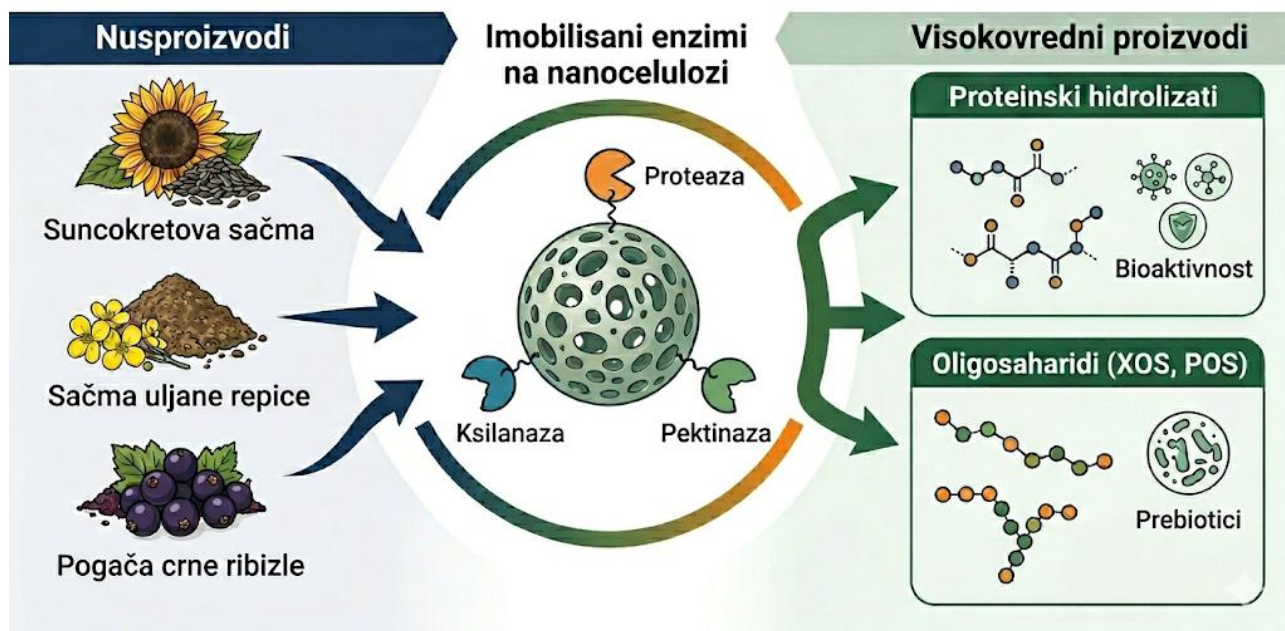
U industriji prehrambenih proizvoda, enzimi predstavljaju tehnološki i ekološki prihvatljiviji izbor za reakcije hidrolize u odnosu na hemijske metode [6, 7]. Pored toga, primenom enzima procesi obrade nusproizvoda prehrambene industrije su ekološki prihvatljiviji i nemaju negativan uticaj na životnu sredinu, pri čemu su visoko efikasni i u potpunosti se zasnivaju na principima cirkularne ekonomije i iskorišćenja otpada [8]. Imajući ovo u vidu, enzimski procesi imaju značajne prednosti u odnosu na druge procese.

Izbor odgovarajućeg nosača predstavlja ključan faktor za uspešnu imobilizaciju, te stoga, celulozni nanomaterijali privlače posebnu pažnju naučne zajednice. Nanoceluloza, bez ikakve obrade, se može upotrebiti za jednostavnu adsorpciju enzima, dok se njenom hemijskom modifikacijom dobija nosač pogodan i za adsorpciju i za kovalentnu imobilizaciju enzima [4]. Kada je reč o primeni imobilisanih enzima u prehrambenoj industriji kovalentna imobilizacija je od posebnog značaja jer sprečava kontaminaciju finalnog proizvoda enzimima koji mogu izazvati alergijske reakcije, a takođe omogućava ponovnu upotrebu u većem broju ciklusa u odnosu na adsorpciju. Međutim, iako kovalentno vezivanje predstavlja stabilniju metodu imobilizacije, treba imati u vidu da u toku same reakcije može doći do inaktivacije enzima [4]. Generalno, imobilizacija enzima donosi brojne prednosti u industriji hrane, uključujući veću ekonomsku isplativost, bolju kontrolu enzimske reakcije, eliminaciju potrebe za termičkom inaktivacijom enzima i jednostavnije prečišćavanje proizvoda [2].

Hidrolitički enzimi poput proteaza, ksilanaza i pektinaza imaju ključnu ulogu u preradi nusproizvoda industrije hrane kao što su sačme uljarica i pogače bobičastog voća. Sačme uljarica sadrže visoke udele proteina i ugljenih hidrata, dok su pogače bobičastog voća bogate pre svega ugljenim hidratima [9, 10]. Enzimaska hidroliza omogućava značajno poboljšanje nutritivne vrednosti ovih nusproizvoda transformacijom u funkcionalna jedinjenja kao što su hidrolizati proteina i oligosaharidi [11-14]. Iskorišćenje ovih nusproizvoda u skladu je sa principima održivog razvoja i cirkularne bioekonomije [15]. Razdvajanjem ovih otpadnih materija na frakcije, a potom njihovom ciljanom enzimskom preradom, mogu se dobiti industrijski značajna jedinjenja, čime se istovremeno povećava vrednost otpadnih proizvoda i smanjuje količina otpada [15].

U ovom radu nanoceluloza će biti iskorišćena kao nosač za imobilizaciju enzima (ksilanaza, pektinaza i proteaza) pri čemu će biti prikazana njena primena za imobilizaciju enzima koji se mogu koristiti u

procesima dobijanja visokovrednih jedinjenja iz odabranih frakcija nusproizvoda industrije hrane. Primljeni postupci omogućavaju dobijanje proizvoda značajnih za ljudsku i životinjsku ishranu, kao što su proteinski hidrolizati i oligosaharidi sa prebiotskim potencijalom – ksiloooligosaharidi (XOS) i pektinski oligosaharidi (POS). Šematski prikaz koncepta istraživanja prikazan je na slici 1.1.



Slika 1.1. Šematski prikaz koncepta istraživanja: imobilizacija hidrolitičkih enzima (proteaza, ksilanaza i pektinaza) na nanocelulozi i njihova primena u enzimskoj obradi nusproizvoda prehrambene industrije (suncokretova sačma, sačma uljane repice, pogača crne ribizle) radi dobijanja proteinskih hidrolizata i oligosaharida (XOS, POS) [16].

## 2 TEORIJSKI DEO

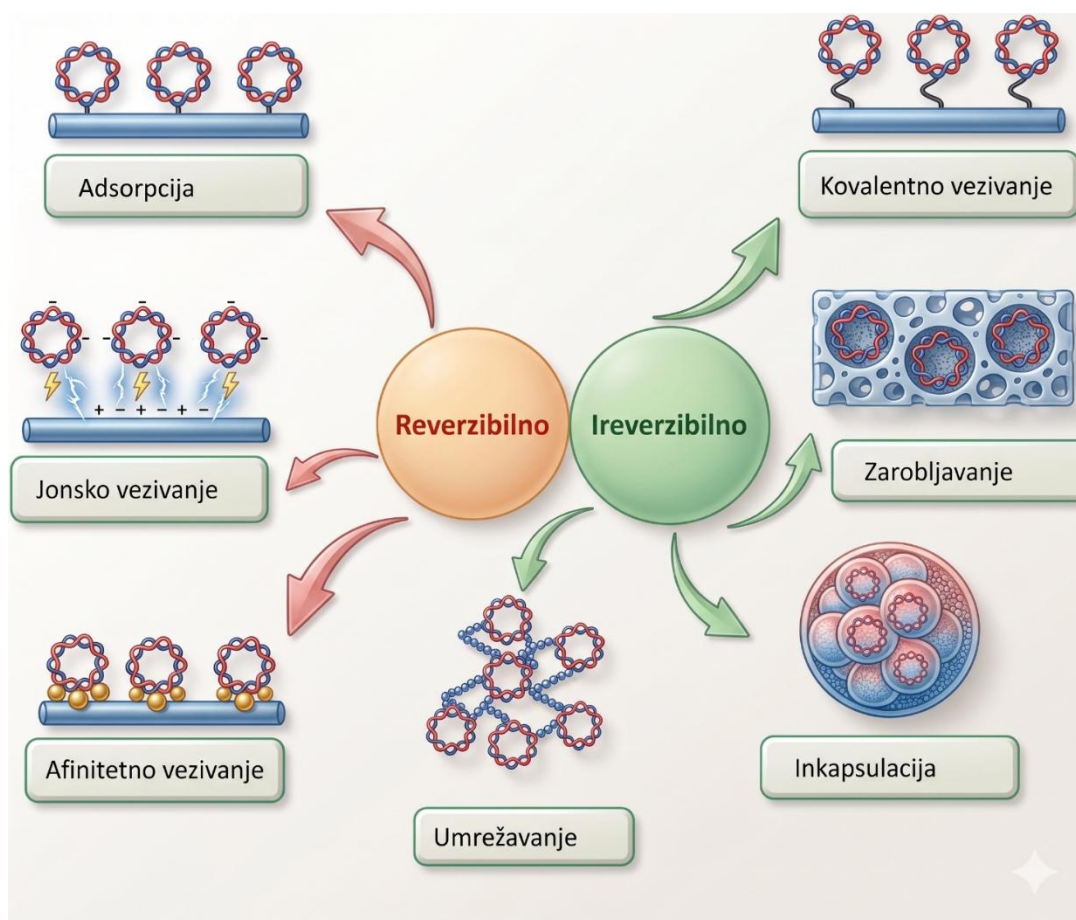
### 2.1 POJAM, SVRHA I METODE IMOBILIZACIJE ENZIMA

Ideja imobilizacije enzima je nastala početkom 20. veka, kao koncept koji podrazumeva vezivanje molekula enzima koji su se slobodno kretali u rastvoru na čvrste materijale [17]. Prvi enzim koji je ovako imobilisan još 1916. godine je enzim invertaza, što je postala osnova za imobilizaciju enzima koju poznajemo danas [17]. Enzimi predstavljaju ključne biomolekule u različitim industrijskim granama kao što su prehrambena industrija (proizvodnja mlečnih proizvoda, transformacija skroba, pekarska industrija, proizvodnja napitaka), tekstilna, papirna, kozmetička, hemijska, industrija deterdženata, a u poslednje vreme u inovativnim i novim oblastima kao što su biosenzori, biogoriva i tretman otpadnih voda [1]. Međutim, važno je istaći da enzimi sami po sebi nisu optimalni za korišćenje u industriji iz više razloga: rastvorljivi su, često nestabilni, a u nekim slučajevima može doći do inhibicije aktivnosti supstratom ili proizvodom reakcije [18].

Danas, postoji preko 10.000 naučnih radova, i veliki broj патената koji se bave temom imobilizacije enzima, a dosta njih je već i ušlo u komercijalnu upotrebu, na primer imobilisane penicilin G acilaza, invertaza, lipaze i proteaze [17]. Glavni razlozi zašto se u industrijskim procesima teži ka korišćenju imobilisanih enzima su pre svega kako bi se omogućila ponovna upotreba enzima, čime se smanjuju troškovi reakcije i kako bi se olakšalo izdvajanje enzima iz reakcione smeše, čime se smanjuju troškovi prečišćavanja [19]. Imobilizacija enzima štiti molekule enzima od proteolize (u slučaju prisustva proteolitičkih enzima), omogućava bolju kontrolu nad reakcijom a takođe može se koristiti i ko-imobilizacija više enzima kako bi se omogućila reakcija sa više koraka [17]. Naravno, postoje i određeni izazovi koji prate imobilizaciju enzima kao što su: gubitak katalitičke aktivnosti, limitacije u prenosu mase, limitacije u slučaju „scale-up“ procesa kako bi se održale konzistentna katalitička aktivnost i stabilnost, kao i degradacija nosača enzima i njegova cena [20]. Navedene prednosti i izazovi su glavni pokretači stalnog razvoja u ovoj oblasti, pre svega raznih metoda imobilizacije, ali i novih i unapređenih nosača za imobilizaciju različitih enzima.

#### 2.1.1 Metode imobilizacije enzima

Metode imobilizacije enzima se mogu podeliti na reverzibilne i ireverzibilne [1]. Na slici 2.1. je prikazana podela metoda imobilizacije i navedene su različite metode. U reverzibilne metode spada fizička adsorpcija, koja može biti specifična (jonska, afinitetna) i nespecifična, dok u ireverzibilne spadaju kovalentna imobilizacija, imobilizacija enzima u polimerne mreže, mikroinkapsulacija i umrežavanje enzima bifunkcionalnim reagensima [1, 21]. U ovom radu će biti najviše reči o kovalentnoj imobilizaciji i fizičkoj adsorpciji, metodama kod kojih se enzim vezuje (ireverzibilno ili reverzibilno) za površinu, odnosno u porama čvrstog nosača. Preostale metode podrazumevaju obuhvatanje enzima nosačem (imobilizacija enzima u polimerne mreže i mikroinkapsulacija), odnosno unakrsno povezivanje molekula enzima bez prisustva nosača [1].



Slika 2.1. Metode imobilizacije enzima [1].

Adsorpcija je fenomen koji se dešava na granici dve faze, kada se iz fluida molekul prenosi na čvrstu površinu, zbog postojanja slabih, nekovalentnih interakcija između molekula i površine [22]. Ovaj proces je reverzibilan i termin koji se koristi za suprotan proces adsorpcije je desorpcija [22]. Adsorpcija enzima predstavlja proces u kome je molekul enzima taj koji se prenosi iz tečne faze na čvrstu površinu [1]. Slabe veze koje nastaju između enzima i površine mogu biti van der Valsove i vodonične veze, hidrofobne interakcije i jonske, odnosno polarne interakcije, pa su naelektrisanje molekula enzima i čvrste površine i hidrofobnost veoma značajne osobine za ovaj tip imobilizacije [1]. Ovom metodom se veoma lako mogu dobiti imobilisani enzimi, jednostavno i brzo, bez upotrebe hemikalija koje mogu uticati na aktivnost enzima, a nosači se mogu reciklirati pošto se enzim može nakon reakcije desorbovati [1]. Glavni nedostatak ove metode je upravo to što se desorpcija može desiti i tokom enzimske reakcije, i on se može rešiti stvaranjem kovalentnih veza između enzima i nosača [1].

Kovalentna imobilizacija predstavlja metodu izbora, posebno u industrijskim procesima, jer ne dolazi do desorpcije enzima [23]. Enzim se kovalentno vezuje preko svojih funkcionalnih grupa kao što su amino, karboksilna, fenolna, sulfhidrilna, imidazolna, indolna i hidroksilna, i funkcionalnih grupa prisutnih na nosaču [23]. Ostale prednosti koje pruža kovalentna imobilizacija se ogledaju u otpornosti enzima na spoljne uslove kao što su temperatura, ekstremni pH uslovi i prisustvo organskih rastvarača [20]. Kovalentna imobilizacija ima i određene nedostatke. Proces imobilizacije može biti kompleksan, u nekim slučajevima zahteva aktivaciju nosača ili u specijalnim slučajevima aktivaciju grupa molekula enzima što može dovesti do denaturacije, vreme imobilizacije je duže u odnosu na jednostavniju metodu adsorpcije, a i udeo imobilisanog enzima je uglavnom niži [23]. Za aktivaciju nosača najčešće se koriste glutaraldehid, karbodiimidi ili epihlorhidrin, čime se na površinu nosača uvode aldehidne, karboksilne, odnosno epoksidne reaktivne grupe [21]. U većini slučajeva

kovalentno imobilisan enzim ispoljava nižu aktivnost ali ima veću stabilnost, i može se upotrebiti nekoliko puta što opravdava upotrebu ove metode imobilizacije [20].

### **2.1.2 Nosači za imobilizaciju enzima**

Idealan materijal koji se koristi kao nosač za imobilizaciju bi trebalo da poseduje sledeće osobine: nisku cenu, inertnost, stabilnost, dobre mehaničke osobine, sposobnost da pospeši specifičnost ili aktivnost enzima, regenerativnost, sposobnost da umanjuje inhibiciju i da spreči nespecifičnu adsorpciju i kontaminaciju [24]. Mali broj materijala se odlikuje svim navedenim karakteristikama, te je neophodno, imajući u vidu krajnju primenu imobilisanog enzima, analizirati i evaluirati sve prednosti i ograničenja odabranog nosača. Radi lakšeg odabira potencijalnog nosača, odnosno njegovih karakteristika, postoji široka podela nosača koji se koriste za imobilizaciju na neorganske i organske [23].

#### *2.1.2.1 Neorganski nosači za imobilizaciju*

Neorganski nosači imaju veoma rasprostranjenu upotrebu pošto su termički i mehanički stabilni, otporni su na mikrobnu kontaminaciju, rigidni su ali je njihov nedostatak nemogućnost dobijanja različitih geometrijskih oblika, a podložni su krunjenju tokom mešanja [23, 24]. Lako se dobijaju, ili se mogu naći u prirodi, i ovi materijali su relativno jeftini [25]. Najčešće korišćeni materijali su silika i drugi neorganski oksidi (titanijuma, aluminijuma, cirkonijuma) i materijali na bazi ugljenika, ali u poslednjih nekoliko godina sve popularniji su magnetni nosači, keramički, ugljenične nanocevi, grafen, grafen oksid [23].

Ovi materijali se mogu koristiti i u obliku nanočestica. Najviše se upotrebljavaju nanočestice zlata, grafena, titanijuma i silike, a upotreba im je rasprostranjena s obzirom da imaju visoke prinose imobilizacije, dok imobilisani enzimi imaju visoku katalitičku aktivnost [23]. Ove osobine su posledica velike površine dostupne za vezivanje enzima [24].

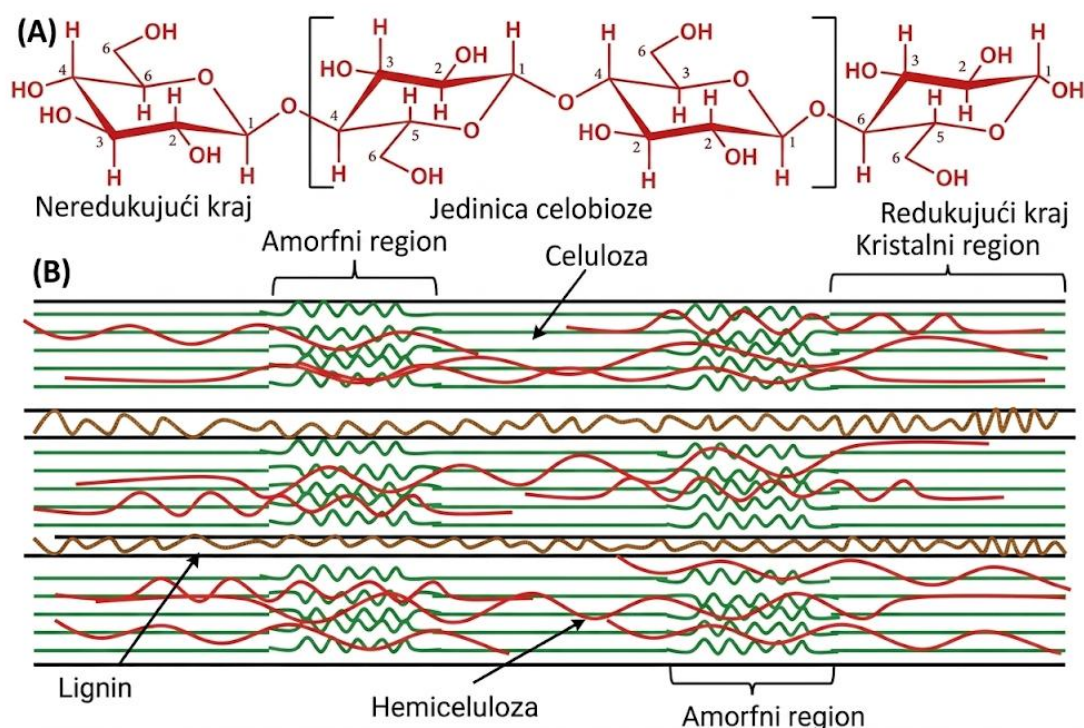
#### *2.1.2.2 Organski nosači za imobilizaciju*

Organski nosači za imobilizaciju se dalje dele u dve velike grupe: prirodni i sintetički polimeri [23]. Prirodni polimeri koji se najčešće koriste u imobilizaciji su celuloza, škrob, agaroz, alginat, hitozan i hitin, kolagen, pektin, umreženi dekstran, želatin, kolagen, karaginan, fibroin svile [23, 25]. Prirodni polimerni materijali se odlikuju visokim afinitetom ka vezivanju proteina, biokompatibilnošću, biodegradabilnošću, nisu toksični, mogu imati antibakterijska svojstva, neki mogu formirati gelove, i u većini slučajeva su inertni, ali njihov nedostatak je niska mehanička stabilnost u odnosu na neorganske nosače i sintetičke polimere [25]. Za razliku od neorganskih materijala, biopolimeri se mogu naći u raznolikim geometrijskim oblicima, a u njihovoj strukturi mogu biti prisutne razne hemijske grupe (hidroksilne, amino, karboksilne) koje se mogu upotrebiti za imobilizaciju enzima adsorpcijom ili kovalentnim vezivanjem [23]. Sintetički polimeri se dobijaju hemijskom sintezom i imaju visoku čistoću, definisanu hemijsku strukturu i uniformnost, a u toku sinteze se mogu definisati njihova poroznost i uvesti različite funkcionalne grupe [23, 25]. Međutim, proces sinteze ovih materijala je često zametan, a može biti i veoma skup [23]. Postoji veliki broj sintetičkih polimera sa najrazličitijim osobinama, najčešće se koriste akrilamid, polianilin, polietilen glikol, poli-orto-toluidini, polipropilen, poliacetonitril i najlon [23, 25]. Fokus ovog rada će biti celuloza, odnosno nanoceluloza, i njena upotreba kao nosač za imobilizaciju enzima.

## 2.2 CELULOZA KAO NOSAČ ZA IMOBILIZACIJU ENZIMA

### 2.2.1 Celuloza

Celuloza je jedan od najrasprostranjenijih polisaharida u prirodi. Ovaj biopolimer je bioobnovljiv, biokompatibilan, biorazgradiv, hemijski stabilan i ekološki prihvatljiv [26]. Lako je dostupan iz biljnih izvora poput drvne mase i pamuka, a takođe ga mogu sintetisati alge, gljive i bakterije pa se smatra veoma ekonomičnim materijalom [26]. U hemijskoj strukturi celuloze se nalaze linearni lanci D-glukoze koji su povezani  $\beta(1 \rightarrow 4)$  glikozidnim vezama (Slika 2.2. (A)), sa brojnim slobodnim -OH grupama koje formiraju intra- i intermolekulske vodonične veze [27]. Celuloza u svojoj makro strukturi ima uređene i neuređene domene, nazvane kristalni i amorfni regioni, a u svom prirodnom stanju se nalazi u strukturi lignoceluloznog kompleksa, koji čine lignin, hemiceluloza i celuloza (Slika 2.2. (B)). Amorfni regioni su manje gustine, i reaktivniji su, te se tu odvija većina hemijskih reakcija, dok su kristalni domeni generalno otporniji na hemijske, mehaničke i enzimске tretmane [28]. Kao posledica ovakve strukture, mikrofibrile celuloze imaju dobre mehaničke osobine i strukturnu raznovrsnost [28].



Slika 2.2. Linearna struktura celuloze (A) i šematski prikaz rasporeda celuloze, hemiceluloze i lignina u lignoceluloznom matriksu, sa naizmeničnim kristalnim i amornim regionima (B). [29]

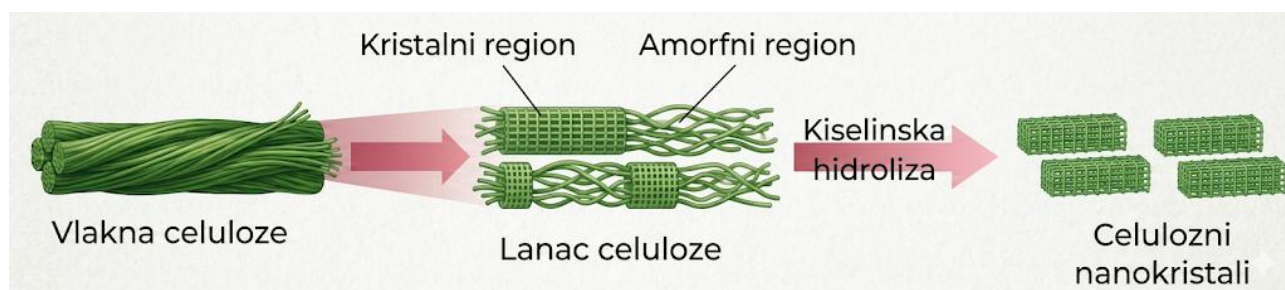
Izvor celuloze, poreklo i zrelost, kao i pretretmani i tehnološki procesi, mogu biti raznovrsni, i time se može dobiti celuloza različitih osobina [28]. Tako da se može smatrati da je svaki celulozni materijal na neki način jedinstven, u zavisnosti od navedenih faktora uzgoja ali i procesiranja ovih materijala. Celuloza se može koristiti kao nosač za imobilizaciju enzima u različitim oblicima, od mikro-materijala kao što su pulpa, celulozna vlakna, mikrokristalna celuloza, celulozne mikrosfere, hidrogel mikrosfere od celuloze (koji zahtevaju različite stepene obrade), do potpuno prerađenih nano-materijala kao što su nanocelulozna vlakna i kristalna nanoceluloza [27, 30-32]. Bakterijska celuloza, ili bakterijska nanoceluloza, predstavlja posebnu kategoriju celuloze, bez primesa lignina ili hemiceluloze, i njene osobine se mogu precizno podesiti kroz različite uslove fermentacije [33]. Svi ovi oblici celuloze uspešno su korišćeni kao nosači za imobilizaciju različitih enzima primenom raznih tehnika imobilizacije [30, 32, 34-44]. Raznovrsnost u oblicima celuloze koji se mogu naći u

prirodi ili sintetisati, kao i izuzetna sposobnost hemijske modifikacije čine ovaj biopolimer pogodnim nosačem za imobilizaciju enzima.

## 2.2.2 Nanoceluloza

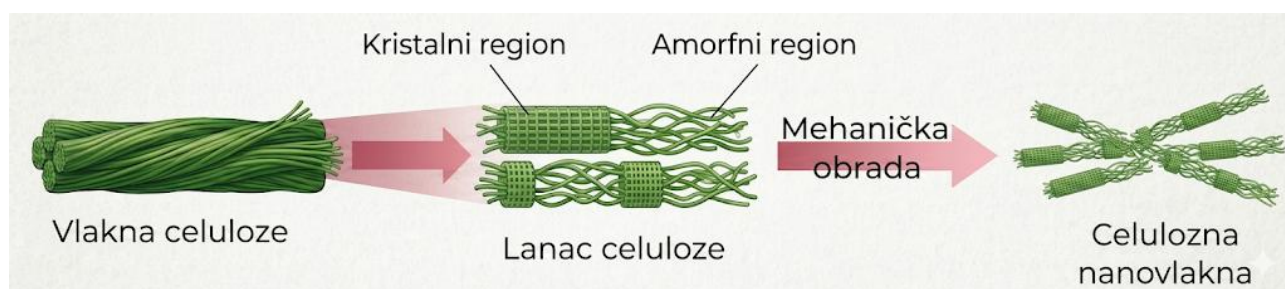
Nanocelulozni materijali predstavljaju visokoefikasan nosač za imobilizaciju enzima zahvaljujući opisanim strukturnim karakteristikama celuloze, s tim što imaju i dodatne prednosti zbog svojih nano dimenzija. Nanočestice celuloze mogu se dobiti mehaničkim ili hemijskim procesima [45]. Kao posledica opštih svojstava celuloze i njene strukture, mogu se dobiti nanocelulozna vlakna različite strukture, što zavisi od izvora celuloze i metode ekstrakcije [46]. Raznolikost nanoceluloznih čestica dovela je do potrebe za standardizacijom nomenklature, koju je izvršilo Tehničko udruženje za celuloznu i papirnu industriju (TAPPI) prema standardu TAPPI WI 3021 [28].

Celulozni nanokristali (CNC) se dobijaju kiselinskom hidrolizom, koja deluje pre svega na amorfne delove, ostavljajući visokokristalne nanočestice štapičastog oblika, kao što je prikazano na slici 2.3. [47]. Ova vlakna su veličine 4–70 nm u širini a imaju dužinu od 100–6000 nm, i karakteriše ih visok stepen kristaliničnosti [28].



Slika 2.3. Šema dobijanja nanokristalne celuloze procesom kiselinske hidrolize [47].

S druge strane, celulozna nanovlakna (CNF) se dobijaju mehaničkom obradom [47], dugačka su i fleksibilna, a sastoje se od kristalnih i amorfni regiona, kao što je prikazano na slici 2.4. [47]. Celulozna nanovlakna su šira i duža u odnosu na nanokristale, (širina 20–100 nm, dužina preko 10000 nm), karakteriše ih mrežasta struktura i niži stepen kristaliničnosti [28].



Slika 2.4. Šema nanofibrilarne celuloze koja se dobija iz celuloze primenom mehaničke obrade kojom se usitnjavaju vlakna do nanometarske veličine [47].

Bakterijska nanoceluloza, vrsta nanoceluloze koja se ne dobija od celuloze već bakterijskom fermentacijom je najekonomičniji bionanomaterijal [28]. Proizvode je bakterije bez potrebe za hemijskim ili mehaničkim pre tretmanima, što je čini ekološki prihvatljivijom i dostupnijom od nanoceluloze koja se dobija iz celuloze [47].

U standardizovane kategorije spadaju i nanostrukturne celulozne čestice kao što su mikrokristali i mikrofibrile celuloze [46]. Raznovrsnost u strukturi i svojstvima nanoceluloznih materijala, omogućava prilagodljivu primenu nanoceluloze u biotehnologiji, medicini i industriji.

### 2.2.3 Hemijska modifikacija celuloze i nanoceluloze

Celuloza i nanoceluloza su, pored drugih raznovrsnih primena, veoma interesantni i kao nosači za imobilizaciju enzima zbog svoje rasprostranjenosti, biorazgradljivosti i odličnih mehaničkih karakteristika. Dve najčešće korišćene metode za imobilizaciju enzima na celuloznim nosačima su kovalentno vezivanje i adsorpcija [4]. Kako bi se enzim kovalentno vezao za ovaj nosač potrebna je hemijska modifikacija slobodnih funkcionalnih grupa u strukturi celuloze uvođenjem funkcionalnih grupa poput  $\text{-NH}_2$ ,  $\text{-COOH}$  ili  $\text{-CHO}$ , koje omogućavaju reakciju između funkcionalnih grupa enzima i nosača [48]. Imobilizacija adsorpcijom je nešto jednostavnija pošto je omogućena i samo korišćenjem  $\text{-OH}$  grupa koje su već prisutne na površini celuloze/nanoceluloze [4]. Nedostatak je slabo naelektrisanje ovih funkcionalnih grupa, tako da se sposobnost adsorpcije enzima na ove nosače može poboljšati uvođenjem naelektrisanih grupa poput  $\text{-NH}_2$ ,  $\text{-COOH}$  [4].

Takođe, celuloza nalazi značajnu primenu kao nosač za razvoj biosenzora. Biosenzori se najčešće koriste u analitičke svrhe, a posebno pri razvoju imuno-testova u dijagnostičke svrhe [49]. S obzirom da se pri razvoju imunoloških testova takođe vezuju proteini, ali u ovom slučaju antitela, slične hemijske metode se mogu koristiti kao u slučaju imobilizacije enzima na ovaj materijal [49]. Stoga, napredak u istraživanju celuloze i nanoceluloze kao nosača za imobilizaciju enzima može doprineti napretku i u domenu razvoja biosenzora na bazi ovih materijala.

Metode koje se primenjuju za hemijsku modifikaciju celuloze i nanoceluloze su raznolike, a u ovom radu će posebno biti objašnjene one koje se koriste radi omogućavanja kovalentne imobilizacije enzima.

#### 2.2.3.1 Oksidacija celuloze

##### 1. Oksidacija natrijum-perjodatom ( $\text{NaIO}_4$ )

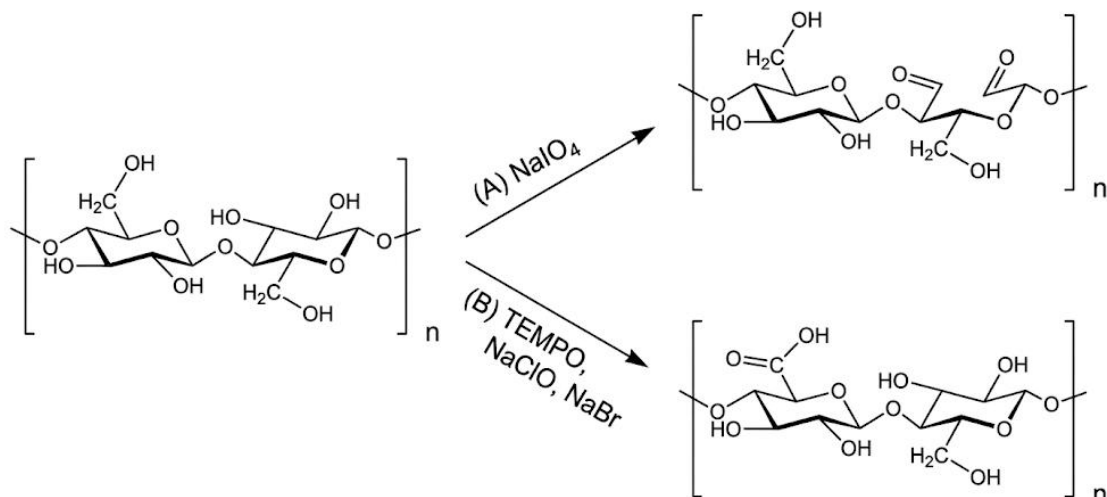
Ova metoda se koristi kako bi se omogućilo stvaranje kovalentnih veza između polisaharida (celuloze, ali i drugih polisaharida) i proteina, ili drugih molekula sa amino grupama [50]. Reakcija sa perjodatom je visokospecifična prema 1,2-dihidroksilnim (glikolnim) grupama, direktno ih pretvarajući u dialdehidne grupe bez odvijanja sporednih reakcija, kao što je prikazano na slici 2.5. (A). [30, 50]. Stvorene aldehidne grupe u kontaktu sa amino grupama proteina, formiraju Šifovu bazu [50]. Iako ovaj tip veze nije striktno kovalentan, smatra se jakom hemijskom vezom [51]. Da bi se postigla stabilna i nereverzibilna kovalentna veza može se izvršiti redukcija Šifove baze sa visokospecifičnim redukujućim sredstvom, najčešće natrijum-borohidridom ili natrijum-cijanoborohidridom [52, 53]. Ovaj korak, međutim, može negativno uticati na aktivnost i stabilnost enzima, tako da se ovaj drugi korak ne koristi uvek kako bi se očuvala aktivnost enzima, ali i radi jednostavnosti postupka, a ne doprinosi u značajnoj meri stabilnosti enzima [53].

Oksidacija perjodatom je jednostavna metoda, korišćena za imobilizaciju različitih molekula kao što su insulin ili antibiotici [30], a može se koristiti i za imobilizaciju antitela u biosenzorima [50] i enzima [30, 32, 44]. U neutralnim i baznim rastvorima, prelazak molekula u rastvor je minimalan (do 10%) [54].

##### 2. TEMPO oksidacija celuloze (TEMPO/ $\text{NaClO}$ / $\text{NaBr}$ )

Ova reakcija oksidacije se koristi za modifikaciju primarne hidroksilne grupe glukoze u karboksilne grupe (Slika 2.5. (B)) preko aldehidnih intermedijera [44]. Formiranjem karboksilnih grupa na površini celuloze ona postaje negativno naelektrisana, što može uticati i na smanjenje hidrofobnosti ovog materijala [55]. Oksidacija utiče na supramolekularnu i morfološku strukturu celuloze, povećavajući pristupačnost unutrašnje površine vlakana i kapacitet vezivanja [44]. Karboksilne grupe se mogu iskoristiti za jonsku adsorpciju enzima, koristeći negativno naelektrisanje ovih grupa [56]. Ukoliko bi se ove grupe koristile za kovalentno vezivanje enzima, mora se izvršiti prethodna aktivacija karboksilnih grupa sa karbodiimidom (npr. EDC) kako bi ove grupe mogle da reaguju sa amino grupama proteina [57].

Obe metode imaju široku primenu u biotehnologiji, od medicinskih uređaja do zelenih hemijskih procesa. Prilikom oksidacije može doći do promene strukture vlakana celuloze i nanoceluloze, što je veoma izraženo pri TEMPO oksidaciji, te se ova metoda manje koristi za oksidaciju već dobijene nanoceluloze, već se koristi kako bi se omogućilo istovremeno dobijanje nanoceluloze iz celuloze i uvođenje funkcionalnih grupa [58].



Slika 2.5. TEMPO-oksidacija hidroksilnih grupa celuloze do karboksilnih grupa (A) i oksidacija natrijum-perjodatom hidroksilnih grupa celuloze do aldehida (B).

#### 2.2.3.2 Silanizacija celuloze

Organosilani se najčešće upotrebljavaju kao reagensi za hemijsku modifikaciju silicijum-dioksida [59]. Mogu se koristiti i za modifikaciju nekih drugih materijala kao što su polisaharidi, na primer, celuloza/nanoceluloza i skrob [60-62]. Mehanizam reakcije polisaharida sa organosilanima je nešto drugačiji nego u slučaju nosača od silicijum-dioksida, i sastoji se iz tri koraka [63]:

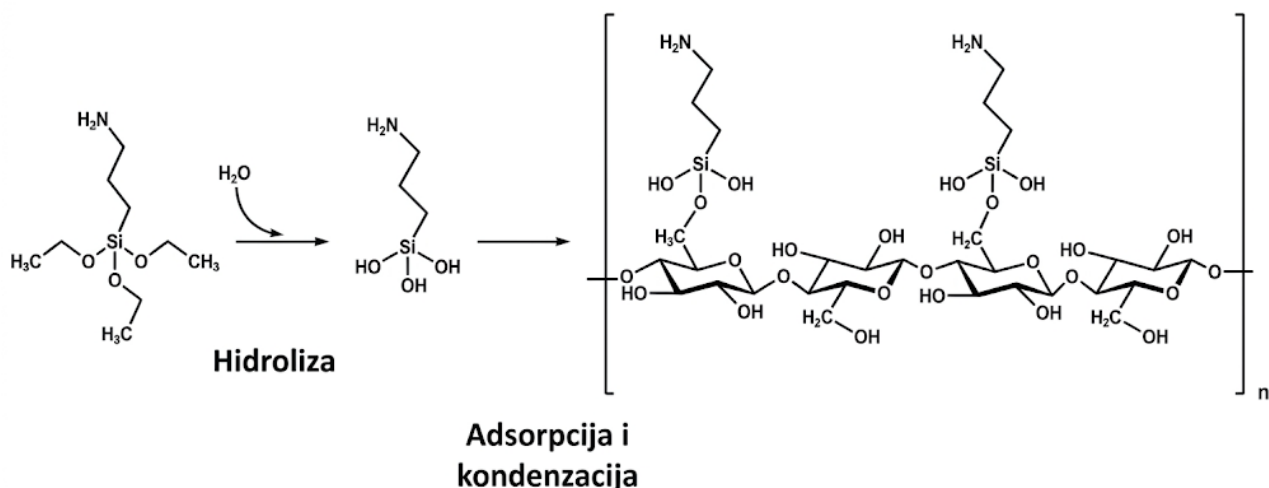
1. Hidroliza alkoksi grupa alkoksi-silana,
2. Adsorpcija silanolnih grupa na -OH grupe na površini polisaharida putem vodoničnih veza,
3. Hemijska kondenzacija i graftovanje na površinu polisaharida (formiranje Si-O-C veze).

Proces kondenzacije i graftovanja odvija se na višim temperaturama, stvarajući stabilnu vezu između Si-OH i C-OH [64]. Za imobilizaciju enzima najčešće korišćeni silani su APTES (3-aminopropiltriethoxysilan) i GPTMS (3-glicidoksi-propiltrimetoxysilan), pomoću kojih se uvode amino i epoksidne grupe.

##### 1. Amino-funkcionalizovana celuloza/nanoceluloza

Može se koristiti i kao nosač za jonsku adsorpciju ali i/ili kovalentno vezivanje enzima. Silanizacija organosilanima koji sadrže amino grupe čini površinu celuloze blago hidrofobnom [65]. Na slici 2.6. je šematski prikazana reakcija celuloze i aminosilana. Za kovalentno vezivanje, amino grupe na nosaču mogu se spojiti sa:

- Homobifunkcionalnim umreživačima (npr. glutaraldehyd, dimetil pimelimidat) za vezivanje sa amino grupama proteina,
- Heterobifunkcionalnim umreživačima za vezivanje grupa poput tiola (-SH) na proteinima.



Slika 2.6. Šema reakcije kondenzacije APTES i celuloze.

## 2. Epoksi-funkcionalizovana celuloza/nanoceluloza

Mehanizam reakcije uvođenja epoksi grupa silanizacijom je isti kao i u slučaju uvođenja amino grupa. Epoksidne grupe na nosaču reaguju sa amino grupama proteina, otvarajući prsten i formirajući stabilne kovalentne veze [66]. Ova metoda je jednostavna i efikasna za kovalentnu imobilizaciju enzima, ne zahteva dodatno aktiviranje funkcionalnih grupa niti stabilizovanje nastalih veza. Hidrofobnost se može neznatno povećati zbog strukture epoksidnih grupa [65].

### 2.2.3.3 Druge metode

Ostale metode koje se mogu naći u literaturi a koriste se za hemijsku modifikaciju celuloze/nanoceluloze radi uvođenja različitih funkcionalnih grupa za vezivanje proteina su:

1. Modifikacija cijanogen bromidom [39],
2. Modifikacija cijanurid hloridom [67].
3. Reakcija sa epihlorohidrinom [68],

Ove metode su namenjene dobijanju nosača koji mogu stvoriti isključivo kovalentne veze sa proteinima preko amino grupa lizina, pošto su sve ove funkcionalne grupe reaktivne i podložne nukleofilnom napadu amino grupe [39, 67, 68]. Navedene metode se češće primenjuju u razvoju biosenzora, nosača za vezivanje lekova i industrijskih katalizatora [39, 67, 68].

## 2.2.4 Imobilisani enzimi na celuloznim i nanoceluloznim nosačima

Imobilizacija enzima na celulozne i nanocelulozne nosače predstavlja značajan napredak u oblasti biokatalizatora. Ovi sistemi imobilisanih enzima ispoljavaju visoku stabilnost enzima, omogućuju ponovnu upotrebu katalizatora i očuvanje aktivnosti. U većini slučajeva razvoj ovih imobilisanih biokatalizatora podrazumeva vezivanje enzima na celulozu ili nanocelulozu putem adsorpcije ili kovalentnog vezivanja.

I celuloza i nanoceluloza se zbog svoje strukture lako hemijski modifikuju i predstavljaju materijale na koje se mogu imobilisati enzimi primenom raznih metoda, međutim treba istaći da nanoceluloza ima prednost visoke specifične površine za razliku od celuloze i time omogućava više prinose imobilizacije i bolju aktivnost imobilisanih enzima. Pregled enzima vezanih na nosače od celuloze ili nanoceluloze je predstavljen u tabelama 2.1. i 2.2. a ovi imobilisani biokatalizatori nalaze svoju primenu u procesima biokonverzije, proizvodnji biogoriva, remedijaciji životne sredine i razvoju biosenzora.

*Tabela 2.1. Primeri primene celuloznih nosača za imobilizaciju.*

| Enzim               | Nosač                   | Vrsta imobilizacije             | Funkcionalna grupa | Primena                   |      |
|---------------------|-------------------------|---------------------------------|--------------------|---------------------------|------|
| Invertaza           | Celulozna matrica       | Kovalentno vezivanje            | -NH <sub>2</sub>   | Proces u šaržnom reaktoru | [43] |
|                     |                         |                                 | -COOH              |                           |      |
|                     |                         |                                 | -DEAE              |                           |      |
| Tripsin             | Celuloza – pamuk        | Adsorpcija                      | -COOH              | Tretman rana              | [44] |
|                     |                         | Adsorpcija/Kovalentno vezivanje | -COOH/-CHO         |                           |      |
| Tripsin             | Celuloza – viskoza      | Kovalentno vezivanje            | -CHO               | Tretman rana              | [30] |
| Ureaza              | Pamučna vlakna          | Kovalentno vezivanje            | -CHO               | Tretman uree              | [42] |
| Pektinaza           | Vlakna papirne pulpe    | Kovalentno vezivanje            | -CHO               | Tretman otpadne vode      | [32] |
| Lipaza              | Mikrokristalna celuloza | Adsorpcija                      | -COOH              | /                         | [41] |
| Peroksidaza iz rena | Celuloza – vlakna       | Adsorpcija                      | -COOH              | /                         | [40] |

Kao što se može videti u prikazanim tabelama, u literaturi se mogu pronaći razni primeri korišćenja celuloze i nanoceluloze kao nosača za različite enzime, i koji se mogu upotrebiti u raznim oblastima od teorijskog proučavanja kinetike imobilisanih enzima do primene u raznim granama industrije ili biomedicini. Ovako raznovrsna upotreba ne treba biti neočekivana imajući u vidu brojne prednosti koje ovi materijali nude kao nosači za vezivanje enzima.

*Tabela 2.2. Primeri primene nanoceluloznih nosača za imobilizaciju.*

| Enzim       | Nosač                             | Vrsta imobilizacije  | Funkcionalna grupa     | Primena                            |      |
|-------------|-----------------------------------|----------------------|------------------------|------------------------------------|------|
| Peroksidaza | Nanokristali celuloze             | Kovalentno vezivanje | -C≡N                   | Uklanjanje fenolnih jedinjenja     | [39] |
| Lakaza      | Nanokristali celuloze             | Adsorpcija           | -OH/-OSO <sup>3-</sup> | Uklanjanje boje iz otpadnih voda   | [38] |
| Tripsin     | Nanokristali celuloze u hidrogelu | Adsorpcija           | -COOH                  | Hidroliza kazeina                  | [37] |
| Lakaza      | Bakterijska nanoceluloza          | Adsorpcija           | -OH                    | /                                  | [36] |
| Lakaza      | Bakterijska nanoceluloza          | Adsorpcija           | -OH                    | Antimikrobni efekat                | [35] |
| Ureaza      | Nanokristali celuloze             | Kovalentno vezivanje | -CHO                   | Sinteza tetrahidropirazolopiridina | [34] |

Posebno interesantno područje istraživanja je upotreba celuloze i nanoceluloze u tretmanu otpadnih voda. Modifikovana celuloza i nanoceluloza, materijal koji se istražuje i koristi zbog svoje sposobnosti prečišćavanja vode (vezivanjem boja i jona teških metala) [69], poslednjih godina se istražuje za imobilizaciju različitih enzima koji se tradicionalno koriste u tretmanu otpadnih voda. Na primer, pektinaza je uspešno imobilisana na oksidovanim celuloznim vlaknima kako bi se uklonila pektinska jedinjenja (anjonski pektin i poligalakturonska kiselina) koja su nusproizvodi procesa proizvodnje papira [32]. Ovaj pristup je vrlo interesantan sa aspekta iskorišćenja nus-proizvoda pošto

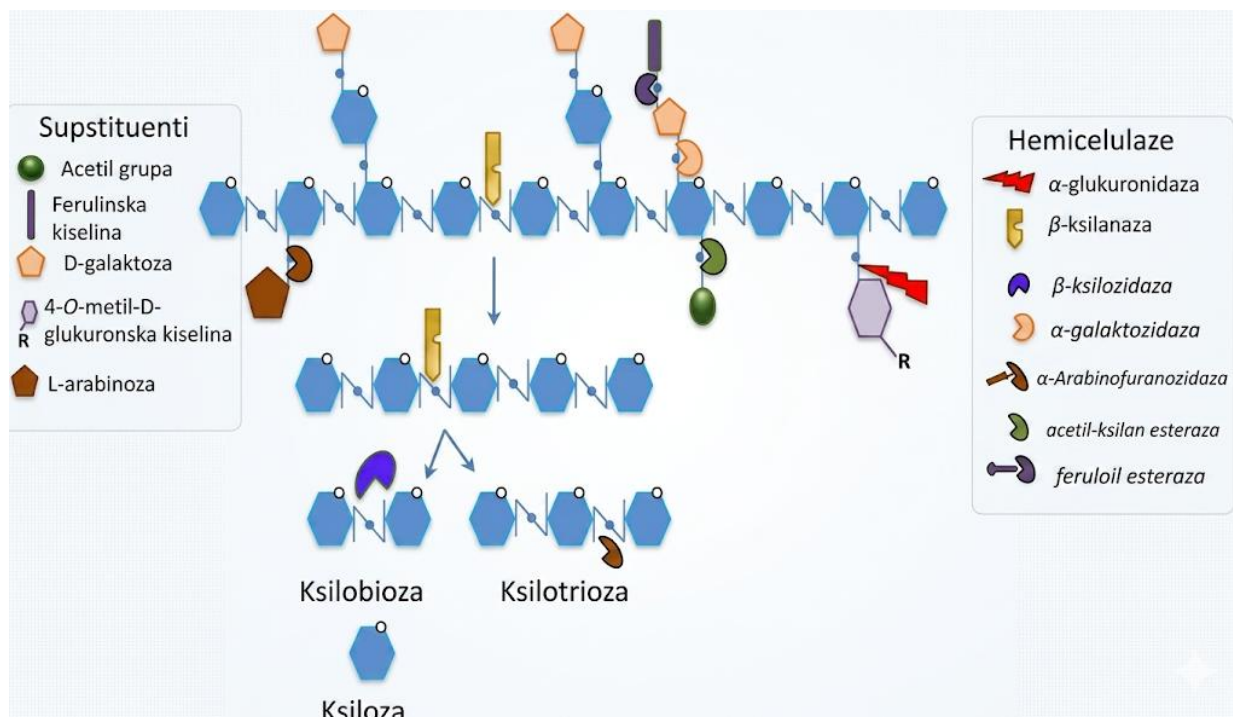
prenamenjuje celulozna vlakna, koja nastaju kao otpadni proizvod u toku proizvodnje papira, za imobilizaciju mikrobne pektinaze koja se koristi u tretmanu otpadnih voda koje takođe nastaju u istom procesu proizvodnje papira tzv. bele vode. Tako se jedan generisani otpad koristi za tretman drugog koji nastaje u istom procesu. Ova imobilisana pektinaza ima široku termičku stabilnost, čineći je pogodnijom za primenu na temperaturi koja se koristi u procesu proizvodnje papira, a može se ponovo upotrebljavati do sedam puta zadržavajući više od 50% svoje aktivnosti [32]. U upotrebi za prečišćavanje otpadnih voda ističu se i nanocelulozni kristali koji su se pokazali efikasnim za imobilizaciju peroksidaze koja se koristi za uklanjanje hlorovanih fenolnih jedinjenja, pri čemu imobilisani enzim pokazuje poboljšanu stabilnost u poređenju sa slobodnim enzimom [39]. Slično tome, lakaza imobilisana na nanoceluloznim kristalima pokazala je odlične rezultate u uklanjanju boje iz otpadnih voda, zadržavajući preko 80% svoje aktivnosti nakon 18 ciklusa [35].

## **2.3 ENZIMI ZA OBRADU NUSPROIZVODA INDUSTRIJE HRANE**

### **2.3.1 Hemicelulaze**

Hemiceluloza se nalazi u strukturi ćelijskog zida biljaka i njenu hidrolizu vrše enzimi hemicelulaze. Pošto se hemiceluloza i celuloza nalaze zajedno u strukturi ćelijskog zida, ovi enzimi pomažu i pri hidrolizi celuloze [70]. Hemiceluloza se sastoji od različitih polisaharida (najviše ksilana, manana i  $\beta$ -glukana) pa postoje i različiti enzimi koji vrše njenu hidrolizu [71]. Na slici 2.7. su prikazani neki od enzima koji učestvuju u hidrolizi hemiceluloze i mesta u strukturi hemiceluloze na koja deluju. U hemicelulaze spadaju sledeći enzimi [71]:

1.  $\beta$ -Ksilanaze (EC 3.2.1.8) hidrolizuju  $\beta$ -(1,4) veze u glavnom lancu ksilana i nastaju kratki ksilooligomeri.
2.  $\beta$ -Ksilozidaze (EC 3.2.1.37) su egzo-glikozidaze i deluju na kratke lance ksilooligomera tako da nastaju jedinice ksiloze.
3.  $\alpha$ -Galaktozidaze (EC 3.2.1.22) učestvuju u raskidanju glikozidne veze između galaktoze i lanca ksilana.
4.  $\alpha$ -Arabinofuranozidaze (EC 3.2.1.55) učestvuju u raskidanju glikozidne veze između arabinoze i lanca ksilana.
5.  $\alpha$ -Glukuronidaze (EC 3.2.1.139) učestvuju u raskidanju  $\alpha$ -(1,2)-glikozidne veze između 4-O-metil-glukuronske kiseline i lanca ksilana.
6. Acetil-ksilan esteraze (EC 3.1.1.72) vrše hidrolizu acetil grupa na jedinicama ksiloze.
7. Feruloil esteraze (EC 3.1.1.73) katalizuju hidrolizu estarske veze koja se nalazi između arabinoze ili galaktoze i ferulinske kiseline.



Slika 2.7. Šematski prikaz dejstva nekih hemicelulaza [70].

Hemicelulaze predstavljaju ključne enzime u valorizaciji nusproizvoda biljnog porekla, posebno materijala odnosno frakcija u čijem sastavu se nalaze velike količine lignoceluloznog materijala [70]. Komercijalne hemicelulaze se proizvode mikrobnim putem, genetski modifikovanim sojevima *Trichoderma* i *Aspergillus* [72]. Većina ovih enzima je aktivna u blago kiselim uslovima (pH 4-6) i na temperaturama nižim od 70 °C, međutim u fokusu su i enzimi koji se mogu koristiti na višim temperaturama [72]. Ksilanaze su najistraženije i najviše u upotrebi od svih hemicelulaza, pošto se u sastavu hemiceluloze većinski nalazi ksilan [72]. Većina ovih enzima su strukturno mali proteini sa molekulskim masama oko 20 kDa, i imaju izoelektričnu tačku pri blago baznim pH [73]. Postoji i druga grupa ksilanaza koju čine malo veći proteini, molekulске mase oko 40 kDa i izoelektričnom tačkom u kiselom pH [73]. Ove dve grupe ksilanaza razlikuju se i po specifičnosti prema supstratima: ksilanaze veće molekulске mase i niže izoelektrične tačke efikasnije hidrolizuju visoko supstituisane ksilane od ksilanaza manje molekulске mase i više izoelektrične tačke [73].

Mananaze su druga grupa enzima, koji se često koriste za razgradnju manana u sastavu hemiceluloze [74]. U ovu grupu enzima spadaju  $\beta$ -mananaze, EC 3.2.1.78 i  $\beta$ -manozidaze, EC 3.2.1.25 [74]. Endomananaze odnosno  $\beta$ -mananaze hidrolizuju nasumično glavni lanac manana i stvaraju se manobioza, manotrioza i razne mešavine mano-oligosaharida [73]. Strukturno, ovi enzimi su veći od ksilanaza (30-90 kDa) i imaju kiselu izoelektričnu tačku [73].

Hemicelulaze koje deluju kao egzoglikozidaze ( $\beta$ -ksilozidaze i  $\beta$ -manozidaze) katalizuju hidrolizu ksilo- i mano-oligosaharida uklanjanjem po jedne jedinice ksiloze odnosno manoze sa neredukujućeg kraja [73]. Ovi enzimi su slični, uglavnom veći proteini od endoksilanaze (preko 100 kDa) i uglavnom ih čine dve ili više podjedinica [73]. Ovi enzimi ne mogu više delovati ukoliko naiđu na račvanje lanca polisaharida, a na sporedne lance deluju druge grupe enzima kao što su  $\alpha$ -arabinofuranozidaze,  $\alpha$ -glukuronidaze,  $\alpha$ -galaktozidaze i razne grupe esteraza [73].

Tokom poslednjih godina hemicelulaze su se koristile uglavnom u prehrambenoj industriji kao pomoćna sredstva u pekarskoj industriji, u industriji hrane za životinje radi povećanja nutritivne vrednosti i digestibilnosti i u industriji papira kako bi se vršilo izbeljivanje papira bez upotrebe hemikalija [73]. Zato se godinama unazad radi na razvoju stabilnih hemicelulaza, koje mogu podneti razne pH vrednosti i visoke temperature. Međutim, važno je napomenuti da je razvoj ovih enzima u

poslednjih nekoliko godina iskoristila potpuno nova grana industrije, koja se zasniva na konceptu cirkularne bioekonomije. Tako da se nove primene ovih enzima ogledaju u: proizvodnji bioetanolu i biogasa, furfurala i ksilitola, raznih oligosaharida (ksilooligosaharida), i organskih kiselina (sukcinska, mlečna, levulinska i limunska) [75]. Razvojem ovih procesa, hemiceluloza koja često ostaje i kao nedovoljno iskorišćena sirovina u biorafinirijama lignoceluloze, nalazi novu primenu u dobijanju proizvoda sa dodatnom vrednošću i održivom razvoju bioekonomije.

### 2.3.2 Pektinaze

Pektinaze se definišu kao velika grupa enzima koji vrše hidrolizu pektinskih supstanci [76]. S obzirom da je pektin veoma kompleksan molekul, u kompleksni skup pektinaza, spadaju različiti enzimi, koji se mogu podeliti u tri velike grupe: pektin depolimeraze (poznate i kao poligalakturonaze), pektin liaze i pektin esteraze (ili pektin metil esteraze) [77]. Detaljnija podela poznatih pektinaza se klasifikuje kao [78]:

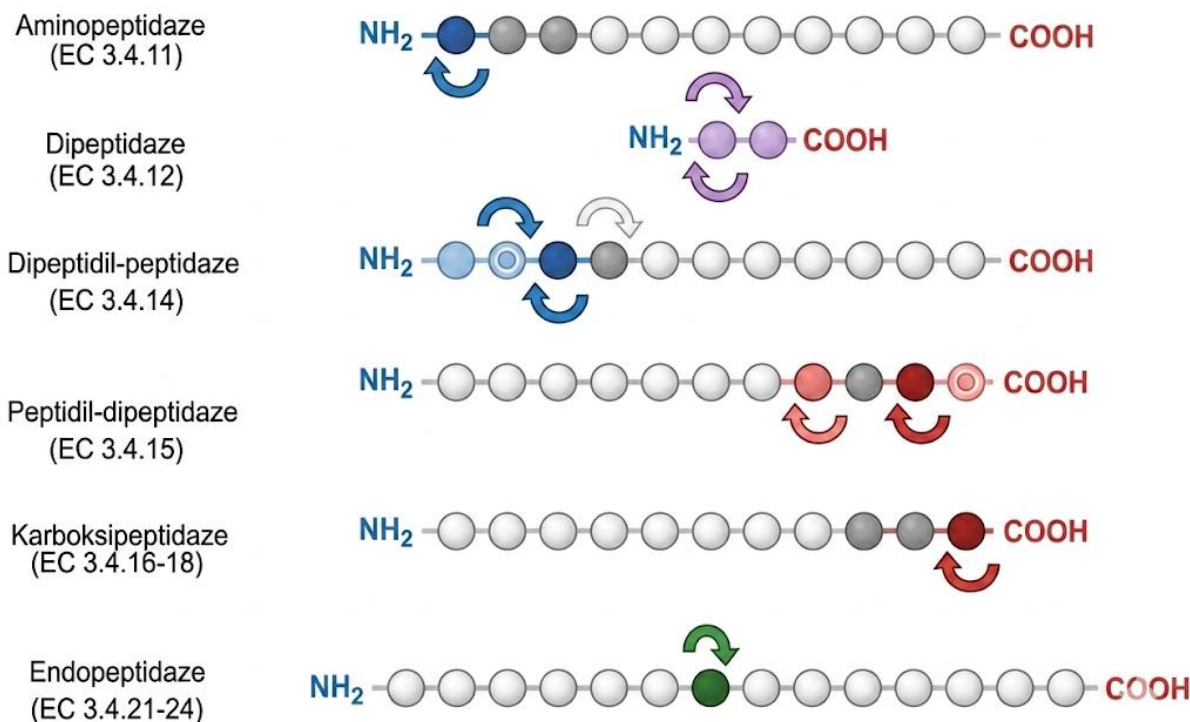
1. Protopektinaze prevode nerastvorni protopektin u rastvorni oblik; postoje dva tipa: jedan deluje na region poligalakturonske kiseline protopektina (tip A), a drugi sa polisaharidnim lancima koji su vezani za poligalakturonsku kiselinu (tip B).
2. Pektin metil esteraze (EC 3.1.1.11) katalizuju deesterifikaciju metoksil grupa pektina i kao proizvodi nastaju pektinska kiselina i metanol, a deluje pre poligalakturonaza i pektat liaza koje zahtevaju neesterifikovane supstrate.
3. Pektin acetil esteraze (EC 3.1.1.-) katalizuju hidrolizu acetil estara pektina, pa nastaju pektinska kiselina i acetat.
4. Polimetilgalakturonaze (EC 3.2.1.-) katalizuju raskidanje  $\alpha$ -1,4-glikozidne veze u glavnom lancu pektina, ima veći afinitet prema visoko esterifikovanom pektinu, pa se oslobađa 6-metil-D-galakturonat.
5. Poligalakturonaze katalizuju hidrolizu  $\alpha$ -1,4-glikozidne veze, a kao proizvod nastaje D-galakturonat. Polimetilgalakturonaze i poligalakturonaze mogu da deluju i endo- (EC 3.2.1.15) i egzo- (EC 3.2.1.67). Enzimi koji imaju endo-aktivnost katalizuju nasumično raskidanje veza supstrata, dok enzimi sa egzo-aktivnošću hidrolizuju veze sa neredukujućeg kraja oslobađajući monogalakturonate ili u nekim slučajevima digalakturonate.
6. Pektat liaze učestvuju u raskidanju glikozidnih veza poligalakturonske kiseline tako da nastaju nezasićeni proizvodi ( $\Delta$ -4,5-D-galakturonati) preko reakcije transeliminacije. Postoje i egzo-pektat liaze (EC 4.2.2.2) i endo-pektat liaze (EC 4.2.2.9). Značajno je napomenuti da ovi enzimi zahtevaju prisustvo jona  $\text{Ca}^{2+}$ .
7. Pektin liaze (EC 4.2.2.10) katalizuju nasumično raskidanje veza u pektinu (pre svega visoko esterifikovan pektin), tako da nastaju nezasićeni metiloligogalakturonati procesom transeliminacije glikozidnih veza.
8. Ramnogalakturonan ramnohidrolaze (EC 3.2.1.174), nazivaju se i ramnogalakturonan  $\alpha$ -L-ramnopiranohidrolaze ili  $\alpha$ -L-ramnozidaze, katalizuju hidrolizu lanca ramnogalakturonana na neredukujućem kraju tako da se oslobađa ramnoza.
9. Ramnogalakturonan galakturonohidrolaze (EC 3.2.1.173) katalizuju raskidanje veza u lancu ramnogalakturonana na redukujućem kraju i oslobađaju se monogalakturonati.
10. Ramnogalakturonan hidrolaze (EC 3.2.1.171) katalizuju nasumičnu hidrolizu ramnogalakturonana oslobađajući oligogalakturonate.
11. Ramnogalakturonan liaze (EC 4.2.2.-) katalizuju nasumičnu transeliminaciju veza ramnoza-galakturonat iz lanca ramnogalakturonana i nastaju nezasićeni galakturonati na neredukujućem kraju jednog oligomera i drugi oligomer koji ima ramnozu na redukujućem kraju.
12. Ramnogalakturonan acetilesteraze (EC 3.1.1.-) katalizuju hidrolizu acetil grupa ramnogalakturonana.

13. Ksilogalakturnan hidrolaze (EC 3.2.1.-) ili ksilogalakturnaze deluju na hidrolizu glikozidnih veza između dva ostatka galakturonata u molekulu homogalakturnana koji je supstituisan ksilozom, tako da nastaju ksiloza-galakturonat dimeri.

Komercijalno pektinaze se proizvode mikrobnim putem još od 1970ih godina [76]. Proizvodnja pektinaza čini oko 10% ukupne proizvodnje svih enzima, pre svega zbog njihove rasprostranjene upotrebe u industriji sokova i vina [78]. Pektinaze se pored toga, mogu primeniti i u raznim drugim industrijama: likvifikacija i saharifikacija poljoprivrednih supstrata, tretman otpadnih voda, industrija papira, hrana za životinje, ekstrakcija ulja, fermentacija kakaa, kafe, čaja i duvana kao i proizvodnja funkcionalnih jedinjenja - prebiotika [76].

### 2.3.3 Proteolitički enzimi

Proteolitički enzimi učestvuju u hidrolizi peptidnih veza koje se nalaze u peptidima i proteinima [79]. Reakcija hidrolize može biti i reverzibilna pa pod određenim uslovima ovi enzimi mogu učestvovati i u povratnoj reakciji sinteze peptida uz izdvajanje vode [80]. Klasifikacija proteolitičkih enzima se vrši na osnovu pozicije peptidne veze na koju deluju, kao i aminokiselinskih ostataka koji grade te peptidne veze [79]. Glavna podela je na endopeptidaze i egzopeptidaze. Egzopeptidaze svoje delovanje ispoljavaju na krajevima peptidnih lanaca i tako skraćuju peptidni lanac, a endopeptidaze deluju na peptidne veze u unutrašnjosti molekula tako da razlažu proteine na peptide [80]. Egzopeptidaze se dalje mogu podeliti na aminopeptidaze, dipeptidaze, dipeptidil-peptidaze, peptidil-dipeptidaze i karboksipeptidaze. Šematski prikaz podele proteolitičkih enzima i veza na koje deluju je prikazan na slici 2.8.



Slika 2.8. Šematski prikaz dejstva peptidaza [79].

Proteolitički enzimi se takođe mogu podeliti i na osnovu mehanizma delovanja na serinske proteaze, cisteinske proteaze, aspartatne proteaze i metalo-proteaze [80]. Iako ove grupe enzima imaju neke zajedničke osobine, one uključuju enzime koji se značajno razlikuju i po strukturi i po mehanizmu katalize [79]. Sličnosti po kojima su klasifikovane ove grupe se zasnivaju najviše na aktivnom centru enzima: serinske proteaze u svom aktivnom centru imaju ostatak aminokiseline serin, aspartatne

proteaze sadrže ostatke asparaginske kiseline u aktivnom centru, cisteinske proteaze imaju ostatke cisteina i histidina u aktivnom centru dok je za metalo-proteaze karakteristično prisustvo dvovalentnih jona kao što su  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  [80]. Industrijska primena ovih enzima je veoma široka, i uglavnom se deli na osnovu tipa proteaze (optimalnog pH proteaze) tako da se [81]:

- alkalne proteaze koriste u industriji deterdženata, kože i hrane (mesa i soje),
- neutralne proteaze koriste u pekarskoj industriji i za omekšavanje mesa,
- kisele proteaze koriste u industriji hrane i pića.

U novijim istraživanjima i industriji proteaze nalaze primenu u: pripremi hidrolizata proteina radi poboljšanja ukusa i smanjenja gorčine, modifikaciji proteina, fermentaciji, proizvodnji aktivnih (funkcionalnih) peptida, i obradi hrane za životinje [81].

#### 2.3.3.1 Endopeptidaze

Endopeptidaze katalizuju hidrolizu unutrašnjih,  $\alpha$ -peptidnih veza [79]. Poznati enzimi, predstavnici endopeptidaza su himotripsin, pepsin i papain [80]. Endopeptidaze deluju u prvom koraku hidrolize proteina pošto njihovim dejstvom nastaju kraći polipeptidni lanci koji imaju nove N- i C- krajeve tako da ih nakon dejstva endopeptidaza mogu hidrolizovati egzopeptidaze. Takođe, endopeptidaze vrše limitiranu proteolizu koja je potrebna na primer za obradu prekursora proteina kako bi ih preveli u aktivan oblik [79].

#### 2.3.3.2 Egzopeptidaze

Za dejstvo ovih enzima potrebna je slobodna N-terminalna amino grupa, C-terminalna karboksilna grupa ili oba, i deluju na veze koje mogu maksimalno biti na trećem aminokiselinskom ostatku od kraja lanca [79]. U ovu grupu spadaju [79]:

- Aminopeptidaze oslobađaju jedan aminokiselinski ostatak od slobodnog N-kraja, predstavnici su aminopeptidaza N i aminopeptidaza C.
- Dipeptidaze vrše hidrolizu dipeptida i zahtevaju da oba kraja budu slobodna, predstavnici su dipeptidaza A i membranska dipeptidaza.
- Dipeptidil-peptidaza učestvuje u hidrolizi peptidne veze tako što oslobađa N-terminalni dipeptid tako da nastaju dipeptid i peptid, predstavnici su dipeptidil-peptidaza I i dipeptidil-peptidaza III.
- Tripeptidil-peptidaza svojim dejstvom vrši hidrolizu lanca sa N-kraja lanca tako da nastaju tripeptid i peptid, a predstavnici su tripeptidil-peptidaza I i tripeptidil-peptidaza II.
- Peptidil-dipeptidaze oslobađaju dipeptid sa C- kraja proteinskog lanca tako da nastaju peptid i dipeptid, predstavnik je peptidil-dipeptidaza A.
- Karboksipeptidaze učestvuju u oslobađanju jednog aminokiselinskog ostatka sa strane C-kraja proteinskog lanca, a u ovu grupu enzima spadaju karboksipeptidaza A1, katepsin X i karboksipeptidaza Y.

### 2.3.4 Primena enzima u obradi nusproizvoda industrije hrane

Enzimi igraju ključnu ulogu u valorizaciji nusproizvoda industrije hrane, omogućavajući efikasno dobijanje visokovrednih komponenti kao što su oligosaharidi i proteinski hidrolizati. Ovim procesima ne samo da se smanjuje ekološko opterećenje i troškovi odlaganja otpada, već se mogu relativno jednostavno dobiti funkcionalni proizvodi koji se mogu primeniti u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji [82-85]. Nusproizvodi bogati vlaknima i proteinima, poput sačme uljarica, voćnih ostataka, žitnih mekinja, ali i drugih nusproizvoda industrije hrane, predstavljaju izuzetno vredne supstrate za biotehnološku proizvodnju funkcionalnih sastojaka putem enzimske obrade.

Nusproizvodi bogati vlaknima predstavljaju idealne supstrate za enzimsku sintezu oligosaharida. Primena hemicelulaza (ksilanaza) i pektinaza omogućava razgradnju kompleksnih polisaharida u oligosaharide:

- Ksilanaze razgrađuju hemicelulozu u vlaknastim nusproizvodima, oslobađajući ksilooligosaharide. Na primer, hidrolizom, središnjeg dela klipa kukuruza ili drški pirinča, suncokreta, pšenice, pamuka dobijaju se ksilooligosaharidi [86, 87].
- Pektinaze razlažu pektin u voćnim ostacima (npr. kore citrusa, marakuje, jabuke), proizvodeći pektinske oligosaharide [88, 89].

Nusproizvodi industrije hrane koji sadrže značajne udele proteina, kao što su sačme uljarica se korišćenjem proteaza mogu transformisati u peptide koji se mogu koristiti kao dodatak ishrani a neki ispoljavaju i bioaktivne efekte:

- Proteaze hidrolizuju proteine uljarica, stvarajući peptide sa antioksidativnim i antihipertenzivnim delovanjem [90]. Na primer, hidrolizati repičinog proteina smanjuju ACE aktivnost [91, 92].
- Proteaze se koriste se za ekstrakciju proteina iz semenki paradajza, čije frakcije pokazuju visoku antioksidativnu aktivnost [92].

Proizvodi enzimske obrade nalaze široku primenu u industriji hrane i kao nutraceutici:

- XOS i POS kao prebiotici u funkcionalnim namirnicama poboljšavaju probavnu zdravstvenu funkciju, a neka istraživanja pokazuju i da mogu smanjiti upale, imati antioksidativnu, antitumorsku i antimikrobnu aktivnost [86, 93, 94]. Mogu se inkorporirati u namirnice kao što su pekarski i konditorski proizvodi, sokovi, mlečni proizvodi, a mogu i povoljno uticati na ukus i teksturu proizvoda [95].
- Proteinski hidrolizati koriste se u suplementima za sportsku ishranu i kao nutraceutici koji mogu ispoljavati antioksidativnu, antimikrobnu, antihipertenzivnu, antikoagulantnu, hipoglikemičnu aktivnost, a smanjuju i loš holesterol [96, 97].

Iako enzimska tehnologija nudi razne mogućnosti za obradu nusproizvoda industrije hrane, treba uzeti u obzir i određena ograničenja, kao što su troškovi enzima i regulatorni zahtevi [87, 98, 99]. Kako bi se unapredili postojeći i već istraženi postupci dobijanja peptida i oligosaharida, i primeniti u industrijske svrhe pa i pronaći svoj put na tržište potrebno je da se istraživanje nastavi u smeru istraživanja nusproizvoda koji se mogu iskoristiti za dobijanje ovih jedinjenja, imobilizacije enzima kako bi se smanjili troškovi proizvodnje, ali i standardizacije i kontrole kvaliteta kako početnih sirovina tako i krajnjih proizvoda. Ovakav pristup omogućava održivu, ekološki prihvatljivu i isplativu valorizaciju nusproizvoda prehrambene industrije, stvarajući inovativne sastojke za funkcionalnu hranu i nutraceutike, uz istovremeno smanjenje otpada i razvoj po principima cirkularne bioekonomije.

## **2.4 NUSPROIZVODI INDUSTRIJE HRANE**

### **2.4.1 Uljarice**

Biljke koje spadaju u uljarice, kao što su suncokret, uljana repica, soja i pamuk, predstavljaju osnovu svetske proizvodnje biljnih ulja i zauzimaju značajno mesto u svetskoj poljoprivredi i prehrambenoj industriji. Njihovo seme je bogato uljem, ali i proteinima, ugljenim hidratima, vlaknima i brojnim bioaktivnim jedinjenjima, što ih čini izuzetno vrednim ne samo za proizvodnju ulja, već i za dobijanje

različitih materijala sa visokim potencijalom za dalju upotrebu [100]. Nakon procesa ekstrakcije ulja, preostali deo semena poznat kao sačma ili pogača, često se koristi kao stočna hrana pre svega zbog visokog sadržaja proteina, ali sadrži značajne količine drugih korisnih materija [100].

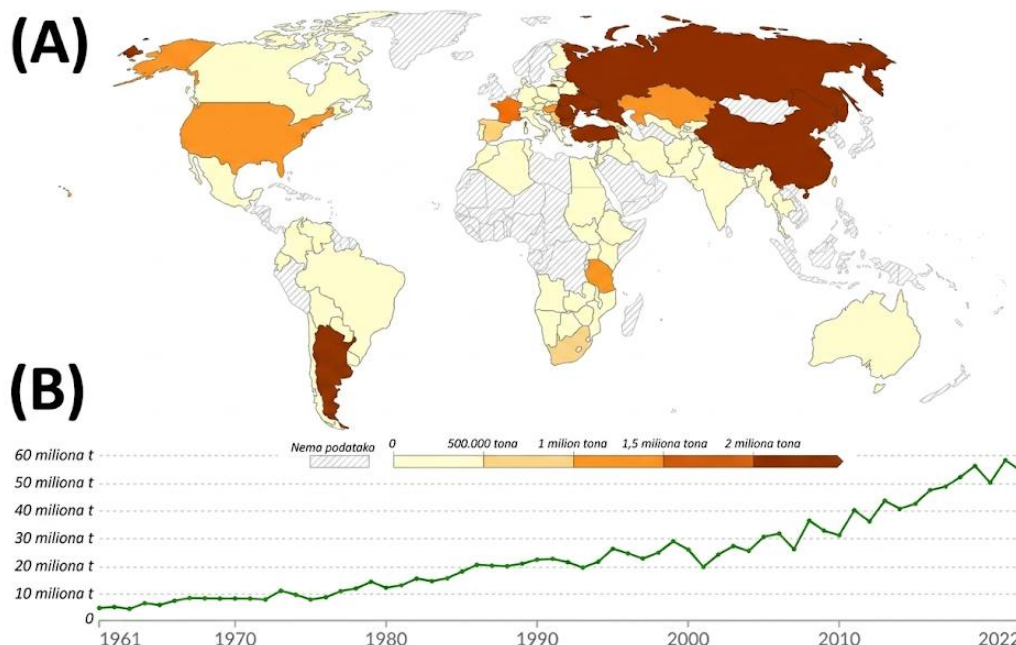
Savremeni trendovi u industriji hrane sve više prepoznaju važnost ovih nusproizvoda kao resursa za dobijanje novih, visokovrednih sastojaka, čime se doprinosi principima cirkularne bioekonomije i održivog razvoja [100]. Umesto tradicionalnog pristupa, gde se sačma i drugi nusproizvodi dobijanja ulja koriste isključivo za ishranu životinja ili kao kompost, danas se razvijaju inovativne biotehnološke metode za izdvajanje i transformaciju vrednih komponenti iz ovih materijala [100]. Na primer, primenom enzima poput proteaza, celulaza, hemicelulaza i pektinaza, moguće je iz sačme i pogača dobijati bioaktivne peptide i oligosaharide sa prebiotičkim efektima, koji se mogu koristiti kao funkcionalni sastojci u ljudskoj ishrani, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji [83, 101].

Ovakav pristup omogućava višestruku valorizaciju uljarica: pored osnovne proizvodnje ulja, nusproizvodi se pretvaraju u sirovine za dobijanje novih proizvoda sa dodatom vrednošću, čime se smanjuje količina otpada i povećava efikasnost korišćenja prirodnih resursa [83]. U kontekstu cirkularne bioekonomije, ovakva integracija proizvodnih tokova doprinosi smanjenju ekološkog otiska prehrambene industrije, otvara mogućnosti za razvoj novih tržišta i proizvoda, i podstiče inovacije u oblasti održive poljoprivrede i prehrambene tehnologije [83].

Kao rezultat, uljarice i njihovi nusproizvodi danas predstavljaju ključnu kariku u razvoju održivih modela proizvodnje hrane, gde se svaki deo biljke maksimalno iskorišćava, a otpad postaje resurs za nove procese i proizvode. Na taj način, industrija uljarica ne samo da obezbeđuje osnovne prehrambene sirovine, već i aktivno doprinosi globalnim naporima za smanjenje otpada i prelazak na cirkularnu ekonomiju.

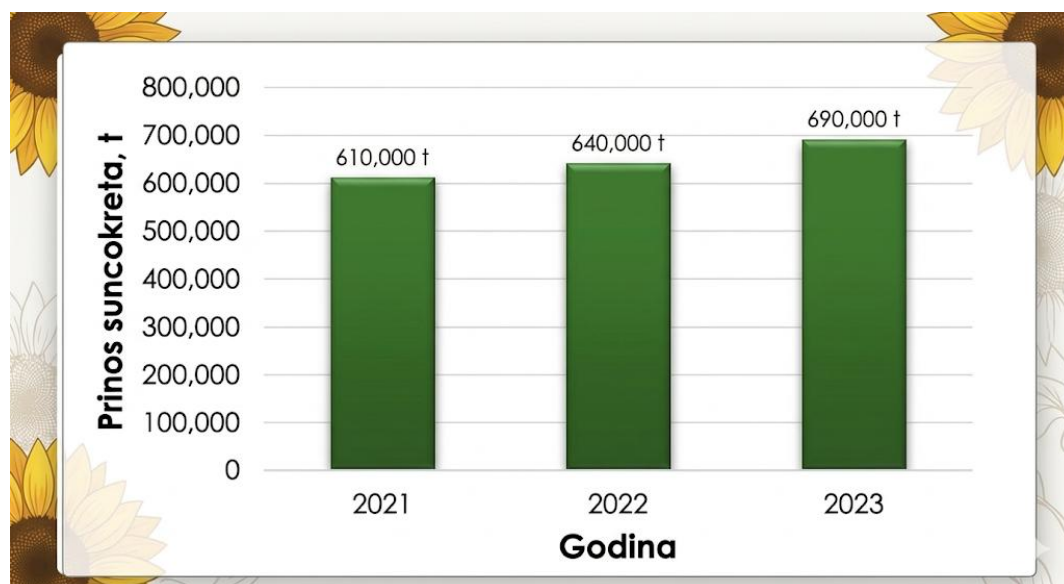
#### 2.4.1.1 *Suncokret i uljana repica*

Biljka suncokreta, *Helianthus annuus*, je jedna od najstarijih vrsta uljarica u Severnoj Americi [102]. Po arheološkim podacima mesta na kojima su živeli Hopi Indijanci, na severu Arizone, se procenjuje da je uzgoj suncokreta postojao pre više od 3000 godina pre nove ere [102]. Početkom 16. veka suncokret je stigao u Evropu, ali je tek u 18. veku počela proizvodnja suncokretovog ulja od semena suncokreta [102]. Suncokret je danas jedna od najznačajnijih uljarica ukoliko se posmatra godišnja proizvodnja ove biljke [103]. U grupu značajnih uljarica spadaju još i soja, uljana repica, pamuk i kikiriki. Na slici 2.9. (A) je prikazan prinos suncokretovog semena u svetu 2022. godine, a na slici 2.9. (B) godišnji rast proizvodnje suncokreta u periodu od 1961. do 2022. godine.



Slika 2.9. Prinos suncokretovog semena u svetu 2022. godine (A) i porast proizvodnje suncokretovog semena u svetu od 1961 do 2022. godine (B) [103].

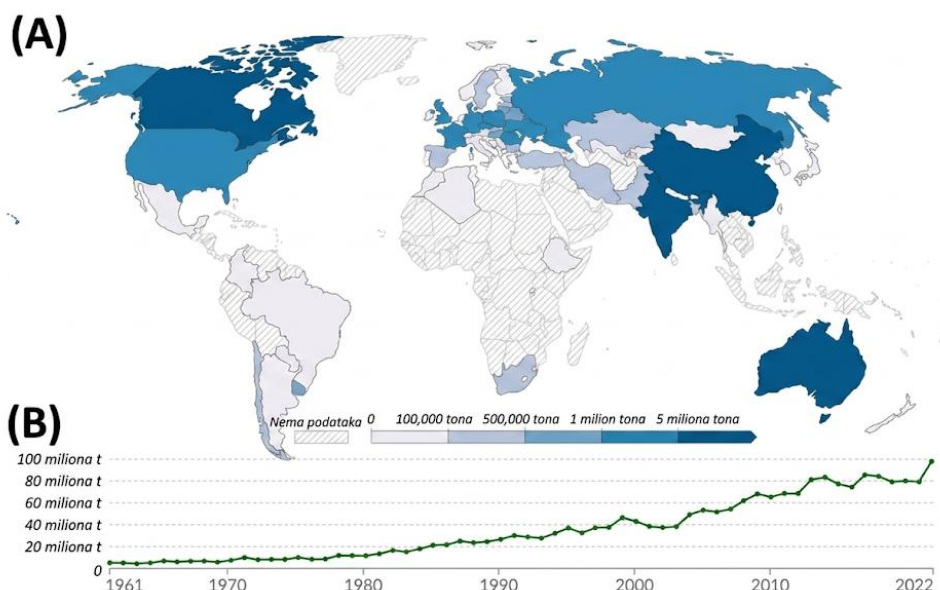
Što se tiče proizvodnje po kontinentima, Evropa prednjači u proizvodnji suncokreta i čini nešto više od 70% ukupne svetske proizvodnje suncokreta [103]. Najveći svetski proizvođači su evropske države Ukrajina i Rusija čija proizvodnja suncokreta zapravo predstavlja skoro polovinu ukupne svetske proizvodnje suncokreta. Srbija se po proizvodnji u 2022. godini nalazi na 15. mestu u svetu [103]. Podaci za proizvodnju suncokreta u Srbiji u periodu od 2021. do 2023. godine su prikazani na slici 2.10.



Slika 2.10. Prinos suncokreta u Srbiji za period 2021-2023 [104].

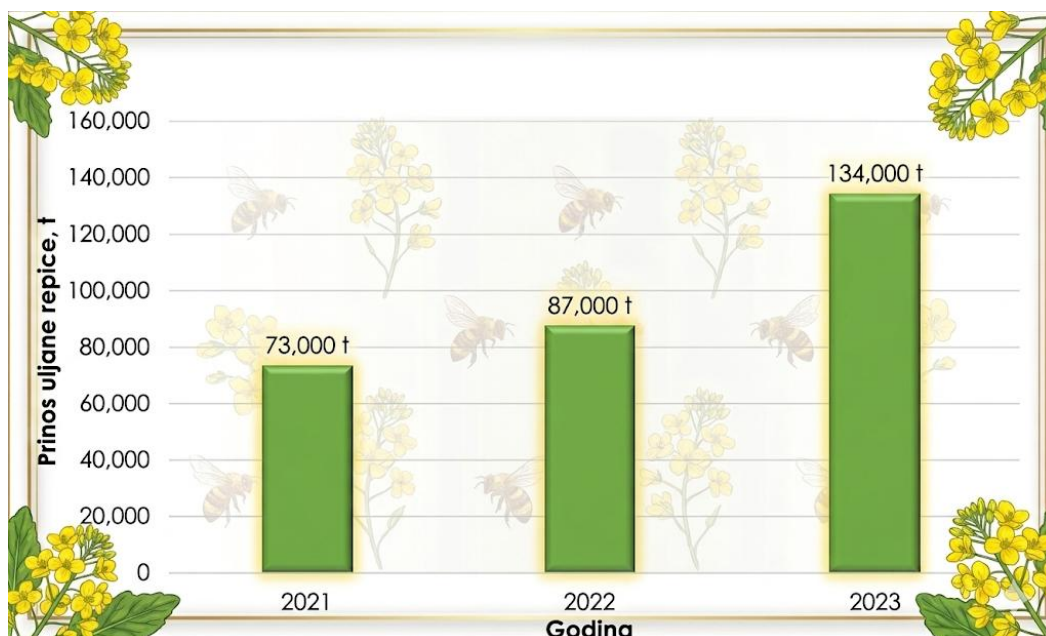
Uljana repica je uljarica u koju spadaju vrste *Brassica napus* i *Brassica rapa* i spada, kao i suncokret, u jedne od najznačajnijih uljarica na svetu [105]. Gaji se pretežno u Evropi, Kanadi, Kini, Indiji i Australiji [103]. Kao i suncokret, seme uljane repice se najviše koristi za proizvodnju ulja koje se dalje upotrebljava u ishrani i proizvodnji biodizela, ali i za preradu u lubrikante, plastiku, sapune itd. [106]. Na slici 2.11. (A) prikazana je svetska proizvodnja uljane repice u tonama, u 2022. godini. Interesantno je videti kao i kod suncokreta porast proizvodnje uljane repice u svetu od sredine prošlog

veka do danas, prikazan grafički na slici 2.11. (B) [103]. U svetskoj proizvodnji po kontinentima, za razliku od suncokreta, Evropa, Azija i Severna Amerika učestvuju skoro jednako u proizvedenim količinama [103].



Slika 2.11. Proizvodnja uljane repice u svetu, 2022. godine (A) i proizvodnja uljane repice u svetu u periodu od 1961. do 2022. (B) [103].

U Srbiji se uljana repica proizvodi u manjem obimu od suncokreta, i u 2022. godini Srbija je na 34. mestu u svetu po količini proizvodnje [103]. Međutim, može se primetiti da se proizvodnja uljane repice u Srbiji iz godine u godinu sve više povećava, tako da između 2022. i 2023. godine postoji skok od oko 50%, što je i grafički prikazano na slici 2.12. [104]



Slika 2.12. Prinos uljane repice u Srbiji za period 2021-2023 [104].

Sačma suncokreta i uljane repice su nusproizvodi koji nastaju nakon ekstrakcije ulja iz semena ovih uljarica. Nakon izdvajanja ulja, mnoga vredna jedinjenja zaostaju u sačmi, kao što su: proteini, ugljeni hidrati, masti, i druga jedinjenja (polifenoli, fenolne kiseline i estri, glukozinolati, fitati i vitamini)

[107]. U zavisnosti od metode izdvajanja ulja, ali i genetskog profila biljke i uslova gajenja, hemijski sastav dobijene sačme može da varira [107]. U tabeli 2.3. je prikazan primer sastava suncokretove sačme i sačme uljane repice.

*Tabela 2.3. Sastav suncokretove sačme i sačme uljane repice [107].*

|               | Suncokretova sačma, % | Sačma uljane repice, % |
|---------------|-----------------------|------------------------|
| Suva materija | 91                    | 91                     |
| Proteini      | 32                    | 35                     |
| Lipidi        | 1,5                   | 2,7                    |
| Pepeo         | 6,5                   | 6,3                    |
| Ukupni fenoli | 3,5                   | 0,6                    |
| Vlakna        | 41,0                  | 11,6                   |
| Lignin        | 26,8                  | /                      |
| Hemiceluloza  | 13                    | /                      |
| Celuloza      | 23                    | /                      |

Sačma suncokreta i uljane repice nastaju kao sporedni proizvodi u industrijskoj preradi uljarica i karakterišu se visokim sadržajem proteina i vlakana, ali njihov nedostatak je prisustvo određenih antinutritivnih faktora i niska svarljivost koji ograničavaju njihovu upotrebu [108-110]. Suncokretova sačma sadrži 30–50% proteina, u zavisnosti od stepena oljuštenosti i procesa prerade, dok potpuno oljuštena sačma može dostići i vrednosti od 43–46% proteina [111, 112]. Prednost suncokretove sačme je nizak sadržaj antinutritivnih faktora u poređenju sa drugim uljaricama, kao i povoljan aminokiselinski sastav, uz izuzetak nižeg sadržaja lizina [111]. Osim proteina, sadrži značajne količine ugljenih hidrata u obliku vlakana (celuloza, hemiceluloza) [113]. Glavni izazov u humanoj ishrani je prisustvo fenolnih jedinjenja, posebno hlorogene kiseline, koja utiče na boju (organoleptička svojstva) i dostupnost proteina [108].

Za obe vrste sačme primenjuju se različite metode obrade sa ciljem povećanja nutritivne vrednosti, smanjenja antinutritivnih faktora i poboljšanja funkcionalnih svojstava:

- Fizičke metode: Mlevenje, prosejavanje i gravitaciona separacija omogućavaju izdvajanje različitih frakcija [112].
- Hemijske metode: Ekstrakcija rastvaračima koristi se za uklanjanje fenolnih jedinjenja iz suncokretove sačme, dok se kod repičine sačme hemijskim tretmanima može smanjiti sadržaj glukozinolata, ili za razdvajanje različitih frakcija [108, 113, 114].
- Biološke metode: Enzimska hidroliza poboljšava svarljivost i funkcionalne osobine obe vrste sačme [115, 116], dok fermentacija može značajno smanjiti sadržaj antinutritivnih faktora i poboljšati nutritivni profil [117, 118].

Primena ovih metoda omogućava dobijanje frakcija sa poboljšanim tehnološkim i nutritivnim osobinama, pogodnih kako za upotrebu u stočnoj hrani, tako i za razvoj novih prehrambenih proizvoda. Na primer, suncokretovo brašno sa 43–46% proteina, dobijeno primenom fizičkih metoda separacije, može biti uporedivo sa proteinskim sastavom sojine sačme [112].

Pored proteinskih frakcija ovih sačmi, važno je napomenuti veoma veliki udeo ugljenohidratnih frakcija koji imaju potencijal za dalje iskorišćenje, posebno u slučaju suncokretove sačme (tabela 3.). Ova frakcija suncokretove sačme se sastoji pretežno iz lignoceluloze, i predstavlja supstrat od interesa za procese industrijske fermentacije kao što je proizvodnja bioetanolu [119]. Međutim, u novijim istraživanjima ovaj pristup se menja i ističe se frakcionisanje čistih jedinjenja kao što su pektin i

hemiceluloza, pri čemu je ksilan jedinjenje od najvećeg interesa u ovoj frakciji, pre svega za proizvodnju prebiotika [12].

Unapređeno iskorišćenje suncokretove i repičine sačme doprinosi principima održivog razvoja i cirkularne ekonomije kroz valorizaciju nusproizvoda prehrambene industrije, smanjenje količine otpada koji zahteva odlaganje, dobijanje novih proizvoda sa dodatom vrednošću i efikasnije korišćenje prirodnih resursa. Ove biljne proteinske frakcije predstavljaju održivu alternativu životinjskim proteinima, čija je dostupnost sve ograničenija zbog rasta cena i ograničenih izvora, a njihova upotreba je u skladu sa globalnim trendovima smanjenja ekološkog otiska prehrambene industrije.

#### **2.4.2 Bobičasto voće**

Bobičasto voće, kao što su ribizla, malina, borovnica i kupina, zauzima značajno mesto u savremenoj prehrambenoj industriji zbog visokog sadržaja vitamina, minerala, vlakana i raznovrsnih bioaktivnih jedinjenja [120]. Ove vrste voća su poznate po visokoj antioksidativnoj aktivnosti, ali i po velikim količinama otpada koji nastaje tokom prerade, pre svega u vidu pogača, semenki, kora i pulpe [120]. Procene ukazuju da se tokom prerade voća, uključujući i bobičasto, može generisati i do 10-20% otpada u odnosu na ukupnu količinu sirovine, što predstavlja značajan izazov za upravljanje otpadom ali i priliku za održivo upravljanje resursima [120].

Nusproizvodi bobičastog voća bogati su vlaknima, polifenolima, pektinom, proteinima i pigmentima, a mogu sadržati i veće koncentracije ovih bioaktivnih materija nego sam jestivi deo ploda [121]. Tradicionalno, ovi otpaci su se koristili kao stočna hrana ili kompost, ali savremena istraživanja i tehnološki razvoj omogućavaju njihovu valorizaciju kroz izdvajanje funkcionalnih sastojaka za upotrebu u prehrambenoj, farmaceutske i kozmetičke industriji [122]. Na primer, pogače crne ribizle i maline, koje nastaju nakon ceđenja soka, predstavljaju bogat izvor dijetetskih vlakana i polifenola, dok su semenke i kore značajne zbog visokog sadržaja ulja i antioksidanasa [121].

U kontekstu cirkularne bioekonomije, iskorišćenje otpada bobičastog voća dobija sve veći značaj [123]. Primena biotehnoloških metoda, kao što su enzimaska hidroliza i fermentacija, omogućava dobijanje oligosaharida sa prebiotičkim efektima i bioaktivnih peptida, čime se stvara dodatna vrednost i smanjuje količina otpada koji bi završio na deponijama [122]. Ovi funkcionalni sastojci nalaze primenu kao prebiotici u funkcionalnoj hrani, prirodni antioksidansi, boje, ili čak sirovine za izradu biorazgradivih materijala i ambalaže [124].

Valorizacija nusproizvoda nastalog preradom bobičastog voća doprinosi održivosti i efikasnijem korišćenju prirodnih resursa, smanjuje ekološki otisak prehrambene industrije i otvara mogućnosti za razvoj inovativnih proizvoda sa dodatom vrednošću. Uvođenje ovakvih rešenja u industrijsku praksu predstavlja važan korak ka implementaciji principa cirkularne ekonomije, gde se svaki deo ploda maksimalno koristi, a otpad postaje izvor novih sirovina i funkcionalnih proizvoda.

U Srbiji generalno, proizvodnja bobičastog voća ima uzlazni trend, i podatak iz 2022. godine govori da se bobičasto voće gaji na 36.000 hektara [125]. Imajući u vidu da su ove vrste voća pogodne i za preradu u druge proizvode kao što su sokovi ili alkoholna pića, može se zaključiti da godišnje nastane i veliki udeo nusproizvoda nastalih od ovog voća kao što su pogače koje nastaju nakon presovanja voća. Pogače od bobičastog voća su nusproizvod koji nastaje nakon presovanja bobičastog voća radi dobijanja soka ili ulja [126]. Glavni izazov u korišćenju pogača od bobičastog voća je njihova varijabilnost u sastavu [126]. Međutim, njihov visok sadržaj bioaktivnih jedinjenja predstavlja značajan potencijal za razvoj proizvoda sa dodatom vrednošću, ali je pravi izazov izboriti se sa pomenutom varijabilnošću početnog materijala [126].

Potencijalne primene nusproizvoda industrije bobičastog voća:

1. Prehrambena industrija:

- Prirodni izvor vlakana i antioksidanasa u funkcionalnoj hrani: Pogače bobičastog voća sadrže značajne količine dijetetskih vlakana i fenolnih jedinjenja, što ih čini pogodnim za obogaćivanje funkcionalnih namirnica i povećanje antioksidativnog kapaciteta proizvoda [127, 128].
  - Obogaćivanje pekarskih i konditorskih proizvoda: Dodavanje pogača bobičastog voća u hleb, kekse i druge pekarske proizvode poboljšava nutritivni profil, povećava sadržaj vlakana i antioksidativnu aktivnost, te doprinosi boljoj teksturi i aromi proizvoda [129].
  - Priprema alternativnih proizvoda mesu: Pogača bobičastog voća se može dodati biljnim proteinima u cilju dobijanja alternativnih proizvoda mesu na bazi biljaka [130].
2. Stočna hrana:
- Izvor vlakana i bioaktivnih jedinjenja: Pogače od bobičastog voća mogu se koristiti kao komponenta u ishrani životinja, obogaćujući obroke vlaknima, mineralima i antioksidansima. Pravilna obrada omogućava smanjenje antinutritivnih faktora i povećava iskoristivost hranljivih materija [131].
3. Kozmetička industrija:
- Prirodni izvor antioksidanasa: Ekstrakti iz pogača bobičastog voća bogati su polifenolima i flavonoidima, koji su cenjeni sastojci u kozmetičkim preparatima zbog svojih antioksidativnih i zaštitnih svojstava na kožu [121].
4. Farmaceutska industrija:
- Ekstrakcija bioaktivnih jedinjenja: Pogače bobičastog voća predstavljaju izvor polifenola, antocijanina i drugih bioaktivnih komponenti sa potencijalnim antiinflamatornim, antioksidativnim i drugim korisnim biološkim efektima, što ih čini pogodnim za razvoj dodataka ishrani i farmaceutskih preparata [132, 133].

#### 2.4.2.1 Pogača crne ribizle

Crna ribizla je bogata antocijaninima, flavonolima i drugim polifenolima, koji dokazano deluju kao snažni antioksidansi i imaju protivupalne efekte [134-136]. Plodovi crne ribizle sadrže visok nivo vitamina C, kao i značajne količine kalijuma, kalcijuma, magnezijuma i gvožđa [136, 137]. Prerađeni proizvodi od crne ribizle (npr. pire, sok) zadržavaju značajnu količinu vitamina C i antocijanina, iako se tokom varenja deo ovih jedinjenja gubi, ali ostaje visok nivo antioksidativne aktivnosti [136]. Iz ovih razloga, a i usled drugih direktnih povoljnih uticaja na zdravlje ljudi, ova biljka je veoma interesantna sa aspekta proizvodnje, prerade i konzumacije.

Pogača crne ribizle sadrži velike količine rastvorljivih i nerastvorljivih vlakana (do 65% suve materije), što je čini izuzetno korisnom za zdravlje creva i regulaciju probave [138]. Takođe, ona je bogata antocijaninima i drugim polifenolima, koji ostaju prisutni i nakon ceđenja soka, te doprinose ukupnom antioksidativnom kapacitetu i potencijalnim zaštitnim efektima na zdravlje [139-143]. Zbog visoke bioaktivnosti i sadržaja vlakana, pogača je pogodna za razvoj funkcionalnih i dijetetskih proizvoda, a takođe može doprineti zdravlju mikrobiote creva [138, 140, 142]. U tabeli 2.4. dat je prosečan sastav pogače crne ribizle.

Tabela 2.4. Sastav pogače crne ribizle [144].

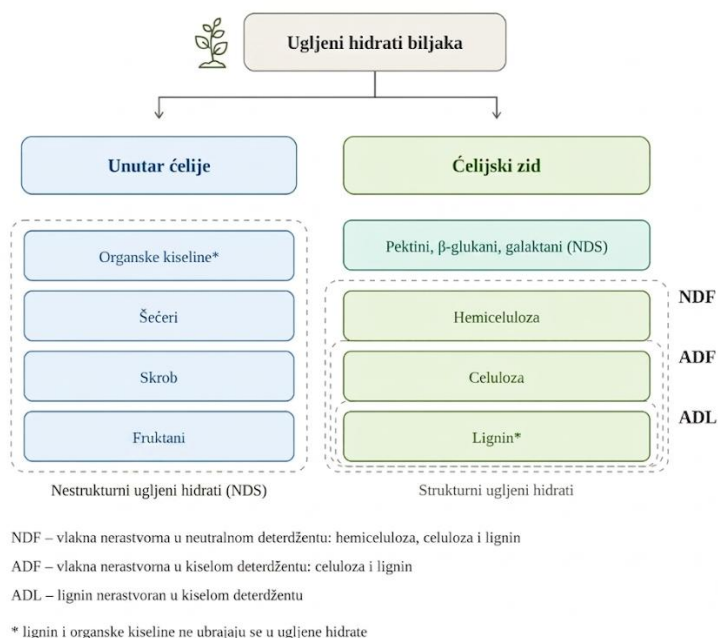
|                                    | %    |
|------------------------------------|------|
| Proteini (N x 6,25)                | 11,1 |
| Pepeo                              | 3,3  |
| Vlaga                              | 7,5  |
| Lipidi                             | 5,9  |
| Ugljeni hidrati                    | 71,9 |
| Ukupna rastvorna dijetetska vlakna | 30,0 |

|                                      | %    |
|--------------------------------------|------|
| Pektin rastvorljiv kiselinski        | 5,8  |
| Kalcijum-vezani pektin               | 9,8  |
| Hemiceluloza rastvorljiv bazno       | 14,4 |
| Ukupna nerastvorna dijetetska vlakna | 46,9 |
| Celuloza                             | 17,2 |
| Lignin rastvorljiv bazno             | 0,4  |
| Pepeo                                | 3,7  |
| Klason lignin                        | 37,9 |
| Čista nerastvorna dijetetska vlakna  | 61,3 |

## 2.4.3 Ključne komponente nusproizvoda industrije hrane

### 2.4.3.1 Ugljeni hidrati

Ugljeni hidrati u biljkama dele se na strukturne, koji izgrađuju ćelijski zid, i nestrukturne, koji se nalaze u sadržaju ćelije [145]. Nestrukturne ugljene hidrate čine pre svega skrob i rastvorni šećeri, dok se strukturni najčešće određuju deterdžentskom metodom. Ovom metodom se izdvajaju tri frakcije: vlakna nerastvorna u neutralnom deterdžentu (NDF), koja obuhvataju hemicelulozu, celulozu i lignin; vlakna nerastvorna u kiselom deterdžentu (ADF), koja obuhvataju celulozu i lignin; i lignin nerastvoran u kiselom deterdžentu (ADL) [146]. Sadržaj hemiceluloze se određuje kao razlika NDF i ADF, a sadržaj celuloze kao razlika ADF i ADL [146]. Lignin se, iako se određuje u okviru ove analize, ne ubraja u ugljene hidrate, jer je reč o aromatičnom polimeru koji je u ćelijskom zidu fizički i hemijski povezan sa polisaharidima. Na slici 2.13. prikazana je klasifikacija ugljenih hidrata biljaka [147].



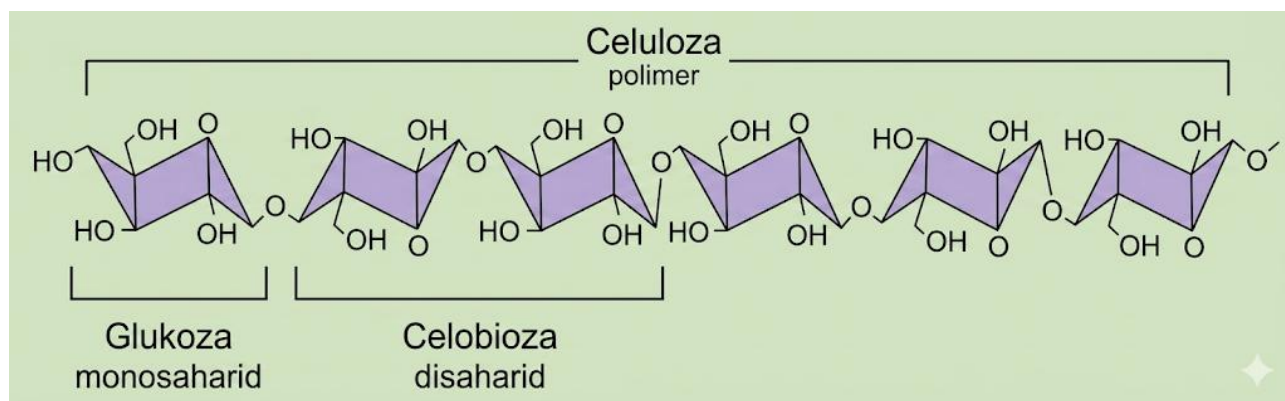
Slika 2.13. Podela ugljenih hidrata biljaka [147].

Lignoceluloza spada u grupu dijetetskih vlakana za koja se smatra da, ukoliko se koriste u ishrani nekih životinja i ljudi, mogu doprineti zdravlju i kontrolisanju telesne težine [148]. U grupu dijetetskih vlakana spadaju i drugi ugljeni hidrati za koje mnoge vrste sisara nemaju potrebne enzime kako bi ih svarili kao što su fruktani, β-glukani i pektinske supstance [145]. Dijetetska vlakna u

digestivnom traktu koji ne sadrži potrebne enzime za njihovu razgradnju podležu fermentaciji mikroorganizmima digestivnog trakta, čime nastaju određena hranljiva jedinjenja koja imaju pozitivan uticaj na zdravlje organizma [145].

#### 2.4.3.1.1 Celuloza

Najveći udeo lignoceluloze se sastoji od celuloze, homopolimera koji je izgrađen od glukopiranoznih jedinica povezanim  $\beta$ -(1,4) vezama [149]. Osnovna gradivna jedinica celuloze je celobioza – dimer glukoze [149]. Nekoliko osnovnih lanaca ovog molekula se mogu povezati vodoničnim vezama i van der Valsovim silama, pa nastaju mikrofibrile koje se dalje ujedinjuju i formiraju vlakna [150]. U molekulu celuloze se mogu naći kristalni i amorfni delovi koji zajedno čine ovaj veliki molekul. Kristalni regioni u molekulu celuloze su veoma kruti i teže dostupni enzimima za razgradnju, dok su amorfni regioni mnogo lakše dostupni [151]. Na slici 2.14. je prikazana struktura jednog dela molekula celuloze.



Slika 2.14. Struktura celuloze [152].

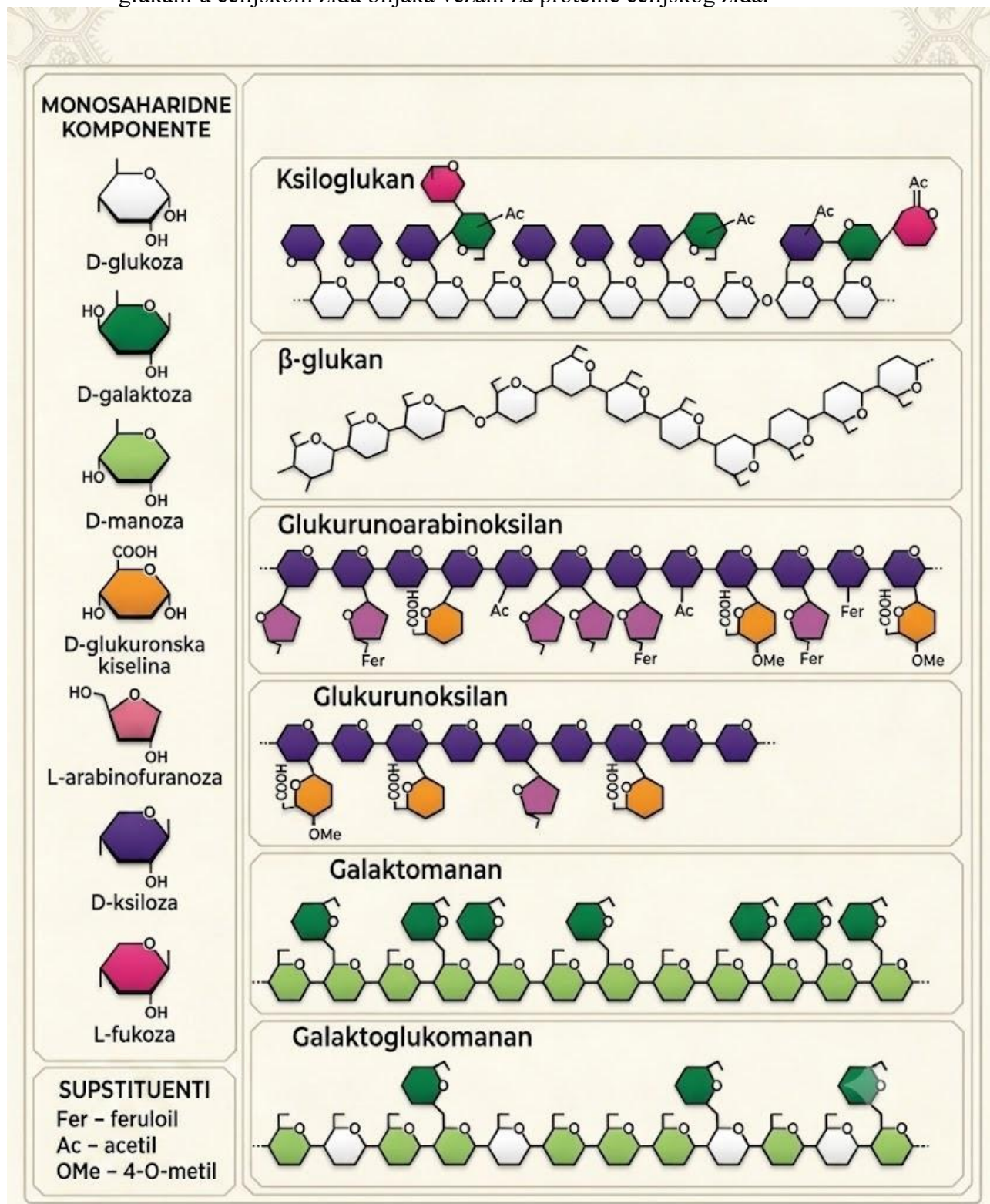
#### 2.4.3.1.2 Hemiceluloza

Hemiceluloza je velika grupa različitih polisaharida, čiji osnovni lanac može biti izgrađen od različitih monosaharida povezanih različitim glikozidnim vezama [151]. Ovi polimeri imaju manju molekulsku masu od celuloze, i sastoje se od kraćih lanaca, oko 500-3000 monosaharidnih jedinica u odnosu na 7000-15000 glukoznih ostataka koji čine molekul celuloze [151]. Struktura hemiceluloze je veoma razgranata i poseduje acetil grupe vezane za polimerni lanac [149]. Generalno, u sastav hemiceluloze ulaze pentoze (arabinoza, ramnoza i ksiloza), heksoze (glukoza, galaktoza i manoza) i uronske kiseline (D-glukuronska, D-galakturonska i 4-O-metilglukuronska kiselina). Hemiceluloza se sastoji u najvećoj meri od sledećih polisaharida koji su šematski prikazani na slici 2.15. [153]:

- Ksilani – polimeri koji imaju zajedničku osnovu sastavljenu od ksilopiranoznih jedinica povezanih  $\beta$ -(1,4) vezama, za koju se mogu vezati različiti monomeri koji mogu biti D-glukuronska kiselina, L-arabinoza i 4-O-metil estri D-glukuronske kiseline.
- Manani – osnova polimera se sastoji od manopiranoznih jedinica povezanih  $\beta$ -(1,4) vezama. Ukoliko je za osnovni lanac povezana galaktoza  $\alpha$ -(1,6) vezom formira se galaktomanan. Glukomanani imaju osnovni lanac izgrađen od manoze i glukoze povezanih  $\beta$ -(1,4) vezom u odnosu 1:3, a za osnovni lanac može biti vezan ostatak galaktoze.
- Ksiloglukani – slično celulozi osnova im je izgrađena od glukopiranoznih jedinica povezanih  $\beta$ -(1,4) vezama. Razlika u odnosu na celulozu jeste što se osnovni lanac grana preko ksiloze povezane  $\alpha$ -(1,6) vezom za glukozu. Osim glukoze i ksiloze, u molekul ksiloglukana sadrži i jedinice galaktoze. Glukoza, ksiloza i galaktoza se najčešće nalaze u odnosu 4:3:1. Postoje i određene razlike u strukturi ovog molekula u zavisnosti od porekla odnosno biljke iz koje potiče. Ksiloglukan, u zavisnosti od familije biljaka iz koje potiče,

može sadržati u određenom udelu fukozu i arabinozu koji su vezane za molekul preko ostataka galaktoze.

- $\beta$ -Glukani – za razliku od celuloze ovaj tip glukana ima glukozu povezanu  $\beta$ -(1,3) i  $\beta$ -(1,4) vezama u odnosu 1:2 ili 1:3. Ovakva struktura dovodi do stvaranja molekula koji ima manje uređenu strukturu od celuloze, ali veću rastvorljivost. Postoje dokazi da su  $\beta$ -glukani u ćelijskom zidu biljaka vezani za proteine ćelijskog zida.



Slika 2.15. Struktura hemiceluloze [153].

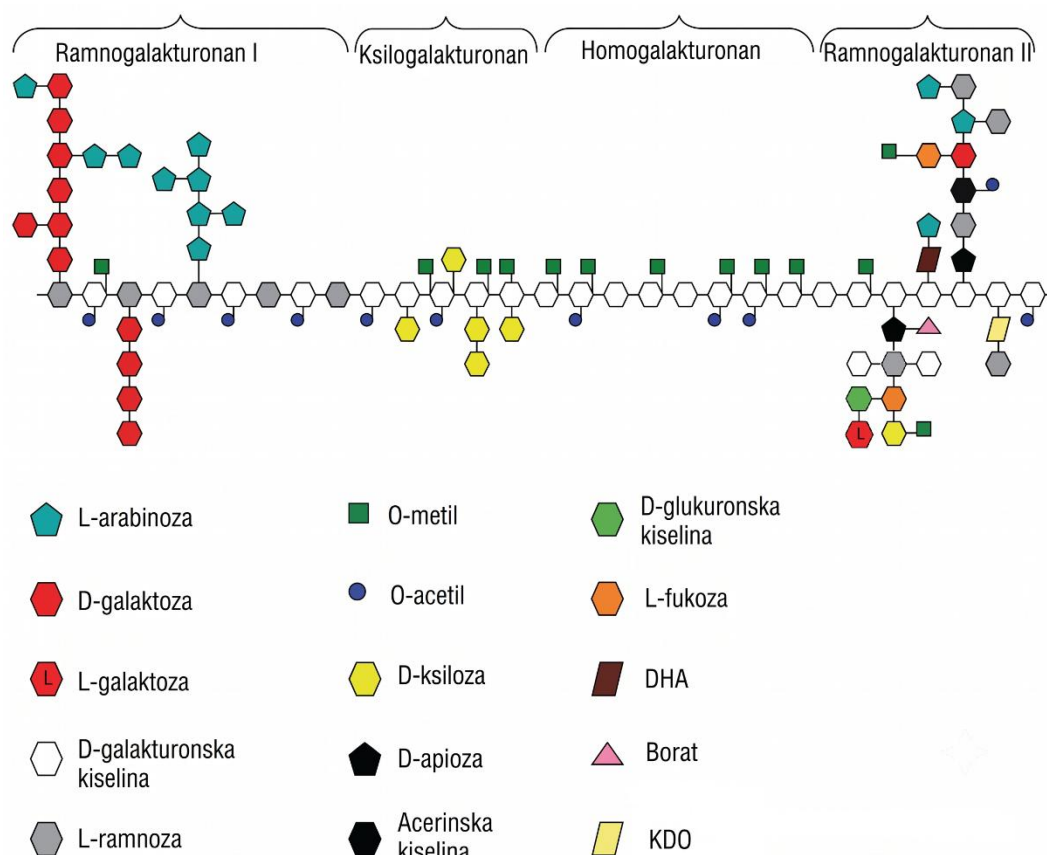
### 2.4.3.1.3 Pektinski polisaharidi

Čine grupu polisaharida koji imaju značajne razlike u svojoj strukturi [154]. Glavni monomer je D-galakturonska kiselina povezana  $\alpha$ -(1,4) vezom, ali glavni lanac može biti prekinut jedinicama L-ramnoze na kojima se dešava grananje [154]. Grananje se najčešće dešava preko monomera  $\alpha$ -L-arabinoze i  $\beta$ -D-galaktoze [155]. Jedinice osnovnog lanca D-galakturonske kiseline mogu biti metilovane [154]. U zavisnosti od procenta metilovanih jedinica razlikuju se visokometilovani i niskometilovani pektini [155]. Glavne grupe pektina su homogalakturenani i ramnogalakturenani [154]. Homogalakturenani izgrađuju „glatki deo“ pektina, a ramnogalakturenani izgrađuju deo koji je poznat kao „vlaknast“ region [155]. Manje zastupljeni delovi pektina se klasifikuju kao ksilogalakturenan i ramnogalakturenan II [155].

Strukturni elementi pektina označeni su kao: [156]:

- Homogalakturenan, sastoji se od  $\alpha$ -(1,4)- vezanih ostataka D-galakturonske kiseline;
- Ksilogalakturenan, izgrađen od homogalakturenana koji je supstituisan ksilozil monomerima;
- Ramnogalakturenan I, lanac ponovljenih jedinica  $\alpha$ -(1,2)-L-ramnoza- $\alpha$ -(1,4)-D-galakturonska kiselina, koji se može granati galaktozil ili arabinozil ostacima;
- Ramnogalakturenan II, homogalakturenan koji se grana sa različitim ostacima monosaharida;
- Arabinan, sastoji se od lanca  $\alpha$ -(1,5)-vezanih arabinozil ostataka koji se mogu granati arabinozil monomerima  $\alpha$ -(1,2)- i  $\alpha$ -(1,3)- vezama;
- Arabinogalaktan, molekul sa osnovnim lancem izgrađenim od  $\beta$ -D-galaktopiranoznih jedinica na kome su supstituisani arabinozil ostaci.

Struktura pektina i njegovi elementi su predstavljeni na slici 2.16.



Slika 2.16. Struktura pektina [156].

Američko hemijsko društvo je izvršilo klasifikaciju pektina na osnovu fizičko-hemijskih osobina: protopektin, pektinska kiselina, pektininska kiselina i pektin [77]. Protopektin je nerastvoran u vodi, i njegovom parcijalnom hidrolizom se dobija pektin ili pektinske kiseline [77]. Pektinska kiselina je

rastvoran polimer galakturonana koji sadrži neznatnu količinu metoksi grupa a njene soli se nazivaju pektati [157]. Pektininska kiselina je po strukturi lanac poligalakturonana koji sadrži do 75% metilovanih jedinica galakturonata, a njene soli se nazivaju pektinati [157]. Pektin (polimetil galakturonat) je polimer koji ima najmanje 75% karboksilnih grupa jedinica galakturonata esterifikovanih metanolom [157].

#### 2.4.3.2 *Proteini*

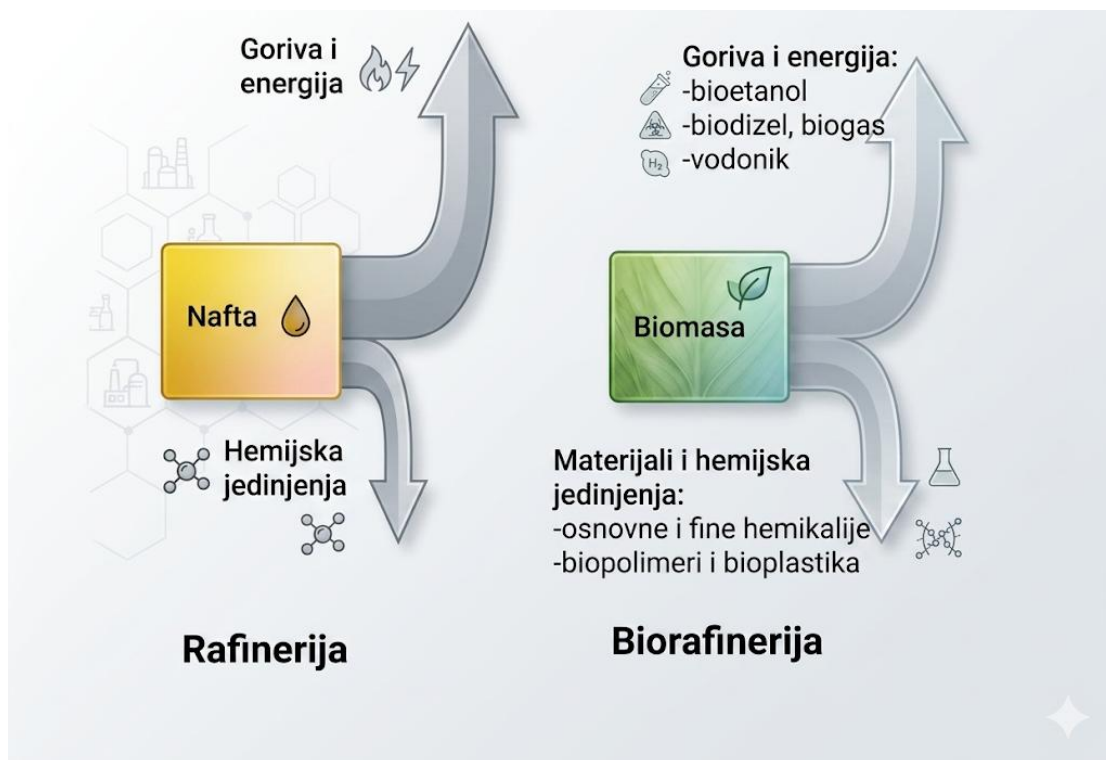
Proteini se mogu naći u različitim delovima biljaka, i u zavisnosti od biljke se više ili manje mogu upotrebiti u ljudskoj, ili životinjskoj ishrani [158]. U ljudskoj ishrani se u najvećoj meri koriste proteini poreklom iz mahunarki, dok se u životinjskoj ishrani u velikoj meri koriste proteini koji se nalaze u nusproizvodima agroindustrije [159, 160]. Tako da, proteini iz biljnih materijala predstavljaju značajan, ali često nedovoljno iskorišćen resurs, posebno kada se nalaze u obliku sačmi ili pogača koje nastaju kao nusproizvodi industrije hrane [159]. Tokom prerade voća, povrća, žitarica, uljarica i mahunarki, nastaju velike količine otpada kao što su ljuske, kore, semenke, listovi i pulpa, od kojih neki sadrže znatne količine proteina sa manje ili više povoljnim nutritivnim i funkcionalnim svojstvima [161]. Prema procenama Organizacije za hranu i poljoprivredu, pri Ujedinjenim Nacijama prosečno 1,3 milijardi tona jestivih nusproizvoda prehrambene industrije se proizvodi godišnje [161]. Ekstrakcija biljnih proteina iz ovih materijala obično uključuje fizičke (npr. mLevenje, ultrazvuk), hemijske (alkalna ili kisela ekstrakcija) i enzimske metode, koje omogućavaju oslobađanje i koncentrisanje proteina iz kompleksne biljne matrice [162]. Dobijeni proteini se dalje karakterišu u pogledu aminokiselinskog sastava, rastvorljivosti, emulgujućih i penastih svojstava, što ih čini pogodnim za upotrebu u prehrambenoj industriji, ali i kao sirovinu za proizvodnju bioaktivnih peptida i bioplastike [162-164].

Biljni proteini iz nusproizvoda prehrambene industrije, kao što su proteini iz ljuski soje, semenki bundeve, ostataka graška ili suncokreta, mogu obogatiti ljudsku i stočnu ishranu, posebno u kontekstu prelaska na održive izvore proteina [161]. Iako biljni proteini često imaju nepovoljan aminokiselinski profil (npr. deficit lizina ili metionina), kombinovanjem različitih izvora može se postići potpuni aminokiselinski sastav [165]. Osim toga, prisustvo antinutritivnih faktora (fitati, tanini, inhibitori proteaza) može smanjiti biološku vrednost proteina, ali se njihova koncentracija može umanjiti odgovarajućom obradom (termičkom, fermentacijom ili enzimskom hidrolizom) [166]. Upotreba biljnih proteina iz nusproizvoda agroindustrije doprinosi održivoj proizvodnji hrane, smanjenju otpada i razvoju inovativnih proizvoda sa dodatom vrednošću, što je u skladu sa principima cirkularne ekonomije i zaštite životne sredine [167, 168]

## 2.5 FRAKCIONISANJE NUSPROIZVODA INDUSTRIJE HRANE

### 2.5.1 Koncept biorafinerije

Kako bi se ekonomski rast i razvoj mogao okarakterisati kao održiv, potrebno je koristiti obnovljive sirovine i obezbediti njihovo konstantno snabdevanje [169]. U proizvodnji energenata, koriste se sirovine iz petrohemijskih izvora, koje nisu obnovljive a imaju veoma negativan uticaj na životnu sredinu [170]. Ekonomija dobijanja energije se svakako može oslanjati na dobijanje iz različitih obnovljivih resursa kao što su vetar, sunce, voda i biomasa, ali ekonomija dobijanja hemijskih supstanci je mnogo više zavisna od biomase, tako da razvoj biorafinerija omogućava integrisanu proizvodnju hrane, hraniva, hemikalija, materijala i goriva [170]. Koncept biorafinerije je zapravo sličan današnjem konceptu naftne rafinerije koja proizvodi različita goriva i hemikalije iz nafte, tako da biorafinerija koristi različite sastavne delove biomase i njihove intermedijare tako da maksimalno povećava vrednost početnog materijala [169]. Na slici 2.17. je prikazano poređenje naftne rafinerije i biorafinerije i proizvoda koji se mogu dobiti.



Slika 2.17. Poređenje koncepta rafinerije i biorafinerije [170].

Prednosti iskorišćenja biomase u odnosu na korišćenje sirove nafte su obnovljivost, bezbedno i jednostavno skladištenje, mogućnost zamene sirove nafte i pristupačnost [171]. Osim toga pri preradi biomase ne dolazi do emisije ugljenika. Biorafinerija se može definisati kao proces koji koristi resurse kao što su agro-industrijska biomasa ili drvena biomasa kako bi proizvela energiju i veliki broj različitih hemikalija ili (bio)materijala [169].

Kako bi koncept biorafinerije bio ekonomski isplativ cilj je potpuno iskorišćenje komponenata biomase, time što se dobija više proizvoda, čime se maksimalno koristi vrednost sirovine a dobija minimalna količina otpada [169]. U biorafineriji se mogu proizvesti u manjim količinama neki proizvodi visoke vrednosti kao što su sastojci funkcionalne hrane i farmaceutski proizvodi, kao i proizvodi niske vrednosti ali u velikim količinama kao što su bioetanol i biodizel [169]. Četiri glavna sistema koncepta biorafinerije su [170]:

1. Biorafinerija lignoceluloznih sirovina koja se zasniva na korišćenju sirovih materijala kao što je biomasa koja sadrži celulozu i nusproizvodi koji nastaju u procesu dobijanja ulja;
2. Biorafinerija celih biljaka u kojima se koriste žitarice i kukuruz;
3. Zelene biorafinerije koje koriste biomase poput zelene trave, lucerke, deteline i nezrele žitarice;
4. Koncept biorafinerije sa dve platforme u kojima je jedna platforma za dobijanje šećera (pentoza i heksoza). a druga za dobijanje singasa.

Treba imati u vidu da u današnje vreme biorafinerija predstavlja potpuno drugačiji koncept nego što je to bilo pre samo nekoliko godina, kada je koncept biorafinerije podrazumevao proizvodnju biogoriva i bioetnola, relativno jeftinih sirovina u velikim količinama, i u manjoj meri proizvodnju nekih hemikalija i biopolimera (slika 19.). Pri ovom konceptu je bio fokus na iskorišćenje otpadnih sirovina, međutim u današnje vreme se sve više govori o iskorišćenju svih otpadnih frakcija i minimalizovanju bilo kakvog otpada, a posebno u prehrambenoj tehnologiji. Pojam „Univerzalne Strategije Povratka“ opisuje komercijalnu upotrebu značajnih jedinjenja nusproizvoda industrije hrane kao alternativnih izvora biološki aktivnih jedinjenja za formulaciju funkcionalne hrane i nutraceutika [172]. Zato je projekat „Biorefinery Euroview“ došao do novog načina shvatanja biorafinerije: „Biorafinerije se mogu opisati kao integrisane bioindustrije koje koriste različite

tehnologije kako bi proizvele proizvode kao što su hemikalije, biogoriva, sastojci hrane, biomaterijali, vlakna, toplota i struja, koja za cilj imaju maksimizaciju dodate vrednosti uz tri stuba održivosti (životna sredina, ekonomija i društvo)“ [173]. Ekstrakcija novih biomolekula iz nusproizvoda industrije hrane može uticati na nekoliko grana industrije kao što su hrana, kozmetika, biomedicina i agronomija [172]. Da bi se omogućila široka proizvodnja ovih biomolekula potrebno je imati uvid u razvoj, inovacije i praktične izazove u oblastima nanobiotehnologije i enzimske tehnologije [173].

Takođe, potrebno je imati u vidu da u slučaju korišćenja nusproizvoda industrije hrane, a posebno nusproizvoda agroindustrije, proizvodnja nekih biomolekula zavisi od sezone. Zato se u novijim istraživanjima fokus prebacuje između ostalog na [173]:

1. Korišćenje različitih sirovina i inovativnih načina uzgoja za celogodišnju upotrebu raznih resursa, uključujući korišćenje biomase treće generacije, tj. algalne biomase;
2. Produžavanje skladišnog veka sirovina i njihovih nusproizvoda;
3. Napredak u novim tehnikama sortiranja i prikupljanja (automatizacija), i razvoj održivih metoda za karakterizaciju prikupljenog biotpada i decentralizovanih tehnologija za njihovu stabilizaciju, frakcionisanje i transport unutar logističkih lanaca;
4. Optimizacija uslova u odnosu na dostupnost i sadržaj ciljnih biomolekula koje treba izdvojiti ili konvertovati u jedinjenja sa dodatom vrednošću, u skladu sa konceptom biorafinerije.

### **2.5.2 Frakcionisanje kao ključni korak u biorafinerijskom pristupu**

Savremeni koncept biorafinerije ne oslanja se više isključivo na primarne sirovine, već sve više uključuje nusproizvode prehrambene i agroindustrije kao vredne resurse za izolaciju i konverziju biološki aktivnih molekula [172]. Da bi se ovi materijali što efikasnije iskoristili, frakcionisanje predstavlja neophodan prvi korak u procesu valorizacije biomase, omogućavajući selektivnu separaciju različitih frakcija koje sadrže polifenole, polisaharide, proteine, lipide i druge jedinjenja od farmakološkog, prehrambenog ili industrijskog značaja [171].

Frakcionisanje uključuje niz fizičko-hemijskih i enzimskih procesa čiji je cilj razdvajanje kompleksnih matriksa sirovine na njihove pojedinačne komponente. Na primer [173]:

- Vlakna i hemiceluloza se mogu selektivno izdvojiti pomoću alkalne ekstrakcije ili ekstrakcije vodenom parom.
- Polifenolna frakcija se izdvaja upotrebom rastvarača voda-etanol pod kontrolisanim uslovima (pH, temperatura), uz pomoć drugih tehnika kao što su ultrazvuk ili pulsirajuće električno polje.
- Proteinske frakcije mogu se izolovati pomoću enzimske hidrolize.

Ovakva strategija omogućava „zero-waste“ pristup, u kojem se svaka frakcija otpadnog materijala koristi za proizvod određenog kvaliteta i tržišta, u skladu sa principima održivosti i cirkularne bioekonomije.

Tehnološke inovacije u frakcionisanju [173]:

- Napredne metode uključuju tzv. kaskadnu ekstrakciju, gde se svaka sledeća faza procesa zasniva na ostacima prethodne, čime se optimizuje iskorišćenje sirovine;
- Superkritična ekstrakcija CO<sub>2</sub> za nepolarne molekule (fitosteroli, karotenoidi),
- Membranske tehnike (mikrofiltracija, nanofiltracija) za koncentraciju i prečišćavanje bioaktivnih peptida,
- Mikrotalasi i subkritična voda za ekstrakciju fenola i oligosaharida bez toksičnih rastvarača.

Značajno je naglasiti da uspešno frakcionisanje olakšava dalju biotransformaciju komponenti u jedinjenja sa visokom dodatom vrednošću, poput enzima, bioplastike (polihidroksialkanoati), prirodnih boja i mirisa, ili mikroinkapsuliranih sastojaka za funkcionalne hrane [171]. Prema literaturi, kora paradajza i ljuska luka, koje su nekada bile samo otpad, sada se frakcionišu u fenolne

komplekse koji imaju antikancerogena i antioksidativna svojstva. Pivski trop se koristi za izolaciju protein-polifenol kompleksa kao dodatak stočnoj hrani, dok se iz koštica masline izoluju lignin i hemiceluloza za proizvodnju bioetanolu i furfurala [173].

Efikasno frakcionisanje nusproizvoda industrije hrane čini srž modernog modela biorafinerije. Time se omogućava integrisana proizvodnja, minimalizuje otpad i smanjuje zavisnost od primarnih resursa. Budući razvoj ove oblasti mora se usmeriti ka:

- unapređenju automatizovanih i energetski efikasnih tehnologija frakcionisanja,
- standardizaciji metodologija ekstrakcije i karakterizacije frakcija,
- razvoju tržišta i regulative za bioaktivne sastojke iz sekundarnih resursa.

## **2.6 PROTEINSKI HIDROLIZATI**

### **2.6.1 Definicija i klasifikacija hidrolizata proteina**

Proteinski hidrolizati su fragmenti proteina dobijeni kontrolisanom hidrolizom (enzimskom ili hemijskom), pri čemu se cepanjem peptidnih veza formiraju peptidi različitih dužina i slobodne aminokiseline [174]. Podela proteinskih hidrolizata prema stepenu hidrolize (DH, stepen hidrolize) nije univerzalno standardizovana u naučnoj literaturi, ali je uobičajeno da se hidrolizati klasifikuju kao proizvodi sa niskim, srednjim ili visokim stepenom hidrolize na osnovu procenta hidrolizovanih peptidnih veza [175]. Ova podela proističe iz razlike u funkcionalnim i bioaktivnim svojstvima hidrolizata dobijenih pri različitim stepenima hidrolize, a koristi se u brojnim naučnim radovima i pregledima. U nekim radovima se pojavljuje podela i na osnovu molekulskih masa dobijenih peptida koja se svakako može povezati i sa stepenom hidrolize (što je viši stepen hidrolize to je više malih peptida i aminokiselina prisutno) [175].

- Nizak stepen hidrolize ( $DH < 10\%$ ): Hidrolizati sa ograničenim brojem hidrolizovanih veza, često se koriste zbog boljih funkcionalnih svojstava (npr. penjenje, emulgovanje) [176]
- Srednji stepen hidrolize ( $DH 10\text{--}20\%$ ): Smeša peptida srednje veličine, često se koristi za poboljšanje rastvorljivosti i bioraspoloživosti proteina [177, 178]
- Visok stepen hidrolize ( $DH > 20\%$ ): Dobijaju se hidrolizati sa visokim udelom malih peptida i slobodnih aminokiselina, često sa izraženom bioaktivnošću, ali i gorčinom [179, 180]

U naučnim radovima se, u zavisnosti od cilja istraživanja, koriste različiti pragovi za ovu podelu, ali je osnovni princip isti: što je veći stepen hidrolize, to je veći udeo malih peptida i slobodnih aminokiselina, što utiče na funkcionalna i senzorna svojstva hidrolizata [178, 180, 181]

Hidroliza omogućava oslobađanje bioaktivnih peptida sa specifičnim fiziološkim efektima (npr. antihipertenzivni, antioksidativni ili imunomodulatorni), što ih čini ključnim za farmaciju, funkcionalnu hranu i nutraceutike [182, 183].

Hidrolizati se dobijaju iz sirovih proteina, biljnog ili životinjskog porekla [184]. U cilju povećanja održivosti i cirkularne ekonomije, hidrolizati sa izraženim korisnim svojstvima se mogu dobiti i iz nusproizvoda inustrije hrane koji su bogati proteinima [185].

- Biljni izvori: Otpaci uljarica (suncokret, uljana repica), mahunarke (soja, grašak), žitarice (pšenica, kukuruz) [185]
- Životinjski izvori: Surutka, kolagen (koštani otpad), perje [186]

U tabeli 2.5 dat je pregled različitih metoda za hidrolizu proteina koji se mogu primeniti kao i njihove glavne prednosti i nedostaci.

*Tabela 2.5. Metode hidrolize proteina i njihove prednosti i nedostaci [185].*

| Metoda hidrolize | Prednosti                                        | Nedostaci                                                   |
|------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Enzimska         | Visoka specifičnost, nema toksičnih nusproizvoda | Skupi enzimi i prečišćavanje enzima                         |
| Kiselinska/bazna | Brza, jeftina                                    | Gube se esencijalne aminokiseline, dolazi do stvaranja soli |
| Fizička          | Jednostavna primena                              | Neselektivna hidroliza proteina, denaturacija               |

Optimizacija procesa hidrolize proteina uključuje kombinovanje više metoda kako bi se povećali prinosi [187].

## 2.6.2 Primena hidrolizata proteina

Proteinski hidrolizati mogu ispoljavati razne efekte na zdravlje ljudi i životinja:

- Antihipertenzivno delovanje: Peptidi (npr. Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro) inhibiraju angiotenzin-konvertujući enzim (ACE), smanjujući krvni pritisak [188].
- Antioksidativna svojstva: Peptidi sa His, Cys, Met u strukturi redukuju oksidativni stres [189].
- Imunomodulacija: Hidrolizati surutke stimulišu makrofage i povećavaju proizvodnju citokina [190].

Mogu naći primenu u različitim industrijama:

- Prehrambena industrija: Zamena za proteine mesa u mesnim proizvodima, stabilizatori emulzija, izvori proteina za sportiste [191, 192].
- Stočna hrana: Povećana svarljivost i aminokiselinska biorasploživost [186].
- Kozmetika: „Anti-aging“ efekti kroz stimulaciju kolagena [193].

Glavni izazovi su primene ovih jedinjenja su gorki ukus zbog hidrofobnih peptida koji se može ukloniti selektivnom separacijom peptida, ili umanjiti kontrolom proizvoda hidrolize i stabilnost tokom skladištenja, pošto su dobijeni materijali higroskopni i podložni oksidaciji [194].

## 2.7 PREBIOTICI

### 2.7.1 Definicija prebiotika i podela

Pojam prebiotika je prvi put uveden u naučnu literaturu krajem prošlog veka, i prva definicija prebiotika je glasila „prebiotici su nedigestibilni sastojci hrane koji ispoljavaju pozitivno dejstvo na domaćina time što selektivno stimulišu rast i/ili aktivnost jedne ili određenog broja bakterija u gastrointestinalnom traktu čime se poboljšava zdravlje domaćina“ [195]. Nakon prve definicije isti naučnici su u određenoj meri promenili definiciju tako da je ona glasila „prebiotik je sastojak koji je selektivno fermentisan i koji omogućava specifične promene u sastavu i/ili aktivnosti gastrointestinalne mikrobiote i ispoljava pozitivno dejstvo“ [195]. Vremenom se koncept prebiotika menjao tako da su nastajale i druge definicije koje su bolje i bliže opisivale pojam prebiotika, ali su sve imale određene nedostatke tako da nisu precizno mogle da opišu šta se zapravo smatra pod pojmom prebiotika i koja jedinjenja mogu da se karakterišu kao prebiotici. Zaključak je da je potrebno doći do definicije koja uzima u obzir sve aspekte prebiotika, od strukture, specifičnosti, mehanizma dejstva i dejstva na zdravlje. Zato su naučnici došli do konsenzusa i definicije koja glasi „prebiotik je supstrat koji selektivno koriste mikroorganizmi domaćina i ispoljava pozitivan efekat na zdravlje“ [196].

Prednosti navedene definicije se ispoljavaju u sledećem [196]:

- Iako se mnogi prebiotici koriste oralno, mogu se primenjivati i direktno na druge delove tela koji sadrže mikroorganizme kao što su vaginalni trakt i koža.
- Efekti na zdravlje se još uvek istražuju ali su trenutno poznati efekti koje prebiotici ispoljavaju u gastrointestinalnom traktu, kardiometabolizmu, mentalnom zdravlju i kostima.
- Prebiotici koji su danas poznati su po strukturi ugljeni hidrati, ali i druge supstance kao što su polifenoli i polinezasićene masne kiseline koje se prevode u konjugovane masne kiseline mogu biti prebiotici po novoj definiciji, ukoliko se dokaže dejstvo na ciljanog domaćina.
- Pozitivni efekti prebiotika na zdravlje se moraju potvrditi za ciljanog domaćina, preko uticaja na mikrobiotu domaćina.

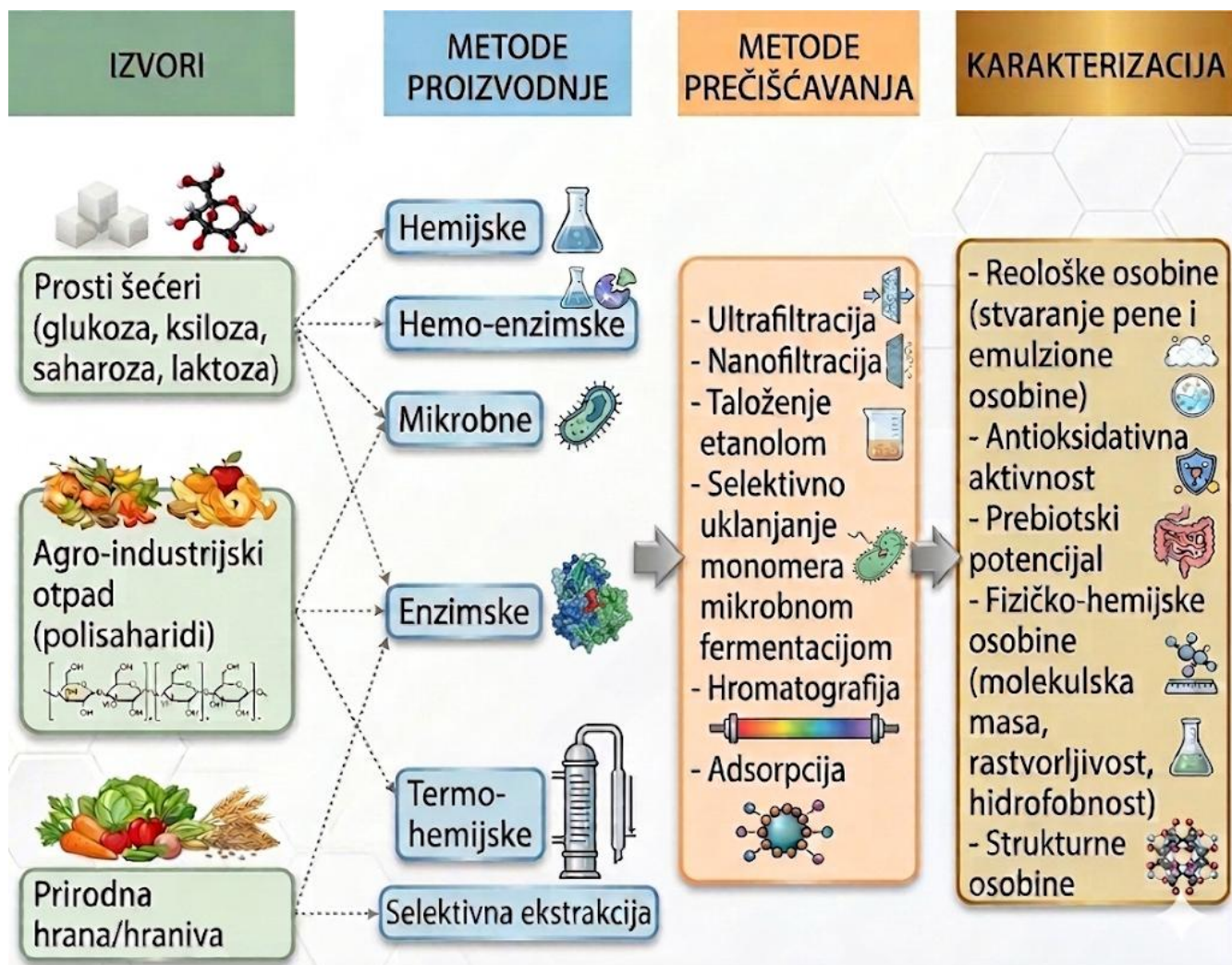
Postoji veliki broj različitih prebiotika. Većina prebiotika su ugljeni hidrati po strukturi, i oni su najviše istraženi, ali postoje dokazi da i neka druga jedinjenja mogu imati prebiotske osobine [197]. Osnovna podela prebiotika [196, 197]:

1. Fruktani: u ovu grupu spadaju inulin i fruktooligosaharidi (FOS), i sačinjeni su od lanca fruktoze povezane  $\beta$ -(2,1) glikozidnom vezom, s tim što inulin ima veći stepen polimerizacije (do 60) u odnosu na FOS (manje od 10).
2. Galaktooligosaharidi (GOS) su oligosaharidi sačinjeni od galaktoze, i najčešće se dobijaju iz laktoze transgalaktozilacijom.
3. Oligosaharidi dobijeni iz skroba i glukoze: skrob rezistentan na digestiju u gornjem digestivnom traktu pokazuje određena pozitivna dejstva na zdravlje, te se svrstava u kandidate za prebiotike. Polidekstroza je oligosaharid dobijen iz glukoze, i takođe još nije dokazan kao prebiotik, ali postoje dokazi koji ukazuju da ima prebiotske osobine.
4. Drugi oligosaharidi: u ovu grupu spadaju oligosaharidi kao što su POS, a njihove strukture variraju u zavisnosti od izvora pektina. U ovu grupu se takođe mogu klasifikovati i drugi oligosaharidi dobijeni razgradnjom polisaharida kao što su na primer ksilooligosaharidi i mananooligosaharidi.
5. Prebiotici koji nisu oligosaharidi po strukturi: primer ovakvih prebiotika su flavanoli iz kaka, za koje je u kliničkoj studiji pokazano da selektivno stimulišu rast bifidobakterija i laktobacila, mada još uvek nisu formalno klasifikovani kao prebiotici [198].

### 2.7.2 Oligosaharidi

Po definiciji oligosaharidi su molekuli koji sadrže između 2 i 10 monosaharidnih jedinica [199]. Oligosaharidi se u velikom broju slučajeva koriste kao prebiotici, međutim ne ispoljavaju svi oligosaharidi prebiotska svojstva [200]. Oligosaharidi koji ispoljavaju prebiotska svojstva se nazivaju i funkcionalni oligosaharidi [199]. Neki od poznatih prebiotskih oligosaharida su: inulin, fruktooligosaharidi, galaktooligosaharidi, sojini oligosaharidi, ksilooligosaharidi, pirodekstrini, izomaltooligosaharidi i laktuloza [200]. Pored navedenih, u literaturi se mogu pronaći i podaci o drugim oligosaharidima kao što su: mananooligosaharidi, oligosaharidi koji sadrže arabinozu, skrob otporan na hidrolizu, laktosaharoza, pektin i oligosaharidi dobijeni iz pektina i drugi [200]. Kako bi ispoljili svoje dejstvo prebiotici koji su namenjeni za primenu u gastrointestinalnom traktu moraju da dospeju u debelo crevo sa nepromenjenim hemijskim i strukturnim osobinama [201]. Ova jedinjenja su otporna na digestivne enzime sisara tako da ne dolazi do promena tokom njihovog prolaska kroz gornji deo digestivnog trakta, međutim postoje i neki oligosaharidi koji su delimično svarljivi u digestivnom traktu, ali ipak ispoljavaju pozitivno dejstvo na rast i aktivnost mikroorganizama pa se smatraju prebioticima [199, 201]. Dokazani su određeni pozitivni uticaji na zdravlje koje imaju prebiotici kao što su kontrola glukoze u krvi, smanjenje nivoa masti i kontrola telesne težine, imaju i određena povoljna fizičko-hemijska i reološka svojstva [199]. Funkcionalni oligosaharidi se koriste i kao zaslađivači u pekarskoj industriji, ali i kao nosači ili ekscipijensi u farmaceutskim, kozmetičkim i agro-hemijskim proizvodima [199]. Funkcionalni oligosaharidi se mogu dobiti iz različitih izvora i

pomoću različitih metoda proizvodnje. Na slici 2.18. su prikazani potencijalni izvori ovih jedinjenja i načini na koje se mogu proizvesti, izolovati i karakterisati.



Slika 2.18. Metode proizvodnje, izolacije i karakterizacije prebiotika [199].

Osim metoda u kojima se kao polazni materijal koriste prosti šećeri, značajnije su metode za dobijanje iz nusproizvoda industrije hrane, pre svega biljaka, zbog svog visokog sadržaja polisaharida. Korišćenje ovih materijala, koji nastaju kao sporedni proizvod nekog drugog procesa, značajno utiče na smanjenje troškova proizvodnje ovih biološki i industrijski značajnih jedinjenja. Polisaharidi kao što su hemiceluloza i pektin, koji ulaze u sastav uljarica kao što su suncokret i uljana repica, se mogu, koristeći mikrobne, enzimске i termohemijske postupke, hidrolizovati do oligosaharida koji imaju prebiotska svojstva. Uopšteno, iz biomase biljnih materijala se mogu dobiti oligosaharidi, proizvodi hidrolize ksilana, manana, i pektina [202]. Monosaharidni sastav lignocelulozne frakcije suncokretove sačme je takav da se može pretpostaviti da se hidrolizom mogu dobiti ksilooligosaharidi, dok visok udeo pektina u uljanoj repici može poslužiti za proizvodnju pektinskih oligosaharida. Neki oligosaharidi imaju prednost u odnosu na druge, pre svega po pitanju efikasnosti i doze, ali i nekih drugih parametara i fizičko-hemijskih osobina [203]. Neke od potrebnih osobina prebiotika i način na koji se ispoljavaju su prikazani u tabeli 2.6.

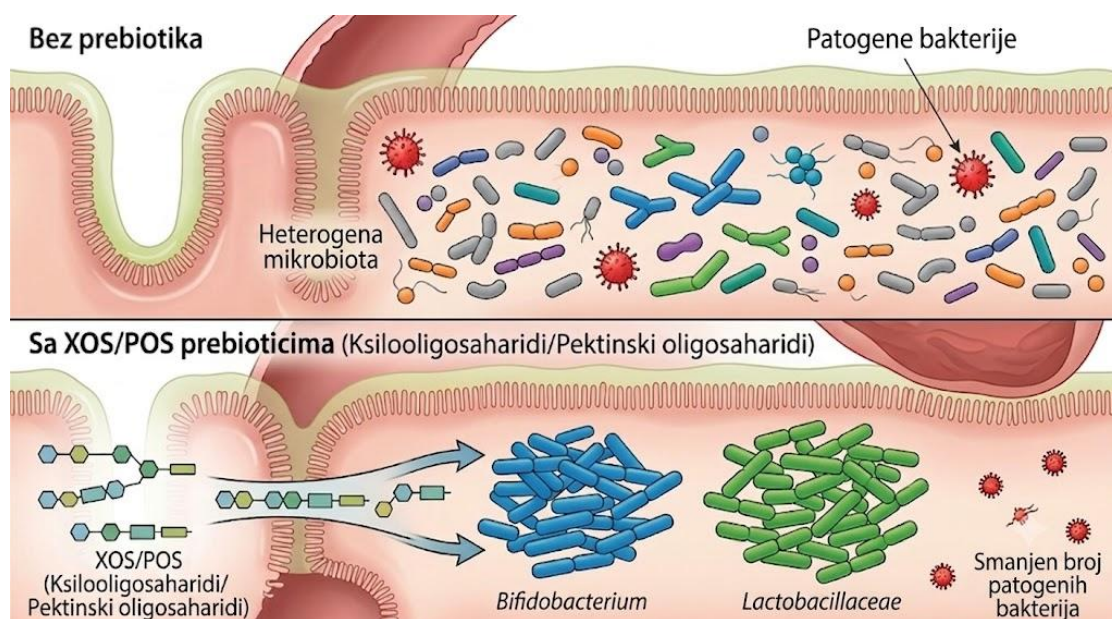
Tabela 2.6. Poželjne osobine oligosaharidnih prebiotika [203].

| Poželjna osobina kod prebiotika | Svojstvo oligosaharida                                                                                             |
|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Aktivan u malim dozama          | Visoko selektivan i efikasno iskorišćen od strane bakterija roda <i>Bifidobacterium</i> i/ili <i>Lactobacillus</i> |

| Poželjna osobina kod prebiotika                                    | Svojstvo oligosaharida                                                                               |
|--------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Odsustvo neželjenih efekata                                        | Selektivno korišćen od strane „dobrih“ bakterija; ne koriste ga mikroorganizmi koji proizvode gasove |
| Ne podleže razgradnji tokom prolaska kroz gastrointestinalni trakt | Velika molekulska masa                                                                               |
| Stabilnost tokom skladištenja i obrade                             | Prisustvo 1-6 veza i piranozil šećera                                                                |

Treba napomenuti da je rod *Lactobacillus*, koji je istorijski obuhvatao većinu bakterija mlečne kiseline sa probiotskim značajem, 2020. godine reklasifikovan u 25 rodova na osnovu analize kompletnih genoma, uporedne identičnosti aminokiselinskih sekvenci, filogenije jezgra genoma i ekoloških i fizioloških kriterijuma [204]. Vrste koje su ranije označavane kao *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus rhamnosus*, a koje su korišćene u ovom radu, danas nose nazive *Lactiplantibacillus plantarum*, odnosno *Lacticaseibacillus rhamnosus* [204]. U daljem tekstu koriste se aktuelni nazivi rodova, dok se u navodima preuzetim iz starije literature zadržavaju originalne oznake.

Pored navedenih fizičko-hemijskih osobina, ključan aspekt prebiotskog dejstva oligosaharida ogleda se u njihovom uticaju na sastav crevne mikrobiote. Selektivnom fermentacijom od strane korisnih bakterijskih rodova, prebiotici doprinose uspostavljanju povoljne ravnoteže mikroorganizama u gastrointestinalnom traktu, što je jedan od osnovnih mehanizama njihovog pozitivnog dejstva na zdravlje domaćina. Mehanizam delovanja ksilooligosaharida i pektinskih oligosaharida, dve klase oligosaharida koje su predmet ovog istraživanja, na crevnu mikrobiotu prikazan je na slici 2.19.



Slika 2.19. Uticaj XOS i POS na sastav crevne mikrobiote. U odsustvu prebiotika prisutan je heterogen mikrobni profil sa povećanim udelom patogenih bakterija. Primenom XOS i POS selektivno se stimuliše rast korisnih bakterija roda *Bifidobacterium* i porodice *Lactobacillaceae*, uz istovremeno smanjenje broja patogenih bakterija [16].

#### 2.7.2.1 Ksilooligosaharidi (XOS)

Ksilooligosaharidi su šećeri koji se sastoje od 2-7 monomera ksiloze, povezane  $\beta$ -(1,4)- vezama, a najčešći način njihovog dobijanja je enzimska, hemo-enzimska ili hemijska hidroliza ksilana dobijenog iz različitih izvora [205]. Ksilan je glavni polisaharid koji čini hemicelulozu, koja se u velikoj količini nalazi u lignoceluloznom materijalu, i može se izolovati iz kukuruza, tvrdog drveta, slame, ljuski semenki i drugih biljaka bogatih lignocelulozom [202, 203]. Prednosti ovih oligosaharida u odnosu na već dokazane prebiotike koji se često primenjuju kao što su

fruktooligosaharidi i inulin je stabilnost ovih jedinjenja [206]. Ksilooligosaharidi su stabilni u širokom rasponu pH vrednosti 2,5-8, kao i na temperaturama do 100 °C, pa su otporniji na pasterizaciju i sterilizaciju čak i na niskim pH vrednostima [206].

Jedan od postupaka za dobijanje ksilooligosaharida iz drške suncokreta se sastoji iz dva osnovna koraka: autohidroliza i enzimska hidroliza. Autohidroliza predstavlja tretman lignocelulozne biomase pomešane sa vodom na visokoj temperaturi (140-220 °C) kako bi se izvršila depolimerizacija i deacetilovanje ksilana [207]. Postupak autohidrolize je interesantan pošto se molekuli hemiceluloze hidrolizuju pod dejstvom vodonikovih jona, pa nastaju rastvorni proizvodi (pre svega oligosaharidi) dok celuloza i lignin ostaju u čvrstoj fazi [202, 203]. Pošto u ovom postupku nastaju i monosaharidi koji mogu da inhibiraju enzimsku aktivnost, pre enzimskog tretmana se vrši membranska separacija, pa se dobijeni ksilani manje molekulske mase hidrolizuju pod dejstvom ksilanaza koje imaju visoku endo-ksilanaznu aktivnost, bez mogućnosti katalize povratne reakcije i nastaju ksilooligosaharidi [207]. Drugi postupak u literaturi je enzimski potpomognuto frakcionisanje suncokretove sačme, koje u nekoliko koraka uklanja fenole, proteine, pektin, lignin i celulozu iz materijala kako bi na kraju ostao samo ksilan kao proizvod frakcionisanja [12].

Ksilooligosaharidi nisu kancerogeni, stimulišu mikrobni rast i fermentaciju u gastrointestinalnom traktu i povoljno utiču na resorpciju minerala, imaju antioksidativno, antialergijsko, antimikrobno, imunomodulatorno i selektivno-citotoksično dejstvo, kao i pozitivne efekte na zdravlje kože [205]. Imaju i potencijal da utiču na kvalitet mnogih hranljivih proizvoda, tako što modifikuju ukus hrane i utiču na fizičko-hemijske karakteristike proizvoda [205]. Osim prednosti koje ksilooligosaharidi imaju zbog svoje termostabilnosti, imaju i određene prednosti koje se ogledaju u pozitivnim efektima na organizam. Postoje dokazi o pozitivnom dejstvu na aktivnost *Bifidobacterium* vrste, u većoj meri nego inulin (komercijalni prebiotik), da ispoljavaju svoje prebiotsko dejstvo u znatno manjoj dnevnoj dozi u odnosu na fruktooligosaharide i galaktooligosaharide, a pošto se primenjuje u manjoj dozi ne izaziva neželjene efekte kao što su nadimanje i iritacija želuca koji se mogu javiti tokom primene drugih oligosaharida [206]. Ksilooligosaharidi se trenutno smatraju jako interesantnim prebioticima, ali je ipak potrebno još istraživanja kako bi bili poznati svi eventualni pozitivni i negativni efekti primene u ishrani [208].

#### 2.7.2.2 Pektinski oligosaharidi (POS)

Struktura pektina je opisana u poglavlju koje se bavi ugljenim hidratima koji ulaze u sastav nusproizvoda industrije hrane. Imajući u vidu složenu strukturu pektina, može se i očekivati da proizvodi njegove hidrolize mogu biti raznovrsni oligosaharidi. Oni se mogu klasifikovati u nekoliko većih grupa: oligogalakuronidi (OgaA), GOS, arabinoooligosaharidi (AOS), ramnogalakuronoligosaharidi (RhaGalAOS), ksilooligogalakuronidi (XylOGalA) i arabinogalaktooligosaharidi (AraGalOS) [209].

Prebiotski efekat pektina se poboljšava njegovom parcijalnom hidrolizom, što ukazuje na to da pektinski oligosaharidi ispoljavaju selektivnost za mikroorganizam koji ih koristi, tako da u većoj meri utiču na povećanje populacije bakterija roda *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* i smanjenje populacije roda *Clostridium* nego nehidrolizovan pektin, s obzirom da se i pektin smatra prebiotikom [200, 201]. Pektinski oligosaharidi su relativno nova klasa prebiotika čije se prebiotske osobine još uvek ispituju. Ispoljavaju i druge pozitivne efekte osim što utiču na „dobre“ bakterije gastrointestinalnog trakta kao što su pozitivan efekat na kardiovaskularni sistem, smanjenje oštećenja koja nastaju dejstvom teških metala, smanjenje gojaznosti i antitoksično, antiinfektivno, antibakterijsko i antioksidativno dejstvo [210]. Na osnovu dosadašnjih istraživanja pektina i pektinskih oligosaharida se može zaključiti da osim osnovnog prebiotskog delovanja mogu se upotrebljavati u razne druge svrhe kao što su prevencija infekcije, prevencija ili tretman zapaljenskih procesa na koži, priprema kozmetičkih i dermatoloških proizvoda, priprema proizvoda za mršavljenje pošto imaju dejstvo na metabolizam lipida, a imaju i antioksidativno dejstvo [211, 212]. Nakon

upotrebe bilo kog postupka hidrolize i depolimerizacije pektina, dobijena jedinjenja se moraju izdvojiti i prečistiti kako bi se dobili čisti proizvodi definisane strukture. Najčešća metoda izdvajanja i prečišćavanja oligosaharida uopšte je membranska filtracija [210]. Za prečišćavanje i izolaciju nekih pektinskih oligosaharida se koristi ultrafiltracija sa diafiltracijom, metoda koja se može koristiti i za frakcionisanje oligosaharida različitih molekulskih masa [210].

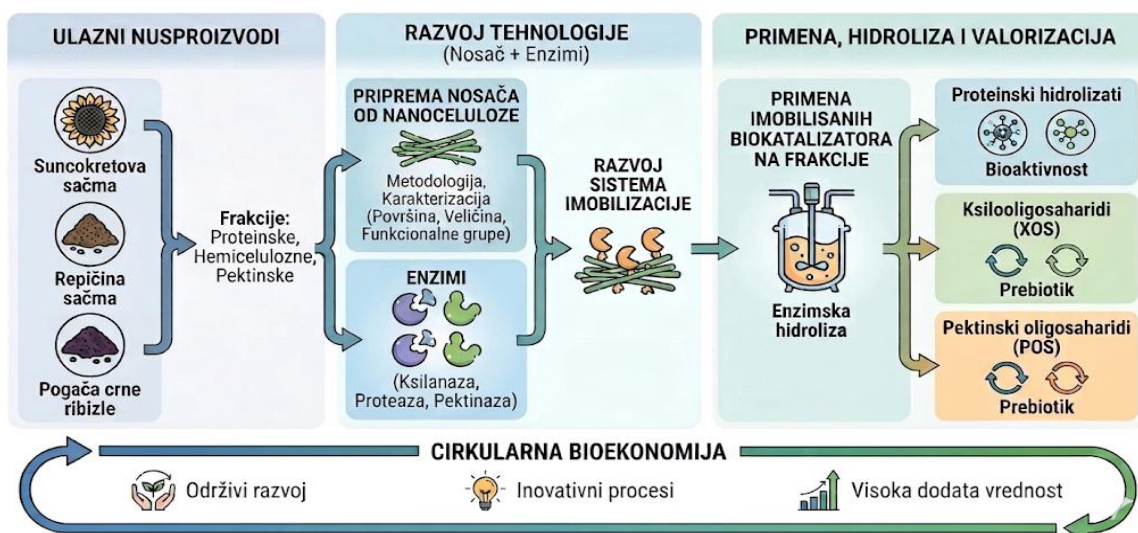
## 2.8 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Imajući u vidu rastuću potrebu za održivom valorizacijom nusproizvoda prehrambene industrije i prevazilaženje ograničenja primene slobodnih enzima, osnovni cilj ove doktorske disertacije je razvoj inovativnih, ekološki prihvatljivih i efikasnih sistema za imobilizaciju enzima na nosače od nanoceluloze, kao i njihova primena u procesu hidrolize različitih frakcija nusproizvoda prehrambene industrije. Poseban akcenat stavljen je na valorizaciju sirovina koje se često zanemaruju ili nedovoljno iskorišćavaju, sa ciljem dobijanja proizvoda visoke dodate vrednosti i unapređenja održivih biotehnoloških procesa.

U skladu sa glavnim ciljem, disertacija ima sledeće konkretne ciljeve:

- Priprema i karakterizacija nosača od nanoceluloze: Razviti metodologiju za dobijanje ekoloških i bioobnovljivih nosača na bazi nanoceluloze, koji su pogodni za efikasnu imobilizaciju različitih hidrolitičkih enzima. Detaljno ispitivanje fizičko-hemijskih svojstava ovih nosača, kao što su površinska struktura, veličina čestica, i funkcionalne grupe.
- Razvoj i optimizacija metoda imobilizacije enzima: Istraživanje i optimizacija različitih metoda imobilizacije hidrolitičkih enzima (ksilanaza, proteaza i pektinaza) na pripremljene nanocelulozne nosače. Poređenje efikasnosti različitih strategija imobilizacije (fizička adsorpcija, kovalentno vezivanje) u pogledu sposobnosti vezivanja i aktivnosti enzima.
- Primena imobilisanih enzima u hidrolizi nusproizvoda prehrambene industrije: Ispitivanje mogućnosti primene razvijenih imobilisanih biokatalizatora u procesima obrade i valorizacije proteinske, hemicelulozne i pektinske frakcije nusproizvoda prehrambene industrije, kao što su suncokretova sačma, repičina sačma i pogača crne ribizle. Analiza efikasnosti hidrolize, prinos ciljnih proizvoda i potencijal ponovne upotrebe imobilisanih enzima.
- Izolacija i karakterizacija proizvoda hidrolize: Dobijanje i karakterizacija proteinskih hidrolizata, ksilo-oligosaharida i pektinskih oligosaharida nastalih primenom imobilisanih enzima na nanoceluloznim nosačima. Ispitivanje prebiotskih svojstava dobijenih oligosaharida.

Šematski prikaz svih ciljeva istraživanja, koji obuhvata faze od ulaznih nusproizvoda, preko razvoja tehnologije imobilizacije, do primene imobilisanih biokatalizatora i dobijanja proizvoda visoke dodate vrednosti, dat je na slici 2.20.



Slika 2.20. Šematski prikaz ciljeva istraživanja doktorske disertacije [16].

Ostvarenje navedenih ciljeva doprineće unapređenju znanja u oblasti imobilizacije enzima, razvoju novih funkcionalnih materijala na bazi nanoceluloze i implementaciji održivih tehnologija za valorizaciju nusproizvoda prehrambene industrije. Na taj način, rezultati disertacije mogu imati značajan uticaj na razvoj inovativnih biotehnoških procesa i podsticanje održivog razvoja u agroindustrijskom sektoru.

### 3 EKSPERIMENTALNI DEO

#### 3.1 MATERIJALI I OPREMA

##### 3.1.1 Materijali

###### Lista korišćenih hemikalija:

- Mikrokristalna celuloza, 20  $\mu\text{m}$  (Sigma Chemical Co., St. Luis, SAD)
- Glacijalna sirćetna kiselina,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Hlorovodonična kiselina,  $\text{HCl}$  (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Natrijum-hidroksid,  $\text{NaOH}$  (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Voda HPLC čistoće (Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD)
- Natrijum-acetat trihidrat,  $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$  (Zdravlje, Leskovac, Srbija)
- Natrijum-dihidrogenfosfat (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Dinatrijum-hidrogenfosfat (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Triflorosirćetna kiselina (Sigma-Aldrich, Šneldorf, Nemačka)
- Natrijum-citrat (Sigma-Aldrich, Šneldorf, Nemačka)
- Limunska kiselina (Sigma-Aldrich, Šneldorf, Nemačka)
- Kalaj(II)-hlorid (Sigma-Aldrich, Šneldorf, Nemačka)
- PEG 6000 (Sigma-Aldrich, Šneldorf, Nemačka)
- Kalijum-natrijum-tartarat, (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- Natrijum-karbonat (Sigma Chemical Co., St. Luis, SAD)
- 3,5-Dinitrosalicilna kiselina (Sigma Chemical Co., St. Luis, SAD)
- Pektin iz jabuke (Sigma Chemical Co., St. Luis, SAD)
- Ksilan iz breze (Sigma-Aldrich, Šneldorf, Nemačka)
- Glukoza, anhidrovana (Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD)
- Hidroksilamin-hlorid (Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD)
- 3-aminopropiltrioksisilan (APTES) (Fluka Analytical, Stokbridž, SAD)
- Natrijum-perjodat (Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD)
- Natrijum-hlorid,  $\text{NaCl}$  (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Hranljivi bujon (Torlak, Beograd, Srbija)
- MRS bujon (Torlak, Beograd, Srbija)
- Kvašćev ekstrakt (Torlak, Beograd, Srbija)
- 1-pepton (Torlak, Beograd, Srbija)
- Tripton (Torlak, Beograd, Srbija)
- Mesni ekstrakt (Torlak, Beograd, Srbija)
- Tween-80 (Sigma Chemical Co., St. Luis, SAD)

- Sumporna kiselina, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98%) (Centrohem, Stara Pazova, Srbija)
- Glutaraldehyd, GA (25%) (Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD),
- Triton X-100 (Acros Organic, Gel, Belgija)
- Azokazein (Fulka analitical, SAD),
- Trihlorsirćetna kiselina (TCA) (Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD),
- Albumin iz goveđeg seruma (Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD),
- L-leucin-p-nitoanilid (Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD),
- Ninhidrin (Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD),
- Dimetilsulfoksid (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD),
- Arginin (Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD),
- Pierce™ Bradford Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD)
- Bolt™ Bis-Tris Plus Mini Protein Gels, 4-12%, 1.0 mm, WedgeWell™ format, gel za elektroforezu (Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD)
- NuPAGE™ MES SDS Running Buffer (20X), pufer za elektroforezu (Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD)
- Bolt™ LDS Sample Buffer (4X), pufer za pripremu uzoraka (Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD)
- Bolt™ Sample Reducing Agent (10X), sredstvo za redukciju disulfidnih veza (Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD)
- Bolt™ Antioxidant, antioksidans za katodni pufer (Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD)
- SimplyBlue™ SafeStain, boja za gel za elektroforezu (Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD)
- SeeBlue™ Pre-stained, proteinski standard (Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD)

#### Lista korišćenih enzima:

- Pectinex® Ultra SP-L (Novozymes, Bagsvard, Danska)
- Alcalase® Endopeptidaza iz *Bacillus licheniformis* (Novozymes, Bagsvard, Danska)
- Flavourzyme® (Novozymes, Bagsvard, Danska)
- Rohalase® SEP-Visco (AB Enzymes, Darmštat, Nemačka)

#### Lista korišćenih mikroorganizama:

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

#### Lista korišćenih nusproizvoda prehrambene industrije:

- Trop crne ribizle sorte Ben Nevis (Floriva, Ivanjica, Srbija)
- Suncokretova sačma (Victoriaoil, Šid, Srbija)
- Sačma uljane repice (Victoriaoil, Šid, Srbija)

### 3.1.2 Oprema

- Analitička vaga (AJ100 Mettler Toledo, Grajfenze, Švajcarska)
- Tehnička vaga (MP-3000 Chyo Balance Corp., Kjoto, Japan)
- pH metar (WTW inoLab pH 720, Šverte, Nemačka)
- Magnetna mešalica (IKA® C-MAG HS 7, Werke GmbH and Co., Štaufen, Nemačka)
- Orbitalna mešalica (IKA® KS 4000i control, Werke GmbH and Co., Štaufen, Nemačka)
- Termošejker (ThermoMixer® C, Eppendorf, Hamburg, Nemačka)
- Vodeno kupatilo (Memmert, Bihenbah, Nemačka)
- HPLC sistem (Dionex Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD)
- Reverzno fazna kolona (ZORBAX Eclipse Plus C18,  $4,6 \times 150$  mm, 5  $\mu$ m, Agilent Technologies, Santa Clara, SAD)
- Reverzno fazna kolona (BioBasic-8, dimenzija 150 mm  $\times$  4,6 mm, čestice 5  $\mu$ m, Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD)
- Liofilizator (Biobase, Frimont, SAD)
- Liofilizator (LIOSMART 8/5P, Kambič, Semič, Slovenija)
- Ultrazvučno kupatilo (Gamed, Beograd, Srbija)
- Roler šejker (Stuart SRT9, Pariz, Francuska)
- Roler šejker (uniROLLER, LLG, Nemačka)
- Centrifuga (MiniSpin, Hamburg, Nemačka)
- UV-Vis spektrofotometar (Ultrospec 3300 pro Amersham Biosciences, Frajburg, Nemačka)
- UV-Vis spektrofotometar (DS-11, De-Novix, Wilmington, SAD)
- Vorteks (Reax 7000 Reidolph, Švabah, Nemačka)
- FTIR-spektrofotometar (BOMEM, Hartmann & Braun, Nemačka)
- Autoklav (Sutjeska, Beograd, Srbija)
- Brojač kolonija (Funke Gerber, Berlin, Nemačka)
- Ručni refraktometar (Boeco, Hamburg, Nemačka)
- Vlagomer (MAR 50/1 mg Radwag, Radom, Poljska)
- UV-Vis spektrofotometar za mikrotitarske ploče (Multiskan SkyHigh, Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD)
- Zetasajzer (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd, Vorčestir, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Oprema za elektroforezu (PowerEase Touch 120W Power Supply i Mini gel tank, Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD)
- TEM mikroskop, (JEOL JEM-2100, Japan)

- SEM mikroskop (Verios 4G HP SEM, Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD)

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Dobijanje, modifikacija i karakterizacija nanoceluloze

#### 3.2.1.1 Dobijanje nanoceluloze

Nanokristali celuloze (CNC) dobijeni su hemijskom hidrolizom komercijalne mikrokristalne celuloze, čiji je prečnik bio oko 20  $\mu\text{m}$  [213]. Za hidrolizu je korišćen rastvor sumporne kiseline koncentracije 45 % (m/m), u odnosu 1:100 (0,5 g mikrokristalne celuloze na 50 mL kiseline). Izboru ove koncentracije prethodilo je preliminarno ispitivanje rastvora sumporne kiseline koncentracija 30, 45 i 60 % (m/m), pri čemu između ispitanih koncentracija nisu uočene značajne razlike u karakteristikama dobijenih nanokristala, pa je odabrana srednja vrednost. Reakcija je trajala 2 sata, pri temperaturnim uslovima od 40 °C, uz neprekidno mešanje na magnetnoj mešalici brzinom od 150 rpm. Po završetku hidrolize, tretirana suspenzija je neutralisana dvostrukim pranjem sa rastvorom natrijum-karbonata, sve do postizanja pH vrednosti približno 7,0. Nakon toga, suspenzija je centrifugirana pri 6000 obr/min tokom 20 minuta kako bi se izdvojio talog nanoceluloznih čestica. Dobijeni talog je potom sušen liofilizacijom, čime je dobijen fini prah nanokristalne celuloze.

#### 3.2.1.2 Oksidacija nanoceluloze sa natrijum-perjodatom

Pripremljen je rastvor od 300 mg CNC čestica suspendovanih u 30 mL rastvora natrijum-perjodata (2 mg/mL) u destilovanoj vodi [30]. Postupak oksidacije sprovodio se u mraku tokom 2 sata, radi prevencije razgradnje oksidacionog agensa izazvane svetlom. Nakon reakcije, nanoceluloza je višestruko ispirana – tri puta etanolom i tri puta destilovanom vodom. Zatim je materijal liofilizovan, pri čemu je nastao beli prah oksidovane nanoceluloze (Ox-CNC) obogaćene aldehidnim funkcionalnim grupama na površini.

#### 3.2.1.3 Silanizacija nanoceluloze za uvođenje amino grupa

Pripremljen je rastvor 5 % (v/v) aminopropiltrietoksisilana (APTES) u destilovanoj vodi, kojem je dodata glacijalna sirćetna kiselina da bi se postigao pH 4 [63]. U tom rastvoru suspendovan je CNC prah, uz mešanje na magnetnoj mešalici na sobnoj temperaturi u trajanju od 2 sata. Nakon reakcije, čestice su centrifugirane i isprane destilovanom vodom dva puta. Sledeći korak bio je termički tretman taloga na 100 °C u trajanju od 15 minuta, kojim se postiže reakcija kondenzacije APTES-a sa hidroksilnim (–OH) grupama na nanocelulozi, obezbeđujući kovalentno vezivanje aminopropil funkcionalnosti na nanoceluloznu površinu. Posle zagrevanja, talog je ispran centrifugiranjem tri puta apsolutnim etanolom i tri puta destilovanom vodom. Fini beli prah amino-funkcionalizovane nanoceluloze (amino-CNC) je zatim dobijen procesom liofilizacije.

#### 3.2.1.4 Karakterizacija

Za potvrdu uspešnosti modifikacije, uzorci su analizirani sledećim metodama:

- Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM): Uzorci su dispergovani u vodi u koncentraciji od 2 mg/mL. Po 20  $\mu\text{L}$  suspenzije naneto je na bakarne nosače (mrežice prekrivene ugljeničnom folijom), prethodno tretirane UV-ozonom (5 min). Mikrografije su snimane na JEOL JEM-2100 pri naponu od 200 kV.
- Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM): Praškasti uzorci su naneti na aluminijumske nosače i obloženi tankim slojem zlata (10 nm). Snimci su dobijeni korišćenjem Verios 4G HP SEM pri naponu od 2 kV.
- Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR): Snimanje FTIR spektara izvršeno je na instrumentu Bruker IFS66v (Bruker, Bremen, Nemačka), u opsegu talasnih brojeva od 4000  $\text{cm}^{-1}$  do 400  $\text{cm}^{-1}$ , sa rezolucijom od 4  $\text{cm}^{-1}$ , radi identifikacije novouvedenih funkcionalnih grupa.

- Dinamičko rasipanje svetlosti (DLS): Raspodela hidrodinamičkog prečnika čestica CNC, Ox-CNC i amino-CNC određena je na uređaju Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Vorčestir, Ujedinjeno Kraljevstvo). Uzorci su dispergovani u destilovanoj vodi u koncentraciji od 1 mg/mL (indeks refrakcije 1,330; viskoznost 0,8872 cP), a merenja su izvedena u jednokratnim kivetama za merenje veličine, na temperaturi od 25 °C, pri položaju merenja od 0,85 mm i trajanju pojedinačnog merenja od 60 s. Za svaki uzorak izvedena su tri uzastopna merenja. Kao karakteristike materijala korišćene su vrednosti indeksa refrakcije 1,59 i koeficijenta apsorpcije 0,010. Rezultati su prikazani kao raspodela intenziteta rasejane svetlosti, a srednja veličina čestica izražena je kao Z-average vrednost, uz odgovarajući indeks polidisperznosti (PdI).

### 3.2.1.5 Određivanje koncentracije aldehidnih grupa na nosaču Ox-CNC

Koncentracija aldehidnih funkcionalnih grupa prisutnih na površini oksidovane nanoceluloze određivana je hidroksilamin-titracionom metodom [214], zasnovanom na reakciji aldehida sa hidroksilamin-hloridom ( $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ ), pri čemu nastaju odgovarajući oksimi i oslobađa se ekvivalentna količina hlorovodonične kiseline ( $\text{HCl}$ ). Oslobođena kiselina se zatim kvantifikuje titracijom standardnim rastvorom natrijum-hidroksida ( $\text{NaOH}$ ).

Tačan postupak je sledeći: 5 mg oksidovane nanoceluloze stavlja se u epruvetu, kojoj se dodaje 3 mL 0,25 M rastvora hidroksilamin-hlorida u 0,1 M rastvoru hlorovodonične kiseline. Nakon mešanja, smeša se inkubira 2 do 4 časa uz povremeno mešanje. Zatim se dodaju 2 do 3 kapi indikatora bromfenol plavog (0,1 % u etanolu) i titriše 0,1 M rastvorom  $\text{NaOH}$  do promene boje. Koncentracija aldehidnih grupa (mmol/g) izračunava se prema jednačini 1:

$$\text{Koncentracija aldehidnih grupa} \left( \frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right) = \frac{V(\text{NaOH}, \text{uz}) - V(\text{NaOH}, \text{sp})}{m, \text{uz}} \times M(\text{NaOH}) \quad \text{Jednačina 1}$$

Gde je:

- $V(\text{NaOH}, \text{uz})$  – utrošak  $\text{NaOH}$  za uzorak
- $V(\text{NaOH}, \text{sp})$  – utrošak  $\text{NaOH}$  za slepu probu
- $M(\text{NaOH})$  – molarna koncentracija  $\text{NaOH}$
- $m, \text{uz}$  – masa uzorka

### 3.2.1.6 Analiza trodimenzionalne strukture enzima

Trodimenionalne strukture enzima preuzete su iz Proteinske banke podataka (RCSB PDB): endo- $\beta$ -(1-4)-D-ksilanaza iz *Thermopolyspora flexuosa* (PDB kod 1M4W) [215], endopoligalakturonaza iz *Aspergillus aculeatus* (PDB kod 1IA5) [216] i subtilizin Carlsberg iz *Bacillus licheniformis* (PDB kod 1SBC) [217]. Prikaz položaja aktivnog centra, raspodele elektrostatičkog potencijala i polarnih odnosno nepolarnih regija na površini molekula izrađen je u programu UCSF ChimeraX, verzija 1.11.1 [218]. Raspodela naelektrisanja prikazana je kvalitativno, na osnovu standardnih protonacionih stanja aminokiselinskih ostataka koja odgovaraju neutralnoj pH vrednosti, pa služi za poređenje relativnog rasporeda pozitivnih i negativnih regiona, a ne za kvantitativnu procenu naelektrisanja pri konkretnoj pH vrednosti. Teorijske vrednosti izoelektrične tačke izračunate su pomoću alata ProtParam.

## 3.2.2 Metode imobilizacije

### 3.2.2.1 Procedura za aktivaciju nosača glutaraldehidom:

Za aktivaciju amino grupa na amino nanocelulozi, nosač se tretira rastvorom glutaraldehida (GA) koncentracije 15 % (v/v) u 200 mM Na-fosfatnom puferu [219]. Na 5 mg amino nosača dodaje se 20

$\mu\text{L}$  rastvora GA, suspenzija se meša na roler šejkeru 15 sati na 25 °C, a zatim se čestice ispiraju. Ovako dobijeni nosač označen je kao GA-amino-CNC.

### 3.2.2.2 Imobilizacija enzima na nanocelulozu

Početna koncentracija proteina varirana je u opsegu 25–1000 mg proteina/g nosača, u zavisnosti od enzimskog preparata i tipa nosača, kako je prikazano u tabeli 3.1. Navedene vrednosti predstavljaju ciljane, nominalne koncentracije, dok su konkretne vrednosti navedene uz odgovarajuće rezultate.

*Tabela 3.1. Opsezi početnih koncentracija proteina primenjenih pri imobilizaciji enzimskih preparata na nanocelulozne nosače, izraženi u mg proteina/g nosača.*

| Enzimski preparat    | Adsorpcija (CNC, amino-CNC) | Kovalentna imobilizacija (Ox-CNC, GA-amino-CNC) |
|----------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------|
| Rohalase® SEP-Visco  | 200–1000                    | 200–800                                         |
| Pectinex® Ultra SP-L | 50–300                      | 75–300                                          |
| Alcalase®            | –                           | 25–200                                          |
| Flavourzyme®         | –                           | 25–200                                          |

Kovalentna imobilizacija: 10 mg Ox-CNC suspendovano je u 0,1 M Na-karbonatnom puferu pH 9,5, dodat je enzim (Rohalase® SEP-Visco, Pectinex® Ultra SP-L, Alcalase® ili Flavourzyme®), a reakcija je trajala tokom noći na sobnoj temperaturi uz blago mešanje.

10 mg GA-amino-CNC suspendovano je u 0,1 M Na-fosfatnom puferu pH 7,5, dodat je enzim (Rohalase® SEP-Visco, Pectinex® Ultra SP-L, Alcalase® ili Flavourzyme®), a reakcija je trajala tokom noći na sobnoj temperaturi uz blago mešanje.

Adsorpcija:

10 mg CNC odnosno amino-CNC suspendovano je u odgovarajućem puferu, dodat je enzim (Rohalase® SEP-Visco, Pectinex® Ultra SP-L, Alcalase® ili Flavourzyme®), a reakcija je trajala 1 h na sobnoj temperaturi. Pri imobilizaciji adsorpcijom varirana je pH vrednost u opsegu 4–7, pri čemu je za pH 4 i 5 korišćen 0,1 M Na-acetatni pufer, a za pH 6 i 7 0,1 M Na-fosfatni pufer.

### 3.2.3 Određivanje proteina

#### 3.2.3.1 Metoda po Bredfordu

Bredfordov reagens korišćen je prema uputstvu proizvođača. 20  $\mu\text{L}$  rastvora uzorka pomešano je sa 1 mL Bredfordovog reagensa, a nakon 5 min merena je apsorbanca na 595 nm [220]. Koncentracija proteina određivana je na osnovu standardne prave konstruisane sa rastvorima albumina iz goveđeg seruma (BSA) u opsegu koncentracija 0,1–1,0 mg/mL.

Navedene početne koncentracije proteina predstavljaju ciljane, nominalne vrednosti; stvarno unete koncentracije neznatno su odstupale od njih, a svi prinosi imobilizacije računati su na osnovu izmerenih vrednosti. Koncentracija imobilisanih proteina na nanočestice (mg/g nosača) i prinos imobilizacije proteina (%) računati su prema jednačinama 2 i 3:

$$\text{Koncentracija imobilisanih proteina } \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \text{ nosača}\right) = \frac{\text{koncentracija unetih proteina} - \text{koncentracija proteina u supernatantu nakon imobilizacije}}{\text{masa nosača}} \quad \text{Jednačina 2}$$

$$\text{Prinos imobilizacije proteina } (\%) = \frac{\text{koncentracija imobilisanih proteina}}{\text{koncentracija unetih proteina}} \times 100 \quad \text{Jednačina 3}$$

Koncentracija imobilisane aktivnosti (IU/g nosača) i prinos imobilizacije aktivnosti (%) računati su prema jednačinama 4 i 5, pri čemu je prinos izražen u odnosu na aktivnost unetu u reakciju imobilizacije:

$$\text{Koncentracija imobilisane aktivnosti } \left(\frac{\text{IU}}{\text{g}} \text{ nosača}\right) = \frac{\text{izmerena aktivnost imobilisanog preparata}}{\text{masa nosača}} \quad \text{Jednačina 4}$$

$$\text{Prinos imobilizacije aktivnosti } (\%) = \frac{\text{koncentracija imobilisane aktivnosti}}{\text{koncentracija unete aktivnosti}} \times 100 \quad \text{Jednačina 5}$$

Specifična aktivnost imobilisanog preparata (IU/mg proteina) računata je kao odnos koncentracije imobilisane aktivnosti i koncentracije imobilisanih proteina.

### 3.2.4 Određivanje enzimске aktivnosti

#### 3.2.4.1 Određivanje aktivnosti ksilanaze i pektinaze

Ukupni redukujući šećeri u reakcionoj smeši određivani su metodom sa 3,5-dinitrosalicilnom kiselinom (DNS) [221]. Koncentracija oslobođenih redukujućih šećera računata je na osnovu izmerene apsorbance i nagiba prethodno konstruisane standardne prave za glukozu, pri čemu je ksilanazna, odnosno pektinolitička aktivnost izražena kao ekvivalent glukoze. Aktivnost slobodnog enzima izračunavana je na osnovu brzine promene apsorbance ( $dA/dt$ ) prema jednačini 6, dok je za preparat imobilisan na nosač primenjivana jednačina 7. Aktivnosti oba oblika enzima procenjivane su merenjem proizvodnje redukujućih šećera iz odgovarajućeg supstrata. Za određivanje ksilanazne aktivnosti korišćen je rastvor 0,5 % (m/v) komercijalnog ksilana iz bukve u 100 mM Na-fosfatnom puferu pH 6,0, a za određivanje pektinolitičke aktivnosti rastvor 0,5 % (m/v) pektina iz jabuke u 0,1 M Na-acetatnom puferu pH 4,5.

Rastvori supstrata pripremani su uz zagrevanje na 50 °C na magnetnoj mešalici do potpunog rastvaranja. Uzorak slobodnog ili imobilisanog enzima mešan je sa 2 mL rastvora supstrata i inkubiran na 50 °C. Radi određivanja brzine promene apsorbance ( $dA/dt$ ), u intervalima od 1, 3, 5, 7 i 9 min uzimani su alikvoti od 0,25 mL, kojima je odmah dodavana ista zapremina DNS reagensa (0,25 mL). Smeša je zatim inkubirana u ključalom vodenom kupatilu 5 min radi razvijanja boje, ohlađena do sobne temperature, a potom joj je dodato 2 mL destilovane vode. Apsorbanca je merena na talasnoj dužini od 540 nm pomoću UV-Vis spektrofotometra.

$$\text{Aktivnost slobodne ksilanaze } \left(\frac{\text{IU}}{\text{mL}}\right) = DF * \frac{dA/dt * V_r}{k * V_e} \quad \text{Jednačina 6}$$

Gde je  $dA/dt$  promena apsorbance u vremenu ( $\text{min}^{-1}$ ),  $k$  je nagib standardne prave redukujućih šećera konstruisane DNS metodom pod istim uslovima ( $k = 0,11 \text{ mM}^{-1}$ ),  $V_r$  je zapremina reakcione smeše (2 mL),  $V_e$  zapremina dodatog rastvora enzima (mL), a  $DF$  faktor razblaženja.

$$\text{Aktivnost imobilisane ksilanaze } \left(\frac{\text{IU}}{\text{g}} \text{ nosača}\right) = DF * \frac{dA/dt * V_r}{k * m_e} \quad \text{Jednačina 7}$$

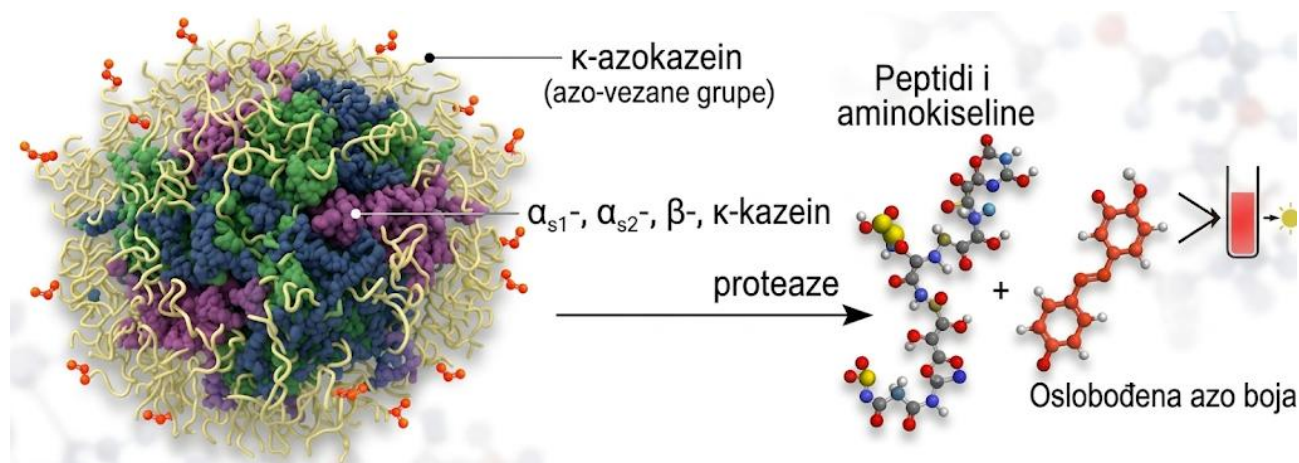
Gde je  $m_e$  – masa imobilisanog enzima (g). Jedna internacionalna jedinica (IU) definisana je kao količina enzima koja oslobađa 1  $\mu\text{mol}$  redukujućeg šećera u minuti pri navedenim uslovima reakcije.

Na ovaj način moguće je kvantitativno pratiti i uporediti aktivnost slobodnog i imobilisanog enzima kroz praćenje proizvodnje redukujućih šećera iz supstrata.

#### 3.2.4.2 Određivanje hidrolitičke aktivnosti proteaza u reakciji hidrolize azokazeina

Za određivanje hidrolitičke aktivnosti komercijalnih preparata proteaza (Flavourzyme® i Alcalase®) korišćena je metoda po kojoj se kao supstrat koristi azokazein [222, 223]. Kazein je fosfopoli-peptidni lanac koji se iz mleka izdvaja taloženjem kiselinama, isoljavanjem ili ultracentrifugiranjem [224, 225]. Azokazein je kazein hemijski modifikovan sulfanilnom kiselinom. Hidrolizom ovakvog kazeina, dolazi do otpuštanja azo boje u reakcionu smešu što se detektuje praćenjem apsorbance na 440 nm u alkalnoj sredini (slika 3.1.).

Aktivnost preparata Flavourzyme® i Alcalase® određivana je metodom hidrolize azokazeina, čime se prati oslobađanje azo-boje nakon razgradnje supstrata. U reakciji se 150  $\mu$ L uzorka ili 2 mg imobilisanih čestica meša sa 300  $\mu$ L 2 % (m/v) rastvora azokazeina u 50 mM Tris-HCl puferu pH 9 i inkubira 30 minuta na 30 °C. Reakcija se prekida dodavanjem 1,2 mL 10 % (m/v) TCA, a potom se uzorci hlade u ledenom kupatilu i centrifugiraju.



Slika 3.1. Hidroliza azo-kazeina proteazama.

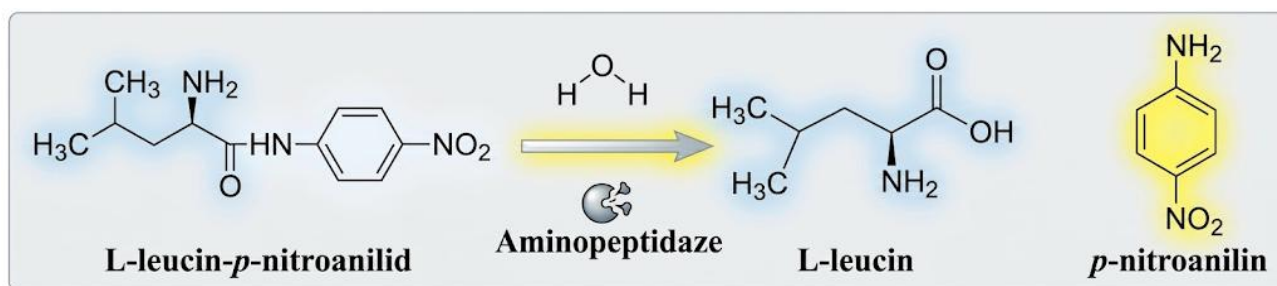
Zatim se 600  $\mu$ L supernatanta pomeša sa 700  $\mu$ L 1 M NaOH i meri se apsorbance na 440 nm u odnosu na slepu probu.

Za slepu probu se umesto uzorka enzima dodaje ista zapremina destilovane vode (150  $\mu$ L) u rastvor azokazeina. Ovako pripremljena smeša se ne inkubira, već joj se odmah dodaje 10 % TCA i stavlja se na hlađenje. Pošto slepa proba ne sadrži enzimski preparat, doprinos sopstvene apsorbance preparata na 440 nm nije uključen u izmerenu vrednost. Nakon toga se centrifugira i pomeša sa 1 M NaOH na isti način kao što je opisano za uzorak.

Jedinica proteolitičke aktivnosti definisana je kao količina enzima potrebna za promenu apsorbance od 1, na 440 nm u kiveti dužine 1 cm pri gore opisanim uslovima.

#### 3.2.4.3 Određivanje hidrolitičke aktivnosti proteaza u reakciji hidrolize L-leucin-p-nitroanilida

Za određivanje hidrolitičke aktivnosti komercijalnih preparata proteaza Flavourzyme® korišćena je i metoda po kojoj se kao supstrat koristi L-leucin-p-nitroanilid (L-pNA) [226, 227]. Hidrolizom L-pNA egzo-peptidazama oslobađa se p-nitroanilin, čije se nastajanje prati spektrofotometrijski (slika 3.2.).



Slika 3.2. Hidroliza L-leucin-*p*-nitroanilida egzo-proteazama.

Supstrat se priprema razblaživanjem 50 mM rastvora L-*p*NA u metanolu na 24 mM rastvor u 50 mM Tris-HCl puferu pH 8. Reakcija se izvodi inkubiranjem 2,95 mL supstrata sa 0,05 mL enzima ili 2 mg imobilisanog preparata na 30 °C tokom 5 min. Nakon inkubacije meri se apsorbanca oslobođenog *p*-nitroanilina na 405 nm. Aktivnost se izražava u jedinicama koje odgovaraju hidrolizi 1 μmol supstrata u minuti.

Slepa proba se pravi na isti način kao reakciona smeša s tim da se umesto enzima dodaje 0,05 mL pufera.

Jedinica proteolitičke aktivnosti je definisana kao količina enzima potrebna da hidrolizuje 1 μmol L-*p*NA do L-leucina i *p*-nitroanilina po minuti na pH 8 i temperaturi od 30 °C.

Proteolitička aktivnost slobodnog enzima ili supernatanta u reakciji L-*p*NA se preračunava prema jednačini 8:

$$\text{Aktivnost} \left( \frac{\text{IU}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Apsorbanca (405 nm)} \cdot 3}{9,9 \cdot 5 \cdot 0,05} \quad \text{Jednačina 8}$$

gde je A apsorbanca oslobođenog *p*-nitroanilina na 405 nm, 3 – ukupna zapremina reakcione smeše (mL), 9,9 – molarna apsorptivnost *p*-nitroanilina (mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>), 5 – vreme trajanja reakcije (min), a 0,05 – zapremina dodatog rastvora enzima (mL).

Proteolitička aktivnost imobilisanog enzima (IU/g nosača) u reakciji hidrolize L-*p*NA preračunava se prema istoj jednačini, s tim da se umesto zapremine dodatog rastvora enzima koristi masa imobilisanog preparata (2 mg).

#### 3.2.4.4 Desorpcija enzima sa nosača

Desorpcija molekula enzima sa nosača u različitim vremenskim intervalima reakcije imobilizacije izvedena je mešanjem imobilisanog enzima sa 1 M rastvorom CaCl<sub>2</sub> u toku 30 minuta pa zatim i 1% (v/v) Triton X-100 tokom u toku 30 minuta. Glavni cilj ove procedure bio je uklanjanje adsorbovanih molekula enzima (koji su vezani za nosač putem elektrostatičkih i hidrofobnih interakcija) i procena udela aktivnosti koji potiče od kovalentno vezanih molekula enzima. Nakon tretmana desorpcije, čestice su centrifugirane i isprane dva puta odgovarajućim puferom za imobilizaciju, a potom je određivana aktivnost imobilisanog enzima.

### 3.2.5 Frakcionisanje nusproizvoda prehrambene industrije

#### 3.2.5.1 Dobijanje ksilana iz suncokretove sačme

U prvom koraku, suncokretova sačma se podvrgava trostrukoj ekstrakciji pomoću 70% etanola, u odnosu 1:10 (m/v). Nakon toga sledi filtracija i ispiranje 96% etanolom i acetonom. Objedinjeni etanolni ekstrakti se zatim koncentrišu na vakuum uparivaču radi izolacije polifenola.

Preostala čvrsta faza suspenduje se u 100 mM Na-fosfatnom puferu (pH 7,5) u odnosu 1:20 (m/v), a zatim se tretira enzimom Alcalase® 2.4 L (0,125 % (v/m)) na temperaturi od 50 °C. Ovaj proces se

odvija uz neprekidno mešanje i traje 2 sata. Po završetku reakcije, čvrsti ostatak se odvaja vakuum filtracijom i ispira destilovanom vodom, etanolom i acetonom. Sa druge strane, proteinski filtrat se zagreva na 90 °C kako bi se inaktivirao enzim, nakon čega se koncentriše i liofilizuje.

Prethodno izdvojeni čvrsti ostatak se zatim ekstrahuje razblaženom hlorovodoničnom kiselinom (pH 1,5) na 90 °C u trajanju od 1,5 sata, pri odnosu čvrste i tečne faze 1:25 (m/v). Nakon filtracije i ispiranja toplom vodom, pektin se taloži dodavanjem četvorostruke zapremine hladnog 96% etanola i ostavlja preko noći. Zatim se odvaja centrifugiranjem i suši.

Naredni korak je delignifikacija, koja se izvodi pomoću rastvora natrijum-hlorita (1,87% (m/v)) i sirćetne kiseline (1,87% v/v) u odnosu 1:32 (m/v), uz zagrevanje na 70 °C tokom 2 sata. Čvrsti ostatak se nakon toga filtrira i ispira vodom i etanolom, dok se lignin liofilizuje direktno iz filtrata.

Delignifikovani materijal se potom tretira 2 M rastvorom natrijum-hidroksida (1:20 m/v) na sobnoj temperaturi, uz neprekidno mešanje u trajanju od 4 sata. Dobijeni ekstrakt se filtrira, a njegova pH vrednost se podešava na 6 pomoću koncentrovane sirćetne kiseline. Ksilan se zatim taloži dodavanjem četiri zapremine hladnog 96% etanola, ostavlja preko noći, a potom odvaja centrifugiranjem i liofilizuje.

Konačni čvrsti ostatak, koji je bogat celulozom, ispira se vodom, etanolom i acetonom radi dodatnog prečišćavanja. Ovim korakom se uspešno završava proces frakcionisanja suncokretove sačme na šest celina: polifenolnu, proteinsku, pektinsku, ligninsku, ksilansku i celuloznu frakciju. Za dalje eksperimente uzima se ovako dobijena ksilanska frakcija.

### *3.2.5.2 Dobijanje pektina iz sačme uljane repice*

Proces frakcionisanja uljane repice počinje trostrukom ekstrakcijom pomoću 70% vodenog rastvora etanola, u odnosu 1:10 (m/v). Nakon ekstrakcije, materijal se filtrira i sukcesivno ispira 96% etanolom i acetonom. Dobijena čvrsta frakcija se suspenduje u 100 mM Na-fosfatnom puferu (pH 7,5) u odnosu 1:20 (m/v) i tretira enzimom Alcalase® 2.4 L (0,125 % (v/m)) na temperaturi od 50 °C, uz neprekidno mešanje tokom dva sata.

Nakon završene enzimске hidrolize, čvrsti ostatak se odvaja vakuum filtracijom i ispira destilovanom vodom, etanolom i acetonom.

Izolacija kiselo-rastvorljivog pektina (LK-pektin) vrši se iz dobijenog čvrstog ostatka dodavanjem 240 mL 20% (m/v) limunske kiseline (pH 1,5). Smeša se inkubira na 58 °C tokom jednog sata uz mešanje (250 rpm). Talog se potom izdvaja centrifugiranjem na 6000 rpm u trajanju od 10 minuta. Dobijeni supernatant se meša sa 480 mL 96% (v/v) etanola (uz dodatak 0,2% v/v hlorovodonične kiseline) i ostavlja preko noći na 4 °C radi taloženja. Istaložena frakcija pektina se odvaja centrifugiranjem, ispira rastvorom 0,04% (v/v) HCl u 96% etanolu, zatim čistim 96% etanolom i na kraju liofilizuje.

Preostali talog koristi se za izolaciju pektina vezanog za kalcijum (Ca-pektin). Postupak podrazumeva dodavanje 0,76% (m/v) rastvora amonijum-oksalata u odnosu 1:15 (m/v) i inkubaciju na 85 °C u trajanju od 1,5 sata uz mešanje (250 rpm). Nakon centrifugiranja, dobijeni supernatant se tretira na identičan način kao i u slučaju LK-pektina radi finalne izolacije frakcije.

### *3.2.5.3 Dobijanje pektina iz pogače crne ribizle*

Prvi korak je ekstrakcija polifenolnih jedinjenja iz crne ribizle i ona se započinje suspendovanjem 60 g uzorka u 0,1 M Na-acetatnom puferu (pH 4,5), pri odnosu mase i zapremine 1:10 (m/v). Suspenzija se inkubira na 50 °C tokom jednog sata, uz neprekidno mešanje brzinom od 250 rpm. Nakon centrifugiranja na 6000 rpm u trajanju od 10 minuta, supernatant se uklanja, a preostali talog se podvrgava tretmanu 70% (v/v) etanolom. Ovaj korak se ponavlja u ukupno tri ciklusa, uz zadržavanje istih uslova temperature, brzine mešanja i odnosa mase i zapremine.

Dobijeni talog se dalje koristi za izolaciju frakcije pektina. Za izolaciju pektina vezanog za kalcijum, čvrsti ostatak preostao nakon kiselinske ekstrakcije tretira se 0,76% (m/v) rastvorom amonijum-oksalata u odnosu 1:15 (m/v). Inkubacija se odvija na 85 °C u trajanju od 1,5 sata, uz mešanje brzinom od 250 rpm. Po završetku inkubacije, smeša se centrifugira, a dobijeni supernatant se podvrgava istom postupku taloženja i ispiranja kao kod kiselo-rastvorljivog pektina, čime se konačno dobija prečišćena frakcija Ca-pektina.

U daljim eksperimentima koristi se Ca-pektin dobijen po opisanom postupku.

#### 3.2.5.4 Dobijanje proteinske frakcije suncokretove sačme

Proteinska frakcija iz suncokretove sačme (PFSS) dobija se kombinovanom primenom metoda sedimentacije (flotacije) i izoelektričnog taloženja [228].

Suncokretova sačma se suspenduje u destilovanoj vodi u odnosu 1:10 (m/v), pri čemu dolazi do razdvajanja tri frakcije: lignocelulozna frakcija isplivava na površinu kao najlakša komponenta i mehanički se odvaja, dok se tečna frakcija i talog razdvajaju dekantovanjem. Dobijeni talog predstavlja frakciju bogatu proteinima. Radi prevođenja proteina u rastvoran oblik, talog se suspenduje u destilovanoj vodi i tretira koncentrovanim rastvorom natrijum-hidroksida (30 %) do uspostavljanja pH vrednosti 10,5, pri kojoj su proteini u potpunosti rastvoreni. Tečna faza se od nerastvorenog ostatka odvaja dekantovanjem.

Proteini se iz rastvora izdvajaju kiselom precipitacijom, podešavanjem pH vrednosti na izoelektričnu tačku proteina suncokretove sačme (pH 4,3) dodavanjem 6 M hlorovodonične kiseline. Promena pH vrednosti izaziva koagulaciju, odnosno taloženje proteina.

Istaloženi proteini se odvajaju centrifugiranjem i temeljno ispiraju destilovanom vodom radi uklanjanja zaostalih soli i drugih rastvorljivih primesa. Dobijeni proteinski izolat se potom neutrališe 0,1 M Na-fosfatnim puferom pH 7,5, u zapreminskom odnosu 1:1, do postizanja pH vrednosti 7, a zatim liofilizuje (suši pod vakuumom u smrznutom stanju), čime se dobija konačni suvi proizvod proteinska frakcija suncokretove sačme koji se koristi u daljim eksperimentima.

Sadržaj suve materije dobijene PFSS bio je 95%, a sadržaj sirovih proteina 80,8%. Za poređenje, suncokretova sačma sadrži 38,2% sirovih proteina.

### 3.2.6 Primena imobilisanih i slobodnih enzima u reakcijama hidrolize frakcija nusproizvoda prehrambene industrije

#### 3.2.6.1 Hidroliza ksilana pomoću enzima Rohalase® SEP-Visco

Sinteza ksiloooligosaharida izvedena je u 20 mL reakcione smeše koja je sadržala 1% (m/v) rastvor ksilana u 100 mM Na-fosfatnom puferu (pH 6,0). Reakcija se odvijala na temperaturi od 60 °C, a njen tok je praćen tokom 24 sata.

Paralelno sa upotrebom slobodnog enzima (Rohalase® SEP-Visco), za proizvodnju XOS korišćena je i ksilanaza imobilisana na različitim nosačima (Ox-CNC, GA-amino-CNC). Reakcije sa imobilisanim enzimima izvođene su pod identičnim uslovima hidrolize (1% ksilana, 60 °C).

Kako bi se obezbedilo direktno poređenje slobodnog i imobilisanog sistema, doza svakog biokatalizatora je precizno podešena tako da se u reakciju unese ista početna hidrolitička aktivnost od 12 IU. U praksi, to je podrazumevalo dodavanje 10 µL slobodnog enzima (prethodno desetostruko razblaženog), odnosno 6 mg Ox-CNC-ksilanaze ili 5 mg GA-amino-CNC ksilanaze.

Pre same hidrolize, svi imobilisani preparati su pripremljeni prema ranije opisanoj proceduri u odgovarajućim puferima: 0,1 M Na-karbonatnom puferu (pH 9,5) za Ox-CNC, odnosno 0,1 M Na-fosfatnom puferu (pH 7,5) za GA-amino-CNC, koristeći optimalne uslove početne koncentracije enzima i vremena imobilizacije.

Praćenje toka reakcije vršeno je uzimanjem uzoraka u unapred definisanim vremenskim intervalima. Prikupljeni uzorci su odmah tretirani na 100 °C u trajanju od 5 minuta, čime je enzim termički inaktiviran, a reakcija uspešno zaustavljena. Nakon inaktivacije, uzorci su derivatizovani, filtrirani i analizirani tečnom hromatografijom visokih performansi (HPLC) u cilju kvantifikacije nastalih ksilooligosaharida.

### 3.2.6.2 Hidroliza pektina pomoću enzima Pectinex® Ultra SP-L

Za proces hidrolize pektina izolovanog iz uljane repice i crne ribizle, pripremljeni su rastvori pektina koncentracije 0,5% (m/v) u 0,1 M Na-acetatnom puferu (pH 4,5). Radi potpunog rastvaranja, rastvori su zagrevani na 50 °C uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici.

Sama reakcija hidrolize izvođena je korišćenjem po 2 mL pripremljenih rastvora pektina. Kako bi se obezbedilo objektivno i direktno poređenje slobodnog i imobilisanih sistema, doza svakog preparata je precizno podešena tako da se u reakciju unese ekvivalentna početna hidrolitička aktivnost od 0,5 IU. U praksi, to je podrazumevalo dodavanje 5 µL slobodnog enzima, odnosno 50 mg Ox-CNC-pektinaze ili 40 mg GA-amino-CNC-pektinaze.

Pre same hidrolize, svi imobilisani preparati su pripremljeni prema ranije opisanoj proceduri u odgovarajućim puferima: 0,1 M Na-karbonatnom puferu (pH 9,5) za Ox-CNC, odnosno 0,1 M Na-fosfatnom puferu (pH 7,5) za GA-amino-CNC, koristeći optimalne uslove početne koncentracije enzima i vremena imobilizacije.

Praćenje toka reakcije vršeno je uzimanjem uzoraka zapremine 0,25 mL u unapred definisanim vremenskim intervalima. Prikupljeni uzorci su odmah termički tretirani na 100 °C u trajanju od 5 minuta, čime je enzim inaktiviran, a reakcija uspešno zaustavljena.

Nakon toplotnog tretmana, koncentracija oslobođenih redukujućih šećera u uzorcima određivana je primenom standardne DNS metode.

### 3.2.6.3 Hidroliza proteinske frakcije suncokretove sačme pomoću enzima Alcalase® i Flavourzyme®

U procesu hidrolize, enzimi Alcalase® i Flavourzyme®, imobilisani na nosačima GA-amino-CNC i Ox-CNC, primenjeni su sekvencijalno.

Reakciona smeša za hidrolizu SMPI sastojala se od 2,5 % (m/v) rastvora PFSS u 0,01 M Na-fosfatnom puferu (pH 7,0). U sistem su dodavani imobilisani preparati u sledećim količinama: 10 mg GA-amino-CNC-Alcalase® ili 12 mg Ox-CNC-Alcalase®, odnosno 15 mg GA-amino-CNC-Flavourzyme® ili 10 mg Ox-CNC-Flavourzyme®, pripremljeni po optimalnim uslovima.

Kontrolni eksperimenti izvođeni su upotrebom slobodnih enzima, pri čemu je dodavano 1 µL preparata Alcalase® i 2,5 µL preparata Flavourzyme®. Ovakva postavka je osigurala da uneta enzimaska aktivnost (1,51IU za preparat Alcalase® i 0,067 L-pNAU za Flavourzyme®) bude identična u kontrolnim i eksperimentalnim uzorcima, čime je omogućena objektivna procena uticaja imobilizacije na afinitet enzima prema supstratu.

Sve reakcije hidrolize odvijale su se na 50 °C u ukupnom trajanju od 24 sata. Sekvencijalna hidroliza se sastojala iz dve faze: prva faza je obuhvatala dvočasovnu hidrolizu primenom slobodnog ili imobilisanog enzima preparata Alcalase®, nakon čega je usledila druga faza u trajanju od 22 sata, inicirana dodavanjem slobodnog ili imobilisanog preparata Flavourzyme®.

Praćenje toka reakcije vršeno je uzimanjem alikvota u definisanim vremenskim intervalima (nakon 1, 2, 3, 4 i 24 sata). Reakcija je zaustavljana termičkom inaktivacijom uzoraka na 90 °C u trajanju od 10 minuta. Nakon toga, sadržaj oslobođenih amino grupa u hidrolizatu određen je ninhidrinskom metodom (poglavlje 3.2.7.3). Step en hidrolize (%), koji definiše procenat raskinutih peptidnih veza, izračunat je prema jednačini 9 [229].

$$DH = \frac{h}{h_{tot}} \times 100$$

Jednačina 9

Gde je  $h$  broj raskinutih peptidnih veza, a  $h_{tot}$  ukupan broj peptidnih veza koji za suncokretovu sačmu iznosi 7,5 mmol/g [229].

#### 3.2.6.4 Ciklusi primene imobilisanog enzima

U reakcionim sudovima su dodati supstrati (ksilan, pektin ili proteini) i odgovarajući imobilisani enzimi. Reakcioni sistem je zatim inkubiran u termošejkeru na 50 °C tokom unapred definisanog vremenskog perioda.

Nakon završetka svakog reakcionog ciklusa, imobilisani enzimi su odvajani od reakcione smeše centrifugiranjem, a zatim ponovo korišćeni u narednom ciklusu uz dodavanje sveže pripremljenog supstrata.

Preostala enzimska aktivnost (%) nakon svakog ciklusa izračunata je u odnosu na aktivnost izmerenu u prvom ciklusu, koja je definisana kao referentna vrednost od 100%.

### 3.2.7 Analitičke metode

#### 3.2.7.1 HPLC analiza ksilooligosaharida

Prvi korak u analizi podrazumevao je derivatizaciju uzoraka [230]. U mikroeprevetu je odmereno 250 µL uzorka, 250 µL rastvora natrijum-hidroksida (0,3 M NaOH) i 250 µL rastvora PMP-a (1-fenil-3-metil-5-pirazolon). Smeša je homogenizovana na vorteksu u trajanju od oko 30 sekundi, a potom inkubirana u termošejkeru na 70 °C tokom 90 minuta. Po završetku inkubacije, uzorak je ohlađen na sobnu temperaturu i neutralisan dodavanjem 250 µL hlorovodonične kiseline (0,3 M HCl). Radi prečišćavanja ekstrakta, u neutralisanu smešu je dodat 1 mL hloroforma. Uzorak je ponovo vorteksiran i centrifugiran na 10.000 rpm u trajanju od 2 minuta. Iz izdvojene gornje (vodene) faze pažljivo je preneto 600 µL u novu mikroeprevetu, gde je pomešano sa dodatnih 1,2 mL hloroforma. Ova smeša je kratko vorteksirana i ponovo centrifugirana pod istim uslovima (10.000 rpm, 2 minuta). Za dalju analizu izdvojeno je 400 µL prečišćene gornje faze.

Nakon derivatizacije, uzorci su filtrirani i analizirani na HPLC sistemu (*Dionex Ultimate 3000*) opremljenom kolonom za reverzno-faznu hromatografiju (*ZORBAX Eclipse Plus C18*, 4,6 × 150 mm, 5 µm), pri temperaturi kolone od 30 °C.

Kao mobilna faza korišćena je smeša 100 mM amonijum-acetatnog pufera (pH 5,5) i acetonitrila u zapreminskom odnosu 80:20 (v/v), uz konstantan protok od 0,5 mL/min. Detekcija analiziranih produkata i standarda vršena je pomoću UV detektora na talasnoj dužini od 245 nm.

Prikupljanje i obrada hromatografskih podataka vršeni su pomoću softvera *Chromeleon 7.2*. Kvantifikacija dobijenih jedinjenja proračunata je na osnovu kalibracionih krivi dobijenih analizom PMP-derivatizovanih standarda ksilooligosaharida (XOS2–XOS6).

#### 3.2.7.2 DNS analiza hidrolizata pektina

Tok hidrolize pektina praćen je primenom prethodno pomenute DNS metode. Postupak je podrazumevao uzimanje alikvota reakcione smeše zapremine 0,25 mL u definisanim vremenskim intervalima, tokom prvih 30 minuta reakcije.

Svakom uzetom alikvotu dodata je identična zapremina DNS reagensa (0,25 mL). Smeša je zatim inkubirana u ključalom vodenom kupatilu u trajanju od 5 minuta, nakon čega je u uzorke dodato po 2 mL destilovane vode.

Apsorbanca ovako pripremljenih uzoraka merena je spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 540 nm. Na osnovu izmerenih vrednosti apsorbance i jednačine (nagiba) prethodno konstruisane

kalibracione krive, određena je koncentracija oslobođenih redukujućih šećera (izražena kao ekvivalent glukoze).

### 3.2.7.3 Određivanje stepena hidrolize ninhidrinskom metodom

Za pripremu ninhidrinskog reagensa, prvo je rastvoreno 80 mg kalaj(II)-hlorida dihidrata ( $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) u 50 mL citratnog pufera (0,2 M; pH 5,0), dok je 0,5 g ninhidrina rastvoreno u 10 mL dimetilsulfoksida [231, 232]. Neposredno pre upotrebe, jednake zapremine ova dva rastvora se pomešaju. Rastvor polietilen-glikola (PEG) pripremljen je rastvaranjem 1,2 mL PEG 6000 u 10 mL destilovane vode.

U mikroeprevetu odmeri se 100  $\mu\text{L}$  desetostruko razblaženog uzorka reakcione smeše i pomeša sa 100  $\mu\text{L}$  rastvora PEG-a. Zatim se dodaje 1000  $\mu\text{L}$  ninhidrinskog reagensa, nakon čega se smeša inkubira u termošejkeru na 80 °C u trajanju od 10 minuta.

Po završetku inkubacije, epruveta se ohladi i u nju se doda 1000  $\mu\text{L}$  destilovane vode. Smeša se potom prebaci u kivetu, a njena apsorbanca se meri spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 570 nm.

Koncentracija oslobođenih amino grupa izračunava se pomoću standardne prave, prethodno konstruisane merenjem apsorbance vodenih rastvora arginina poznatih koncentracija (1 – 10 mg/g arginina), tretiranih ninhidrinskim reagensom pod istim uslovima. Rezultati su izraženi kao miliekvivalenti arginina po gramu proteinske frakcije.

### 3.2.7.4 HPLC analiza hidrolizata proteina

Hromatografska analiza hidrolizata PFSS izvršena je na HPLC sistemu *Dionex Ultimate 3000* (Thermo Scientific, Waltham, SAD), primenom kolone za reverzno-faznu hromatografiju (*BioBasic-8*, dimenzija 150 mm  $\times$  4,6 mm, veličina čestica 5  $\mu\text{m}$ ). Temperatura kolone održavana je konstantnom na 30 °C.

Kao mobilna faza korišćen je sistem dva eluenta: eluent A sastojao se od vodenog rastvora trifluorosirćetne kiseline (0,1%, v/v), dok je eluent B bio 100% acetonitril. Eluiranje je sprovedeno u uslovima gradijenta prema sledećem programu: izokratsko zadržavanje na 0% eluenta B tokom prvih 10 minuta, zatim linearni prelaz sa 0% na 50% eluenta B u trajanju od 35 minuta, i na kraju povratak sa 50% na 0% eluenta B u narednih 5 minuta.

Protok mobilne faze iznosio je 1,0 mL/min, dok je zapremina injektovanog uzorka bila 10  $\mu\text{L}$ . Detekcija komponenti u hidrolizatu vršena je pomoću UV detektora na talasnim dužinama od 214, 280 i 345 nm. Prikupljanje i obrada hromatografskih podataka obavljani su korišćenjem softvera *Chromeleon 7.2*.

### 3.2.7.5 SDS-PAGE analiza hidrolizata proteina

Elektroforetska analiza hidrolizata izvedena je pod denaturišućim uslovima (SDS-PAGE), primenom Bolt™ sistema (Thermo Fisher Scientific, Voltam, SAD), prema uputstvu proizvođača. Korišćeni su gotovi poliakrilamidni gelovi Bolt™ Bis-Tris Plus (4–12 %, 1,0 mm, WedgeWell™ format). Radni (1X) rastvor pufera za razdvajanje pripremljen je dodavanjem 50 mL koncentrata NuPAGE™ MES SDS Running Buffer (20X) u 950 mL dejonizovane vode; za jedan gel korišćeno je 400 mL pufera. Uzorci hidrolizata pripremani su pod redukujućim uslovima, mešanjem uzorka sa 2,5  $\mu\text{L}$  Bolt™ LDS Sample Buffer (4X) i 1  $\mu\text{L}$  Bolt™ Sample Reducing Agent (10X), uz dopunu dejonizovanom vodom do ukupne zapremine od 10  $\mu\text{L}$  i prethodno podešavanje na željenu koncentraciju proteina. Pripremljeni uzorci su zagrevani na 70 °C u trajanju od 10 min. U skladu sa uputstvom proizvođača, za redukovane uzorke je u katodnu komoru dodato 500  $\mu\text{L}$  Bolt™ Antioxidant na 200 mL radnog pufera.

Pre postavljanja gela uklonjen je češalj, bunarčići su isprani tri puta radnim puferom, a zatim je uklonjena zaštitna traka sa donje strane kasete. Kaseta je postavljena u Bolt™ Mini Gel Tank i fiksirana uz pravilnu orijentaciju anodnog konektora, nakon čega su anodna i katodna komora napunjene radnim puferom, uz proveru da su bunarčići potpuno ispunjeni i bez zaostalih mehurića vazduha.

U bunarčiće su naneti pripremljeni uzorci i proteinski standard SeeBlue™ Pre-stained. Sistem je zatvoren poklopcem i povezan sa izvorom napajanja PowerEase™ Touch 120W. Elektroforeza je izvedena pri konstantnom naponu od 200 V u trajanju od 20 min, pri čemu je jačina struje opadala sa početnih 160 mA na konačnih 70 mA.

Po završetku elektroforeze gel je pažljivo izvađen iz kasete, bojen jedan sat u rastvoru SimplyBlue™ SafeStain, a zatim obezbojavan u destilovanoj vodi tokom narednog sata. Gel je na kraju fotografisan radi vizuelizacije proteinskih traka i procene molekulskih masa fragmenata prisutnih u hidrolizatima.

### 3.2.8 Određivanje prebiotske aktivnosti

Uticaj različitih koncentracija sintetisanih mešavina ksilooligosaharida i pektinskih oligosaharida na rast probiotskih i patogenih monokultura ispitan je praćenjem rasta odabranih monokultura na podlogama kojima su dodati ispitivani hidrolizati (oligosaharidi) [233].

Kao hidrolizati u eksperimentima određivanja prebiotske aktivnosti korišćeni su uzorci reakcione smeše uzorkovani nakon 5 h hidrolize ksilana suncokretove sačme, odnosno nakon 120 min (LK-pektin iz uljane repice) i 90 min (Ca-pektin iz uljane repice i pektin iz pogače crne ribizle) hidrolize pektinskih supstrata. Za svaki supstrat uzorkovanje je za sve enzimske preparate izvedeno u istoj vremenskoj tački, kako bi dobijeni hidrolizati bili međusobno uporedivi, pri čemu se sadržaj nastalih oligosaharida u toj tački razlikuje između primenjenih sistema. Korišćenjem početnih uzoraka potencijalnih prebiotika i odgovarajućih tečnih hranljivih podloga nutritivni bujon za *Escherichia coli* ATCC 25922, MRS bujon bez ugljenih hidrata za *Lactiplantibacillus plantarum* 299v i *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG, odnosno YPD podloga bez ugljenih hidrata za *Saccharomyces boulardii* CBS 5926 pripremljena je serija različitih razblaženja XOS i POS.

Kulture inkubirane preko noći su adekvatno razblažene i inokulisane u bunarčiće mikrotitarskih ploča, tako da je početna koncentracija iznosila  $1 \times 10^7$  ćelija za bakterije, odnosno  $1 \times 10^5$  ćelija za kvasac. Mikrotitarske ploče su zatim inkubirane na temperaturi od 30 °C (za kvasac), odnosno na 37 °C (za bakterijske kulture).

Praćenje rasta vršeno je merenjem optičke gustine (OD) spektrofotometrijski, na talasnoj dužini od 600 nm, u definisanim vremenskim tačkama (0 i 24 h) pomoću čitača mikrotitarskih ploča. Dobijene OD vrednosti su zatim konvertovane u broj živih ćelija po mililitru (CFU/mL) primenom specifičnih konverzionih koeficijenata za svaki testirani mikroorganizam [234]. Za konstruisanje standardnih pravih pripremljeno je nekoliko različitih razblaženja prekonoćne kulture svakog mikroorganizma, za koja je istovremeno spektrofotometrijski određeno zamućenje (OD) na 600 nm i broj kolonija, prenošenjem serije razblaženja na čvrstu hranljivu podlogu i brojanjem kolonija nakon 24 h termostatiranja na temperaturi rasta. Čvrsta hranljiva podloga pripremana je od odgovarajućeg bujona uz dodatak agara koncentracije 2 % (m/v). Korelacijom OD i CFU/mL dobijeni su konverzioni koeficijenti, koji su iznosili  $3,0 \times 10^{-9}$  mL/CFU za *Lactiplantibacillus plantarum*,  $5,0 \times 10^{-9}$  mL/CFU za *Lactocaseibacillus rhamnosus*,  $2,0 \times 10^{-7}$  mL/CFU za *Saccharomyces boulardii* i  $5,0 \times 10^{-10}$  mL/CFU za *Escherichia coli*.

Kao kontrolni uzorak korišćena je odgovarajuća hranljiva podloga sa dodatkom glukoze u istom rasponu koncentracija.

Za svaki soj relativni rast izračunat je kao odnos broja vijabilnih ćelija u podlozi sa dodatkom hidrolizata i broja ćelija u odgovarajućoj kontrolnoj podlozi nakon 24 h. Prebiotski kapacitet (PC) za

svaki probiotički soj definisan je kao razlika između relativnog rasta probiotika i relativnog rasta *E. coli*. Vrednost  $PC = 0$  ukazuje na izostanak selektivnog efekta (jednaka relativna promena rasta probiotika i *E. coli*), vrednost  $PC > 0$  na selektivnu stimulaciju probiotika (prebiotski efekat), a  $PC < 0$  na favorizovanje *E. coli*. Relativni rast normalizovan je u okviru svakog enzimskog preparata posebno, korišćenjem odgovarajuće kontrole istog preparata. Za svaki hidrolizat prikazana je koncentracija hidrolizata pri kojoj je postignut najpovoljniji prebiotski profil.

## 4 REZULTATI I DISKUSIJA

U okviru ove doktorske disertacije, nemodifikovani i hemijski modifikovani nanokristali celuloze (nanoceluloza) korišćeni su kao nosači za imobilizaciju različitih hidrolitičkih enzima. Nanokristali celuloze (CNC) dobijene su kiselinom hidrolizom iz komercijalne mikrokristalne celuloze (MCC, prečnik čestica 20  $\mu\text{m}$ ). Dobijene nanočestice odlikuju se malim dimenzijama (dužina nekoliko stotina nanometara, širina 40–60 nm) i visokom specifičnom površinom, koja omogućava vezivanje većih količina proteina po jedinici mase nosača.

Nemodifikovana CNC na svojoj površini poseduje hidroksilne grupe, koje mogu učestvovati samo u nespecifičnoj adsorpciji enzimskih molekula, ali ne i u formiranju stabilnih kovalentnih veza. Kako bi se obezbedila mogućnost drugih mehanizama imobilizacije, površina je hemijski modifikovana na dva načina (reakcijama silanizacije i perjodatne oksidacije). U prvom postupku na površinu CNC uvedene su primarne amino grupe silanizacijom APTES-om, čime je dobijen amino-modifikovani nosač (amino-CNC). Uvođenjem slobodnih amino grupa na površinu nosača omogućava se vezivanje enzima adsorpcijom i to formiranjem privlačnih elektrostatičkih interakcija. Pored toga, prisutne slobodne amino grupe daju mogućnost dodatne aktivacije površine nosača primenom aktivirajućih agenasa kao što je npr. bifunkcionalni umreživač glutaraldehid. Drugom strategijom, perjodatnom oksidacijom anhidroglukoznih jedinica CNC-a, na površinu nosača su uvedene aldehidne grupe (Ox-CNC), koje mogu graditi kovalentne veze sa primarnim amino grupama enzima, bez potrebe za dodatnim korakom, tj. aktivacijom nosača radi formiranja kovalentnih veza sa molekulima enzima kao što je bio slučaj u prethodno primenjenoj metodi (šema 1).

U sklopu disertacije na pomenute nemodifikovane i modifikovane nosače imobilisani su komercijalni enzimski preparati i to: ksilanaza (Rohalase® SEP-Visco), pektinaza (Pectinex® Ultra SP-L) i dve proteaze (Alcalase® i Flavourzyme®). Za svaki enzimski sistem posebno su optimizovani uslovi imobilizacije, a fokus je stavljen na dobijanje kovalentno vezanih enzimskih preparata, budući da su ovakvi preparati generalno otporniji na desorpciju, pogodniji za višekratnu upotrebu i efikasniji za industrijske procese. Krajnji cilj disertacije je upotreba dobijenih nanobiokatalitičkih sistema u hidrolizi hemicelulozne, pektinske i proteinske frakcije izolovanih iz nusproizvoda prehrambene industrije. Pored optimizacije biotehnoških procesa dobijanja oligosaharida i proteinskih hidrolizata iz nusproizvoda prehrambene industrije, upotreba nanobiokatalitičkih sistema koji se sastoje od obnovljivih, prirodnih materijala kao nosača za imobilizaciju enzima predstavlja inovativni, održivi pristup i u skladu je sa principima cirkularne ekonomije u prehrambenoj industriji.

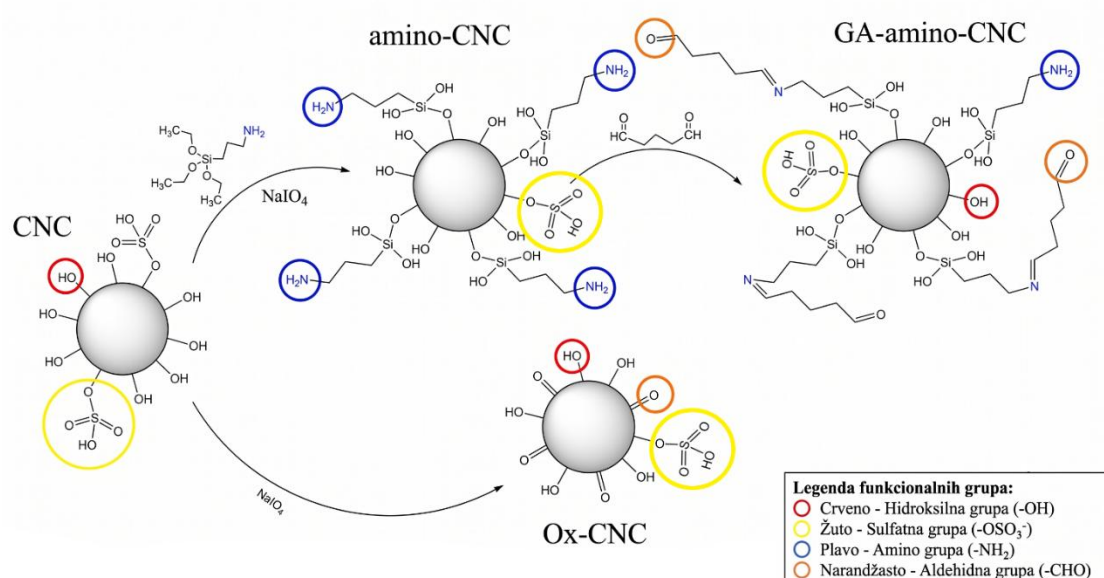
U skladu sa definisanim ciljevima, eksperimentalni deo disertacije organizovan je u tri međusobno povezana segmenta: (i) sinteza, hemijska modifikacija i karakterizacija nanoceluloznih nosača; (ii) optimizacija procesa imobilizacije različitih enzima na nemodifikovane i modifikovane nanocelulozne nosače, kao i analiza mehanizama njihovog vezivanja; (iii) primena odabranih nanobiokatalitičkih sistema u enzimskom tretmanu frakcija izolovanih iz nusproizvoda prehrambene industrije radi dobijanja proizvoda bogatih fiziološki aktivnim jedinjenjima (npr. proteinski hidrolizati (peptidi i aminokiseline), polifenoli i prebiotici). Pregled korišćenih enzima, nosača i frakcija izolovanih iz nusproizvoda prehrambene industrije, kao i očekivanih proizvoda nakon tretmana frakcija odabranim nanobiokatalizatorima prikazan je u tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Pregled ispitivanih enzima i nanoceluloznih nosača, supstrata i ciljnih proizvoda.

| Enzimski preparati                  | Nosači                               | Izolovane frakcije iz nusproizvoda prehrambene industrije | Očekivani proizvodi nakon enzimskog tretmana izolovanih frakcija iz nusproizvoda |
|-------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Ksilanaza (Rohalase® SEP-Visco)     | CNC, amino-CNC, GA-amino-CNC, Ox-CNC | Hemicelulozna frakcija                                    | Frakcija bogata ksilo-oligosaharidima DP (2-6)                                   |
| Pektinaza (Pectinex® Ultra SP-L)    | CNC, amino-CNC, GA-amino-CNC, Ox-CNC | Pektinska frakcija                                        | Frakcija bogata pektinskim oligosaharidima                                       |
| Proteaze (Alcalase® i Flavourzyme®) | CNC, amino-CNC, GA-amino-CNC, Ox-CNC | Proteinska frakcija                                       | Proteinski hidrolizati (peptidi i aminokiseline)                                 |

## 4.1 HEMIJSKA MODIFIKACIJA NANOCELULOZNIH NOSAČA

Kao početni materijal za sintezu CNC čestica korišćena je komercijalna mikrokristalna celuloza (MCC). MCC je tretirana sumpornom kiselinom (koncentrovana kiselina, 98 % (m/m), razblažena do radne koncentracije od 45 % (m/m)) radi dobijanja čestica nanometarskih dimenzija. Detaljan opis dobijanja i modifikacije nanoceluloze je opisan u poglavlju 3.2.1. Dobijene CNC čestice modifikovane su primenom dve metode, koje su šematski prikazane na šemi 1: (i) Silanizacija APTES-om radi uvođenja primarnih amino grupa (amino-CNC), a potom aktivacija glutaraldehidom (GA-amino-CNC); (ii) Selektivna perjodatna oksidacija anhidroglukoznih jedinica na pozicijama C2 i C3 radi dobijanja aldehidnih grupa.



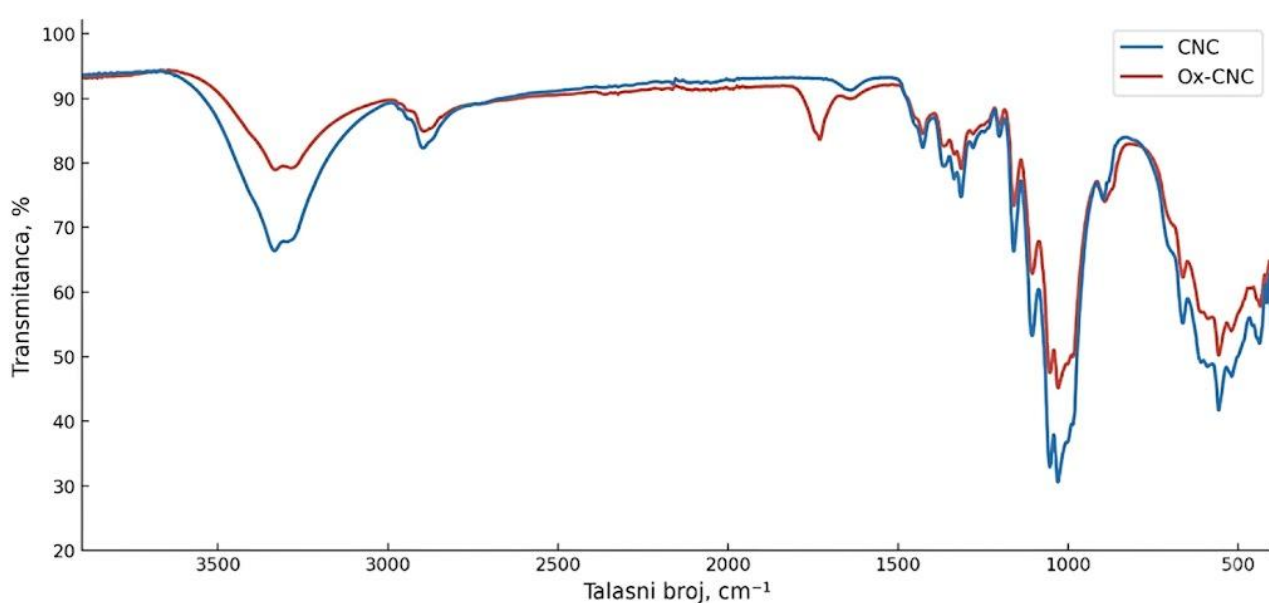
Šema 1. Šematski prikaz funkcionalizacije površine CNC reakcijom silanizacije i aktivacije sa GA i reakcijom perjodatne oksidacije.

Četiri dobijena nosača (CNC, amino-CNC, GA-amino-CNC i Ox-CNC) razlikuju se kako po prirodi reaktivnih grupa koje poseduju na svojoj površini, tako i po mehanizmu kojim se očekuje vezivanje enzima. U narednom poglavlju prikazana je strukturna i morfološka karakterizacija dobijenih nosača.

## 4.2 KARAKTERIZACIJA NANOCELULOZNIH NOSAČA

Razlika u strukturnim svojstvima nemodifikovanih i modifikovanih čestica nanoceluloze okarakterisana je FTIR spektroskopijom, morfologija čestica praćena je SEM i TEM mikroskopijom, dok je raspodela veličina čestica u disperziji određena metodom dinamičkog rasipanja svetlosti na zetasajzeru. Korišćene metode za modifikaciju nanoceluloznih čestica su detaljnije opisane u poglavlju 3.2.1.4. Cilj strukturnih analiza bio je da se svojstva dobijenih čestica nanoceluloze uporede sa svojstvima hemijski modifikovanih nanoceluloznih čestica.

Perjodatna oksidacija na pozicijama C2–C3 anhidroglukoznih jedinica nanoceluloznih nosača trebalo bi da dovede do nastanka aldehidnih grupa na površini CNC-a. Međutim, treba imati na umu da postoji mogućnost delimične transformacije hidroksilnih grupa što može dovesti do nastanka hemiacetalnih oblika što zavisi od dužine trajanja reakcije i koncentracije oksidacionog sredstva [235]. Za potvrdu uspešnosti primenjene metode modifikacije površine CNC i procenu njenog uticaja na osnovnu celuloznu strukturu modifikovanih nanočestica, snimljeni su uporedni FTIR spektri nemodifikovane CNC i Ox-CNC (Slika 4.1).

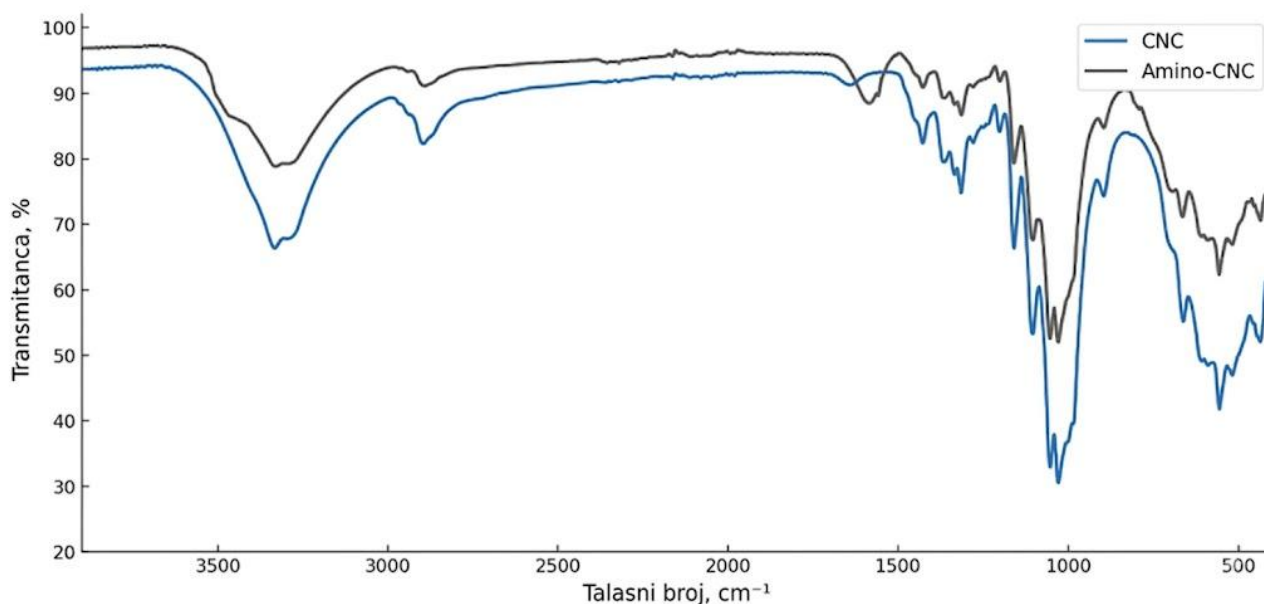


Slika 4.1. FTIR spektri nemodifikovanih nanokristala celuloze (CNC) i oksidovanih nanokristala celuloze (Ox-CNC).

Na FTIR spektru Ox-CNC uočava se smanjenje intenziteta pika na  $3340\text{ cm}^{-1}$  (O–H istežanje) što ukazuje na delimičnu transformaciju hidroksilnih grupa tokom oksidacije. Uočava se pik na  $1735\text{ cm}^{-1}$ , koji se može pripisati novonastalim aldehidnim grupama (C=O), koji potvrđuje uspešnu modifikaciju [236]. Pik na  $870\text{ cm}^{-1}$  ukazuje da aldehidne grupe na površini Ox-CNC nisu isključivo u slobodnom aldehidnom obliku, već se nalaze u ravnoteži sa intramolekularnim hemiacetalima formiranim sa susednim hidroksilnim grupama celuloznog lanca [237, 238]. U puferskim sistemima ova ravnoteža je dinamična. Hemiacetali se reverzibilno otvaraju i regenerišu slobodne aldehidne grupe koje potom mogu da reaguju sa amino grupama enzima. Ovaj fenomen ima direktan uticaj na kinetiku kovalentne imobilizacije: spor porast prinosa imobilizacije u kasnijim fazama procesa može delimično biti posledica postepenog oslobađanja aldehidnih grupa iz hemiacetalnog oblika, a ne samo difuzionih ograničenja ili zasićenja površine [239]. Pik na  $1104\text{ cm}^{-1}$  potiče od istežućih deformacionih vibracija C–O veza unutar osnovnog celuloznog lanca Ox-CNC, što potvrđuje da je tokom procesa oksidacije celulozna struktura očuvana [238]. Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima o oksidaciji celuloze perjodatom, gde se potvrđuje formiranje aldehidnih grupa bez značajne degradacije osnovne strukture.

Kvantitativna analiza hidroksilamin-titracionom metodom (opisanom u poglavlju 3.2.1.5) je pokazala da stepen oksidacije nanoceluloze prilikom dobijanja Ox-CNC iznosi 32%, vrednost koja bi trebalo da omogući kovalentnu imobilizaciju enzima formiranjem Šifovih baza između aldehidnih grupa i amino grupa na površini enzima [240]. Step en oksidacije od 32% je u skladu sa literaturno opisanim vrednostima (25–40%) za perjodatnu oksidaciju CNC, zavisno od koncentracije perjodatne kiseline i vremena reakcije [237, 239]. Step en oksidacije od 32% znači da je u proseku svaka treća anhidroglukozna jedinica prevedena u dialdehidni oblik, što obezbeđuje gustu i ravnomerno raspoređenu mrežu reaktivnih aldehidnih mesta duž celuloznih lanaca, dostupnih za vezivanje enzima. Više vrednosti stepena oksidacije, iznad 50%, dovode se u vezu sa smanjenjem mehaničke čvrstoće celuloznih čestica usled prekomerne degradacije kristalne rešetke celuloze [237]. Može se zaključiti da vrednost od 32% predstavlja povoljan kompromis između gustine reaktivnih mesta i očuvanja strukturalnog integriteta nosača. Stoga, dobijeni Ox-CNC pokazuje potencijal da se koristi kao nosač za kovalentno vezivanje enzima u daljim eksperimentima.

Druga primenjena metoda modifikacije CNC bila je silanizacija pomoću APTES u blago kiselom vodeno-etanolnom rastvoru i trebalo bi da rezultuje stvaranjem Si–O–C veza između amino-propil silanske grupe APTES-a i hidroksilne grupe CNC. Kao rezultat ove reakcije dolazi do uvođenja slobodnih primarnih amino grupa na površinu CNC, a koje ustvari predstavljaju nova funkcionalna mesta na površini nosača za potencijalno vezivanje enzima adsorpcijom. Da bi se potvrdila uspešnost primenjene metode modifikacije površine CNC reakcijom silanizacije APTES-om i istovremeno potvrdilo da osnovni celulozni skelet CNC ostaje očuvan, snimljeni su uporedni FTIR spektri nemodifikovanog CNC i amino-CNC nosača (Slika 4.2).

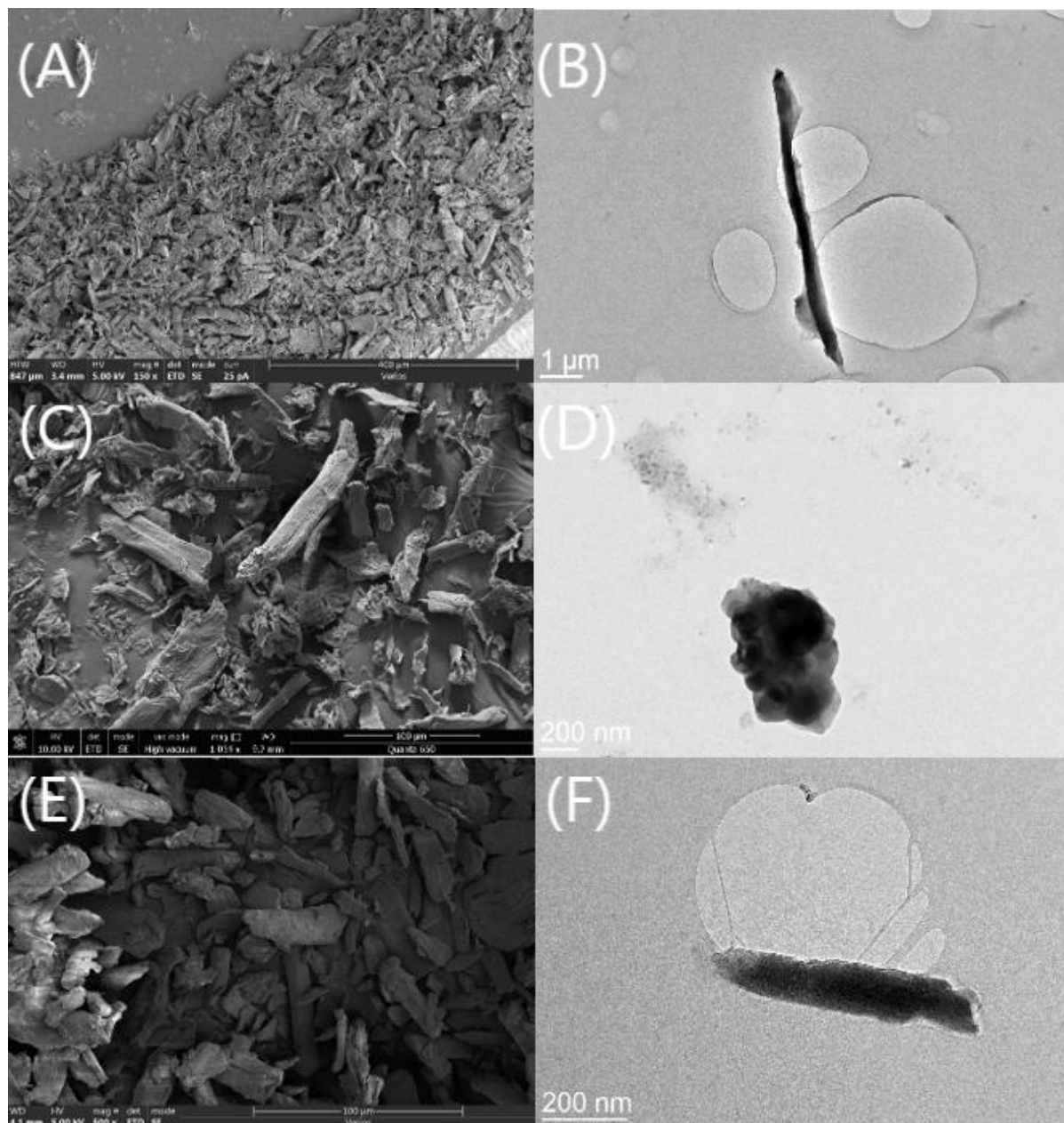


*Slika 4.2. FTIR spektri nemodifikovanih nanokristala celuloze (CNC) i amino-funkcionalizovanih nanokristala celuloze (amino-CNC).*

Na FTIR spektru amino-CNC uočavaju se promene očekivane za uvođenje amino-propil silanske grupe preko Si–O–C mosta. Naime, promene u regiji 3300–3400  $\text{cm}^{-1}$  i pojava pika na 1584  $\text{cm}^{-1}$  potvrđuju uspešno uvođenje amino-propil silanske grupe (N–H istezanje i  $\text{NH}_2$  savijanje), dok pikovi karakteristični za Si–O–C vibracije u oblasti 1000–1100  $\text{cm}^{-1}$  nisu lako uočljivi usled preklapanja sa dominantnim celuloznim C–O–C trakama [241, 242]. Detektovane promene u FTIR spektru amino-CNC u odnosu na nemodifikovani CNC potvrđuju uspešno uvođenje amino-propil silanske grupe na površinu nanočestica.

Nakon FTIR analize urađena je morfološka karakterizacija uzoraka CNC, Ox-CNC i amino-CNC primenom SEM i TEM mikroskopije, radi utvrđivanja eventualnih promena u obliku i stepenu

agregacije nanočestica usled primenjenih metoda hemijskih modifikacija. Hemijska modifikacija površine CNC, naročito perjodatna oksidacija koja deluje na anhidroglukozne jedinice u kristalnom delu celuloze, može potencijalno dovesti do promena na nivou strukture, do agregacije ili prekomernog usitnjavanja čestica [237, 243]. Sa druge strane, reakcija silanizacije menja površinsko naelektrisanje i hidrofobnost modifikovanih čestica u odnosu na polazni materijal, što takođe može uticati na međučestične interakcije i raspodelu veličina. Da bi se procenilo da li primenjeni postupci modifikacije menjaju oblik i dimenzije čestica, sva tri tipa nosača (CNC, Ox-CNC i amino-CNC) snimljena su skenirajućom i transmisijom elektronskom mikroskopijom (Slika 4.3).

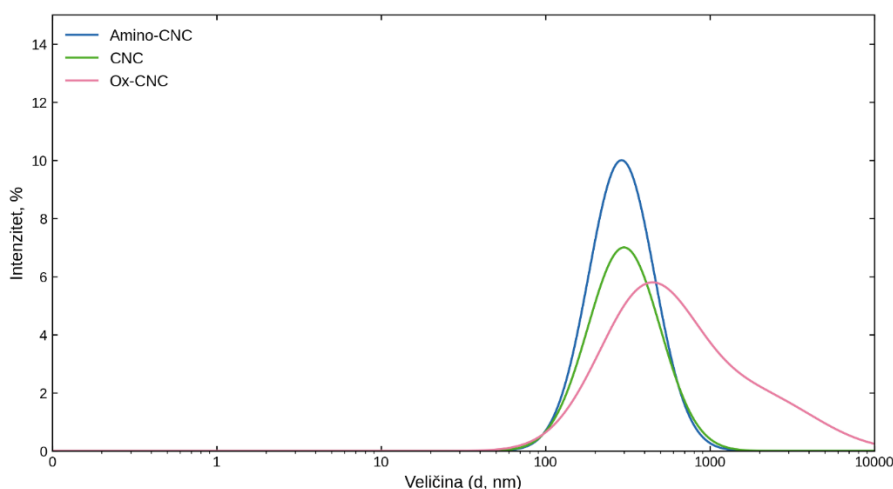


*Slika 4.3. SEM i TEM mikrografije nemođifikovanih, oksidovanih i amino-funkcionalizovanih nanoceluloznih nosača: SEM – CNC (A, uvelaanje 150x, razmernik 400 μm); TEM – CNC (B, razmernik 1 μm); SEM – Ox-CNC (C, uvelaanje 1059x, razmernik 100 μm); TEM – Ox-CNC (D, razmernik 200 nm); SEM – amino-CNC (E, uvelaanje 500x, razmernik 100 μm) i TEM – amino-CNC (F, razmernik 200 nm).*

Svi analizirani uzorci ispitivani su u obliku liofilizovanog praha. Pri uklanjanju vode iz disperzije nanoceluloze dolazi do nepovratnog povezivanja susednih nanočestica vodoničnim vezama, pojave

poznate kao hornifikacija, usled čega osušena nanoceluloza više ne sadrži pojedinačne čestice već čvrsto vezane aglomerate [244]. Ova pojava je izraženija kod nanoceluloze nego kod konvencionalnih celuloznih vlakana, zbog velike specifične površine nanočestica, i predstavlja poznato ograničenje pri karakterizaciji osušenih uzoraka [245]. SEM snimci (Slika 4.3. (A), (C) i (E)) načinjeni su pri uvećanjima od  $150\times$  do  $1059\times$ , pri kojima se pojedinačne nanočestice ne mogu razlučiti, pa oni prikazuju isključivo makroskopski izgled praškastih uzoraka i veličinu nastalih aglomerata. Oblik pojedinačnih čestica procenjivan je stoga na osnovu TEM snimaka. Na TEM snimcima CNC (B) i amino-CNC (F) uočava se izdužen, štapićast oblik čestica, karakterističan za nanokristale celuloze dobijene kiselinskom hidrolizom mikrokristalne celuloze [213, 246], pri čemu i ovde pojedine strukture predstavljaju agregate nastale tokom sušenja uzorka na mrežici, a ne pojedinačne nanoštapiće [245, 247]. Kod Ox-CNC (D) štapićast oblik nije jasno izražen, već se uočava zbijeniji agregat, što ukazuje na to da perijodna oksidacija dodatno pogoduje međučestičnom povezivanju, verovatno preko hemiacetalnih veza između novonastalih aldehidnih i susednih hidroksilnih grupa, u skladu sa pikom na  $870\text{ cm}^{-1}$  u FTIR spektru. Izvestan stepen agregacije kod modifikovanih nosača može se pripisati i izmenjenom površinskom naelektrisanju i novouvedenim funkcionalnim grupama [243]. Budući da mikroskopska analiza podrazumeva suvo stanje uzorka, veličina čestica u uslovima bliskim onima u kojima se odvija imobilizacija određena je metodom dinamičkog rasipanja svetlosti [246, 248-250].

Pošto SEM i TEM analize pružaju uvid u oblik čestica u suvom stanju, u kome je, kao što je pokazano, prisutna agregacija nastala tokom sušenja, dok stvarna primena nosača za imobilizaciju enzima podrazumeva njihovu disperziju u vodenoj sredini, izvršeno je merenje veličine čestica metodom dinamičkog rasipanja svetlosti (Dynamic Light Scattering, DLS) na zetasajzeru. Ovaj pristup omogućava merenje hidrodinamičke veličine čestica u disperziji i omogućava poređenje stepena agregacije CNC, Ox-CNC i amino-CNC u uslovima koji su sličniji onima u kojima se odvija imobilizacija (Slika 4.4).



*Slika 4.4. Raspodela hidrodinamičkog prečnika čestica CNC, Ox-CNC i amino-CNC određena metodom dinamičkog rasipanja svetlosti (DLS): zelena – CNC, ružičasta – Ox-CNC, plava – amino-CNC.*

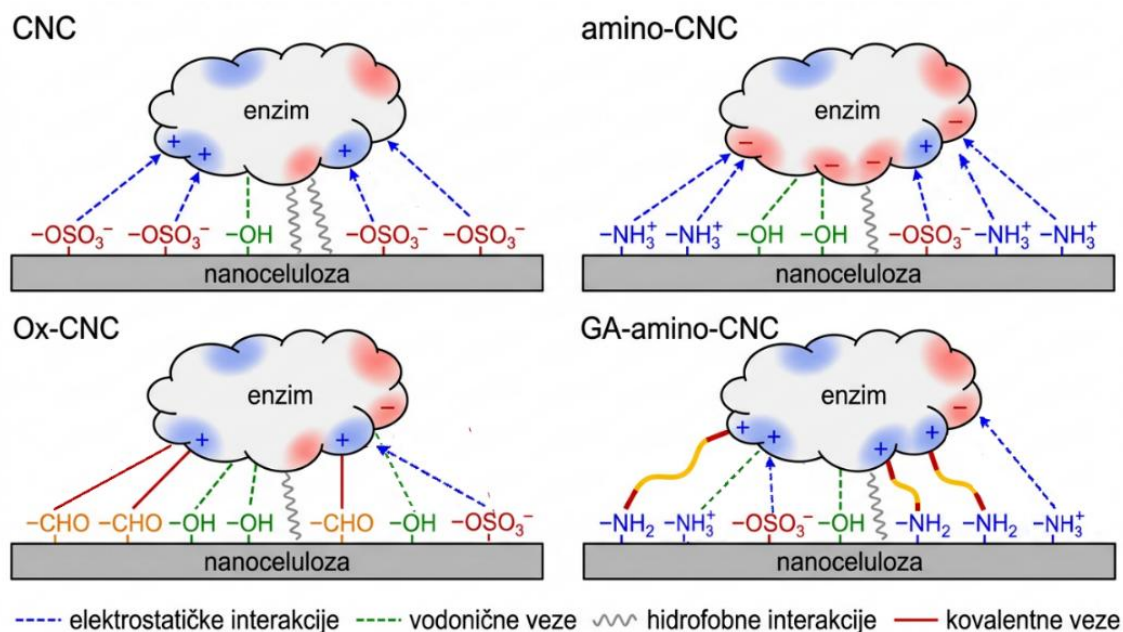
Za nemodifikovani CNC izmerena je Z-average vrednost od 297 nm, uz indeks polidisperznosti od 0,354 (zelena kriva, slika 4.4.). Ovako visok indeks polidisperznosti ukazuje na široku raspodelu veličina i prisustvo krupnijih agregata. Za amino-CNC dobijena je bliska Z-average vrednost (272 nm), uz nešto viši indeks polidisperznosti (0,436) (plava kriva, slika 4.4.), što pokazuje da silanizacija ne menja bitno srednju hidrodinamičku veličinu čestica, ali donekle proširuje raspodelu. Kod Ox-CNC (ružičasta kriva, slika 4.4.) prosečna vrednost pomena je ka nešto većim dimenzijama, oko 450 nm, što ukazuje na izraženiji stepen agregacije čestica u disperziji nakon perijodne oksidacije. Ovakvo ponašanje je u skladu sa činjenicom da perijodna oksidacija, otvaranjem prstena

anhidroglukoznih jedinica na pozicijama C2 i C3 i nastankom dialdehidnih grupa, delimično narušava uređenost površinske strukture i koloidnu stabilnost čestica, pri čemu novonastale aldehidne, odnosno hemiacetalne grupe mogu da podstaknu međučestične interakcije i agregaciju, a time i porast prividnog hidrodinamičkog prečnika [243]. Pošto se ova pojava ogleda u porastu hidrodinamičke veličine u disperziji, dok TEM snimci (Slika 4.3.) ne ukazuju na usitnjavanje niti na narušavanje kristalne strukture čestica, verovatnije je reč o agregaciji čestica nego o promeni dimenzija pojedinačnih kristala. Ipak, treba imati u vidu da DLS metoda meri hidrodinamički prečnik ekvivalentne sfere i za anizotropne, štapićaste čestice kao što su CNC sistematski precenjuje stvarnu dimenziju [247], pa apsolutne vrednosti ne treba tumačiti kao stvarne dimenzije pojedinačnih nanokristala, već kao komparativni pokazatelj promena u agregaciji između uzoraka CNC, Ox-CNC i amino-CNC.

Ovi rezultati pokazuju da silanizacija APTES-om ne dovodi do značajne promene hidrodinamičke veličine čestica, dok perjodatna oksidacija uzrokuje izvestan porast usled agregacije čestica u disperziji. Ipak, sve izmerene vrednosti ostaju u submikronskom opsegu, pa se dobijene čestice i dalje mogu tretirati kao nosači nano dimenzija. Treba imati u vidu da se hidrodinamički prečnik izračunava uz pretpostavku sfernog oblika čestica, pa kod štapićastih čestica, kakve su nanokristali celuloze, izmerena vrednost ne odgovara ni dužini ni prečniku poprečnog preseka, već prečniku ekvivalentne sfere [247]. DLS rezultati su stoga korišćeni za poređenje relativnog stepena agregacije nosača u disperziji, a ne za apsolutno određivanje dimenzija nanočestica.

### **4.3 IMOBILIZACIJA HIDROLITIČKIH ENZIMA NA NANOCELULOZNE NOSAČE**

U ovom poglavlju ispitivana je imobilizacija različitih hidrolitičkih enzima (ksilanaze Rohalase<sup>®</sup> SEP-Visco, pektinaze Pectinex<sup>®</sup> Ultra SP-L i proteaza Alcalase<sup>®</sup> i Flavourzyme<sup>®</sup>) na četiri nanocelulozna nosača čije je dobijanje i karakteristike opisane u prethodnom poglavlju koji se međusobno razlikuju po tipu funkcionalnih grupa koje poseduju na površini i potencijalnom mehanizmu vezivanja enzima (nemodifikovani CNC i amino-CNC se mogu koristiti kao nosači za vezivanje enzima adsorpcijom, dok su Ox-CNC i GA-amino-CNC pogodni za kovalentnu imobilizaciju enzima). Za svaki enzim-nosač sistem posebno su optimizovani uslovi procesa imobilizacije (pH vrednost, početna koncentracija proteina i vreme imobilizacije), a potom su upoređeni kapaciteti vezivanja između različitih nosača, kao i katalitička efikasnost dobijenih nanobiokatalitičkih sistema. Potencijalni mehanizmi interakcije između enzima i nosača šematski su prikazani na šemi 2.



Šema 2. Šematski prikaz mogućih interakcija enzima sa površinskim grupama različitih modifikacija nanoceluloze: sulfatne ( $-\text{OSO}_3^-$ ) i hidroksilne grupe na CNC, protonovane amino grupe ( $-\text{NH}_3^+$ ) na amino-CNC, aldehidne grupe ( $-\text{CHO}$ ) na Ox-CNC i glutaraldehydom aktivirane amino grupe na GA-amino-CNC. U zavisnosti od prisutnih grupa, enzim se vezuje elektrostatičkim interakcijama, vodoničnim vezama, hidrofobnim interakcijama i/ili kovalentnim vezama.

Na CNC, dobijenom kiselinskom hidrolizom pomoću  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , adsorpcija enzima može da se odvija putem više komplementarnih mehanizama kao što je prikazano na šemi 2. Negativno naelektrisane sulfatne grupe prisutne na površini CNC ( $-\text{OSO}_3^-$ ) mogu da ostvare elektrostatičke interakcije sa pozitivno naelektrisanim grupama prisutnim na površini enzima (npr. protonovanim amino grupama lizina i arginina), pri čemu jačina interakcija zavisi od pH vrednosti, jer promena pH vrednosti utiče na stepen protonacije i ukupno naelektrisanje enzima [248, 251]. Pored toga, hidrofobne CH grupe smeštene na kristalnim ravnima CNC mogu učestvovati u hidrofobnim interakcijama sa nepolarnim površinskim regijama proteina, dok hidroksilne grupe na površini nosača omogućavaju formiranje vodoničnih veza sa polarnim aminokiselinskim ostacima enzima [252]. Enzimi poput lipaza,  $\beta$ -galaktozidaza i lakaza uspešno su imobilisani adsorpcijom na CNC dobijene kiselinskom hidrolizom, što potvrđuje potencijal ovog nosača kao platforme za imobilizaciju različitih hidrolaza [4, 253].

Amino-CNC, dobijene silanizacijom CNC pomoću APTES-a (šema 2), pored hidroksilnih i preostalih sulfatnih grupa poseduje i primarne amino grupe koje su pozitivno naelektrisane u rastvorima sa kiselim i neutralnim pH vrednostima (sve dok pH ne pređe njihovu  $\text{pK}_a$  koja je za većinu  $\alpha$ -amino grupa između 9 i 10). Na ovim pH vrednostima moguće je formiranje izraženih elektrostatičkih interakcija između pozitivno naelektrisanih amino grupa nosača i negativno naelektrisanih grupa prisutnih na površini enzima (pre svega deprotonovanih karboksilnih grupa aspartata i glutamata), uz zadržavanje mogućnosti formiranja i hidrofobnih interakcija i vodoničnih veza kao kod nemodifikovanog CNC [254]. Iako je Zeta-potencijal i CNC i amino-CNC negativan u širokom pH opsegu (pH 3–9), sa izoelektričnom tačkom oba nosača u kiselom pH opsegu (pH 2–3) (vrednosti preuzete iz literature za analogne nosače nanoceluloze i amino-modifikovane nanoceluloze) [255], lokalna raspodela naelektrisanja (pozitivni  $\text{NH}_3^+$  domeni na nosaču i raspored grupa na enzimu) kao i sterne interakcije dominiraju pri formiranju privlačnih elektrostatičkih interakcija između nosača i enzima [256, 257]. Zbog toga je pri razmatranju uslova odigravanja imobilizacije enzima na CNC, a posebno na amino-CNC potrebno uzeti u obzir pH vrednost na kojoj

se izvodi imobilizacija, ukupno naelektrisanje enzima i raspored karboksilnih i amino grupa na površini molekula.

Ox-CNC predstavlja nosač koji se može koristiti za kovalentnu imobilizaciju enzima (šema 2). Aldehidne grupe uvedene perjodatnom oksidacijom anhidroglukoznih jedinica CNC-a mogu da formiraju Šifove baze sa primarnim amino grupama enzima, pri čemu se na površini Ox-CNC uspostavljaju stabilne kovalentne veze između nosača i enzimskih molekula [30, 258]. Pored ovih kovalentnih veza, oksidovana nanoceluloza i dalje može sadržati hidroksilne i preostale sulfatne grupe, pa dodatno formirane vodonične veze i hidrofobne interakcije mogu doprineti pravilnoj orijentaciji kao i stabilizaciji molekula enzima prilikom formiranja kovalentnih veza sa funkcionalnim grupama prisutnim na površini nosača [246, 251, 258]. Tako Ox-CNC predstavlja nosač za „direktnu“ kovalentnu imobilizaciju enzima na kome se uz kovalentne veze uspostavljaju i nekovalentne interakcije, bez potrebe za dodatnim korakom tj. aktivacijom nosača. Slični oksidovani (nano)celulozni nosači su uspešno primenjeni za kovalentnu imobilizaciju lakaze, ureaze, i proteaza, pri čemu su dobijeni biokatalitički sistemi imali zadovoljavajući prinos imobilizacije proteina i aktivnosti, povoljniju termičku stabilnost i zadržavali aktivnost tokom više uzastopnih ciklusa [4, 258-261].

GA-amino-CNC je amino-CNC nosač aktiviran pomoću bifunkcionalnog umreživača glutaraldehida kako bi se omogućila kovalentna imobilizacija enzima. Molekul glutaraldehida formira mostove (mrežu iminskih veza) između amino grupa nosača i amino grupa prisutnih na površini enzima (šema 2) pri čemu je enzim odmaknut od površine nosača organskim mostom (eng. *spacer arm*) koji potiče od molekula glutaraldehida [219]. Prilikom formiranja kovalentnih (iminskih) veza enzim ostaje udaljen od površine nosača za dužinu glutaraldehydnog mosta, pa je direktan uticaj površine nosača na zauzetu konformaciju proteina prilikom vezivanja manji nego kod nosača koji je dobijen tretmanom perjodatom [262]. Prisustvo mosta može doprineti tome da veći udeo enzima ostane vezan u katalitički aktivnoj konformaciji, kao i boljoj dostupnosti aktivnog centra supstratu. Naime, postojanje mosta smanjuje mogućnost nastanka drugih interakcija između površine nosača i enzima, kao i međusobnih interakcija molekula enzima usled gustog pakovanja, u poređenju sa direktnim kovalentnim vezivanjem enzima na površinu nosača.

Imobilizacija enzima na celulozne i nanocelulozne nosače, primenom različitih metoda imobilizacije dokumentovana je za širok spektar hidrolaza i oksidoreduktaza [4, 253, 258-261, 263, 264], što pruža osnovu za poređenje karakteristika imobilisanih enzimskih preparata, pre svega ostvarene aktivnosti, i kapaciteta vezivanja, dobijenih u ovoj disertaciji sa literaturnim vrednostima. U narednim poglavljima biće opisana i diskutovana imobilizacija različitih enzima (ksilanaze, pektinaze i proteaze) na nemodifikovane i modifikovane nanočestice celuloze.

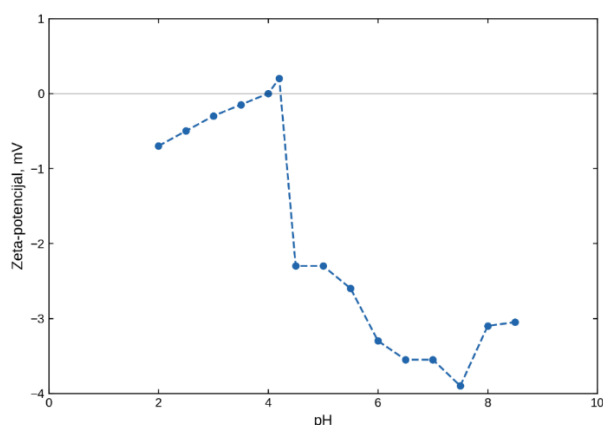
#### 4.3.1 Imobilizacija enzimskog preparata Rohalase® SEP-Visco na nanocelulozne nosače

Rohalase® SEP-Visco (ksilanaza) je komercijalni preparat endo-1,4- $\beta$ -ksilanaze namenjen hidrolizi arabinoksilana u procesima obrade žita. Njegova primena dovodi do smanjenja viskoznosti smeše, čime se olakšavaju procesi mlevenja, ukomljavaanja i fermentacije tokom industrijske prerade žitarica. Za proizvodnju ovog enzima koristi se genetički modifikovani soj *Trichoderma reesei* (RF5427). Ovaj komercijalni preparat ksilanaza ispoljava visoku enzimsku aktivnost u opsegu kiselih pH vrednosti (4–5) i na povišenim temperaturama (optimalno 50–60 °C), što je naročito pogodno za primenu u industriji [265-267]. Zbog karakteristika koje poseduje preparat Rohalase® SEP-Visco je odabran kao kandidat za imobilizaciju na nanocelulozni nosač, sa ciljem primene u dobijanju XOS, iz frakcije ksilana izolovane iz nusproizvoda industrije proizvodnje jestivog ulja - suncokretove sačme [267, 268]. Imobilizacija ksilanaze ispitana je na sva četiri nanocelulozna nosača (CNC, amino-CNC, GA-amino-CNC i Ox-CNC), pri čemu su za svaki sistem enzim–nosač posebno optimizovani uslovi imobilizacije (pH, početna koncentracija proteina i vreme imobilizacije), i

dobijeni nanobiokatalizatori su međusobno upoređeni kako bi se izdvojio najefikasniji sistem za imobilizaciju.

Da bismo precizno mapirali kako pH vrednost utiče na površinsko naelektrisanje ksilanaze (time predvideli njeno ponašanje tokom imobilizacije na nanocelulozne nosače), bitno je uzeti u obzir izoelektričnu tačku (pI) enzima i prostorni raspored kao i stepen jonizacije bočnih grupa njegovih aminokiselina prisutnih na površini molekula enzima.

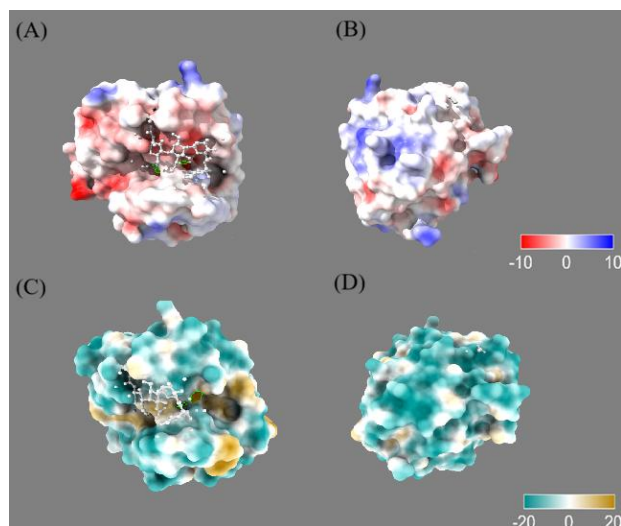
Iz tog razloga određen je zeta-potencijal preparata Rohalase® SEP-Visco u opsegu pH vrednosti od 2 do 8,5 (Slika 4.5.). Zavisnost zeta-potencijala od pH vrednosti pokazuje postepeno približavanje nultoj vrednosti u kiselom području, pri čemu se u oblasti oko pH 4 zeta-potencijal približava 0 mV. Ova vrednost ukazuje na izoelektričnu tačku preparata u području oko pH 4, pri kojem je neto površinsko naelektrisanje približno neutralno. Daljim povećanjem pH vrednosti zeta-potencijal prelazi u negativno područje, a pri višim pH vrednostima poprima izraženije negativne vrednosti, što ukazuje na porast neto negativnog naelektrisanja enzima iznad njegove izoelektrične tačke.



*Slika 4.5. Zeta-potencijal ksilanaze Rohalase® SEP-Visco u zavisnosti od pH vrednosti.*

Iz ovoga sledi da enzim ni pri najnižim ispitivanim pH vrednostima ne dobija izrazitije pozitivno neto naelektrisanje, dok pri pH vrednostima iznad procenjene izoelektrične tačke nosi sve izraženije negativno naelektrisanje.

Naelektrisanje enzima u zavisnosti od pH vrednosti važno je za sam proces imobilizacije adsorpcijom, posebno imajući u vidu negativno naelektrisanje CNC i amino-CNC u skoro celom pH opsegu ( $> \text{pH } 3$ ). Pored ukupnog naelektrisanja molekula enzima u rastvoru, na efikasnost procesa adsorpcije enzima i njegovu katalitičku efikasnost nakon imobilizacije na heterogenu površinu nosača značajno utiče i lokalni raspored naelektrisanih grupa i hidrofobnih oblasti na samoj površini molekula enzima, kao i položaj samog aktivnog centra. Trodimenzionalna struktura ksilanaze Rohalase® SEP-Visco sa raspodelom naelektrisanja i polarnih/nepolarnih regija je prikazana na slici 4.6.



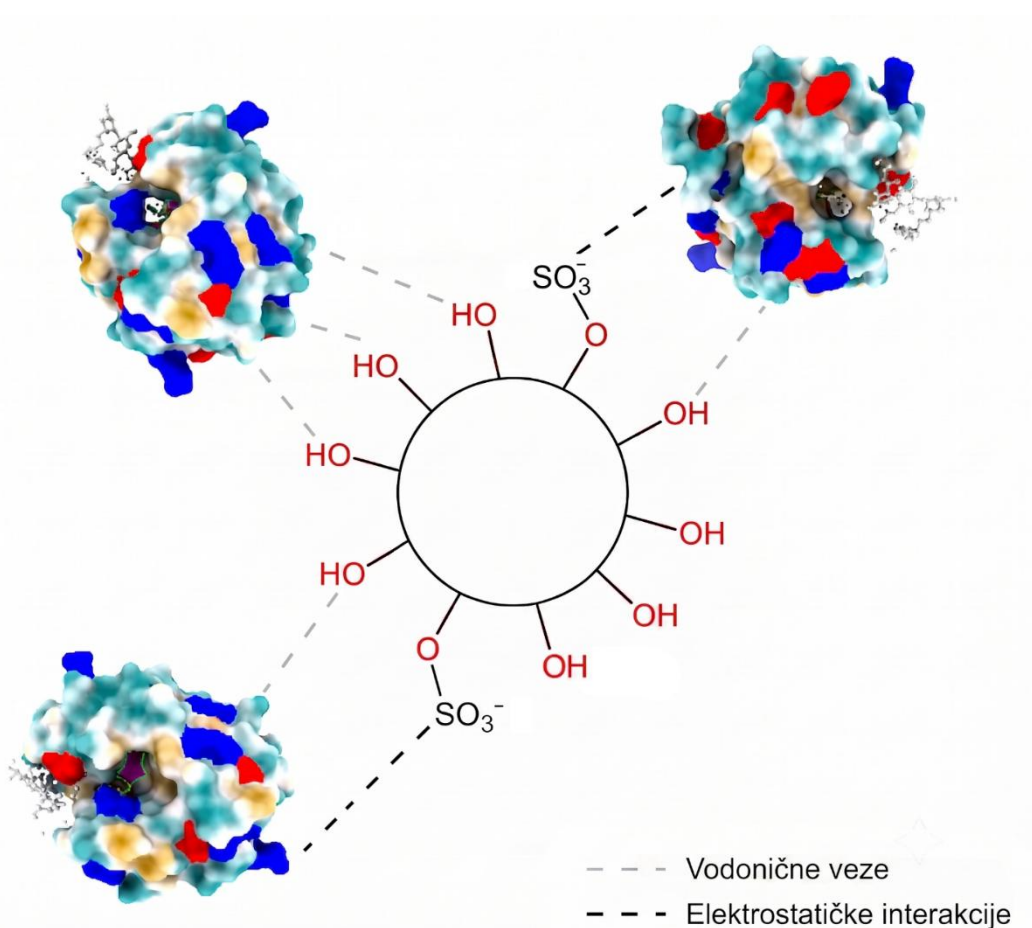
Slika 4.6. Trodimenzionalna struktura molekula endo- $\beta$ -(1-4)-D-ksilanaze iz *Thermopolyspora flexuosa* ekspresovane u *Trichoderma reesei* (Rohalase<sup>®</sup> SEP-Visco - PDB kod 1M4W - ksilanaza) [215]: Prednja strana molekula ksilanaze gde se vidi aktivni centar obojen u narandžasto, negativno naelektrisanje grupe obojene u crveno, a pozitivno naelektrisanje u plavo (A); Rotacija molekula ksilanaze za 180° u x-y ravni, negativno naelektrisanje molekula obojeno u crveno, pozitivno u plavo (B); Prednja strana molekula ksilanaze gde se vidi aktivni centar obojen u narandžasto, polarne regije molekula obojene u svetlo plavo, nepolarne u žuto (C); Rotacija molekula ksilanaze za 180° u x-y ravni, polarne regije molekula obojene u svetlo plavo, nepolarne u žuto (D).

Na slici 4.6. (A) uočava se da se u okolini aktivnog centra pretežno nalaze aminokiselinski ostaci koji su negativno naelektrisani, dok se pozitivno naelektrisane grupe nalaze na strani suprotnoj od aktivnog centra (Slika 4.6. (B)). Površina enzima je u celini dominantno polarna, sa ograničenim nepolarnim regijama (Slika 4.6. (C) i (D)), što ukazuje da će tokom adsorpcije biti izraženije vodonične veze i elektrostatičke interakcije nego hidrofobne.

Raspored funkcionalnih grupa aminokiselinskih ostataka na površini molekula enzima će imati neposredan uticaj na efikasnost imobilizacije enzima tj. na njegovu katalitičku aktivnost nakon imobilizacije posebno u slučajevima ireverzibilne kovalentne imobilizacije. Neadekvatna orijentacija enzima, naročito kada se vezivanje ostvaruje preko amino grupa u neposrednoj blizini aktivnog centra, može dovesti do delimičnog „prekrivanja“ aktivnog centra ili lokalnih promena u njegovoj strukturi, što se odražava kroz snižen prinos imobilizacije aktivnosti i nisku koncentraciju imobilisane aktivnosti. S obzirom na složenost same imobilizacije, uslovi koji obezbeđuju maksimalnu efikasnost moraju se definisati specifično za svaki odabrani par enzima i nosača.

#### 4.3.1.1 Imobilizacija preparata Rohalase<sup>®</sup> SEP-Visco adsorpcijom na nemodifikovanu nanocelulozu

Mehanizam imobilizacije ksilanaze adsorpcijom na CNC šematski je prikazan na šemi 3. Šematski prikaz imobilizacije ksilanaze na CNC pokazuje koje sve interakcije se mogu javiti prilikom adsorpcije ksilanaze na CNC. Njihov relativni udeo zavisi od uslova imobilizacije, pre svega od pH vrednosti, koja istovremeno menja ukupno naelektrisanje enzima i stepen disocijacije sulfatnih grupa nosača, stoga razmotren je sistematski uticaj pH, početne koncentracije proteina i vremena kontakta na efikasnost imobilizacije (koncentracija imobilisanih proteina (mg/g nosača) i koncentracija imobilisane aktivnosti (IU/g nosača)).

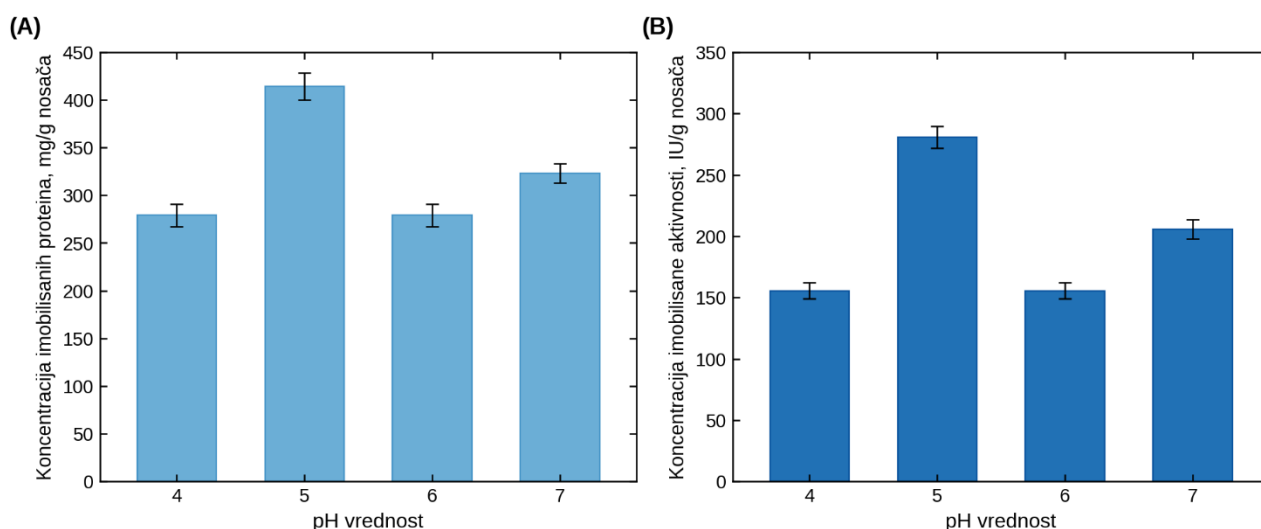


Šema 3. Šematski prikaz imobilizacije ksilanaze na CNC.

#### 4.3.1.1.1 Uticaj pH vrednosti na efikasnost imobilizacije preparata Rohalase® SEP-Visco adsorpcijom na CNC

U prvoj fazi ispitivanja imobilizacije adsorpcijom na CNC, praćen je uticaj pH na efikasnost imobilizacije ksilanaze Rohalase® SEP-Visco na CNC, pri konstantnoj početnoj koncentraciji proteina i vremenu kontakta enzima sa nosačem. Cilj je bio da se odredi optimalna pH vrednost imobilizacije na CNC, pri kojoj se postiže što veća koncentracija imobilisane aktivnosti. Prilikom izbora pH opsega uzeto je u obzir da je izoelektrična tačka ksilanaze na pH 4,2 i da pri pH vrednostima iznad te vrednosti enzim nosi ukupno negativno naelektrisanje, dok je CNC negativno naelektrisan u širokom pH intervalu (iznad pH 3). Očekivano je da će se najpovoljniji uslovi za adsorpciju postići u pH opsegu bliskom izoelektričnoj tački enzima, gde je elektrostatičko odbijanje između negativno naelektrisanih grupa prisutnih na površini enzima i sulfatnih grupa CNC minimalno, dok veoma niske ili visoke pH vrednosti nose rizik od denaturacije molekula enzima. Zbog toga je za ispitivanje odabran opseg pH 4–7.

Na slici 4.7 prikazane su zavisnosti koncentracije imobilisanih proteina (mg/g nosača) i koncentracije imobilisane aktivnosti (IU/g nosača) od pH vrednosti pri imobilizaciji izvedenoj u sledećim uslovima: početna koncentracija proteina od 1000 mg/g nosača, vreme imobilizacije 0,5 h, Na-acetatni pufer (pH 4 i 5) odnosno Na-fosfatni pufer (pH 6 i 7).



*Slika 4.7. Uticaj pH vrednosti na: koncentraciju imobilisanih proteina (A) i koncentraciju imobilisane aktivnosti (B) prilikom imobilizacije Rohalase® SEP-Visco na CNC nosač. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: početna koncentracija proteina 1000 mg/g nosača; 0,1 M Na-acetatni (pH 4 i 5) ili Na-fosfatni pufer (pH 6 i 7); vreme imobilizacije 0,5 h.*

Koncentracija imobilisanih proteina na CNC dostiže maksimum na pH 5 (414 mg/g nosača), dok se na pH 4, 6 i 7 vezuje nešto manja količina proteina (279–323 mg/g nosača) (Slika 4.7. (A)). Istovremeno, koncentracija imobilisane aktivnosti je sličnog profila, sa najvišom vrednošću na pH 5 (290 IU/g nosača) i nižim vrednostima na pH 4, 6 i 7 (155–200 IU/g nosača) (Slika 4.7. (B)).

Maksimalne vrednosti za koncentraciju vezanih proteina i aktivnosti na pH 5 su očekivane imajući u vidu činjenicu da molekuli ksilanaze na ovoj pH, koja je neznatno iznad procenjene izoelektrične tačke enzima ( $pI \approx 4,2$ ), nose blago negativno neto naelektrisanje. Karboksilne grupe aminokiselinskih ostataka prisutne na površini enzima (asparaginska kiselina,  $pK_a \approx 3,5$  i glutaminska kiselina,  $pK_a \approx 4,2$ ) su pretežno jonizovane, dok amino grupe aminokiselinskih ostataka (lizin, arginin,  $pK_a \approx 10\text{--}12$ ) ostaju pozitivno naelektrisane na pH 5 [269]. S obzirom na nisko negativno neto naelektrisanje, odbojne elektrostatičke interakcije između negativno naelektrisanih –OSO<sub>3</sub><sup>–</sup> grupa prisutnih na CNC i negativno naelektrisanih aminokiselinskih ostataka prisutnih na površini enzima su minimalne, a pozitivno naelektrisani aminokiselinski ostaci, koji se prema 3D strukturi (Slika 4.6.) nalaze na strani molekula suprotnoj od aktivnog centra, stupaju u privlačne elektrostatičke interakcije sa –OSO<sub>3</sub><sup>–</sup> grupama nosača. Adsorbovani molekuli enzima se u tim uslovima dodatno stabilizuju formiranjem vodoničnih veza između polarnih grupa nosača i enzima. Nešto niža koncentracija vezanih proteina na pH 4, uprkos tome što je izmereni zeta-potencijal preparata na toj pH vrednosti blizak nuli (Slika 4.5.), može se objasniti smanjenom rastvorljivošću i sklonošću ka agregaciji molekula enzima u okolini izoelektrične tačke, usled čega je manji udeo molekula dostupan za vezivanje na površinu nosača.

Na pH vrednostima višim od 5 (pH 6 i 7) koncentracija imobilisanih proteina na CNC opada. Molekul ksilanaze je na pH vrednostima iznad  $pI$  ukupno negativno naelektrisan, jer su karboksilne grupe aminokiselinskih ostataka prisutnih na površini molekula enzima u potpunosti jonizovane, što pojačava odbojne elektrostatičke interakcije prema negativno naelektrisanim –OSO<sub>3</sub><sup>–</sup> grupama CNC i otežava adsorpciju enzima na površinu nosača.

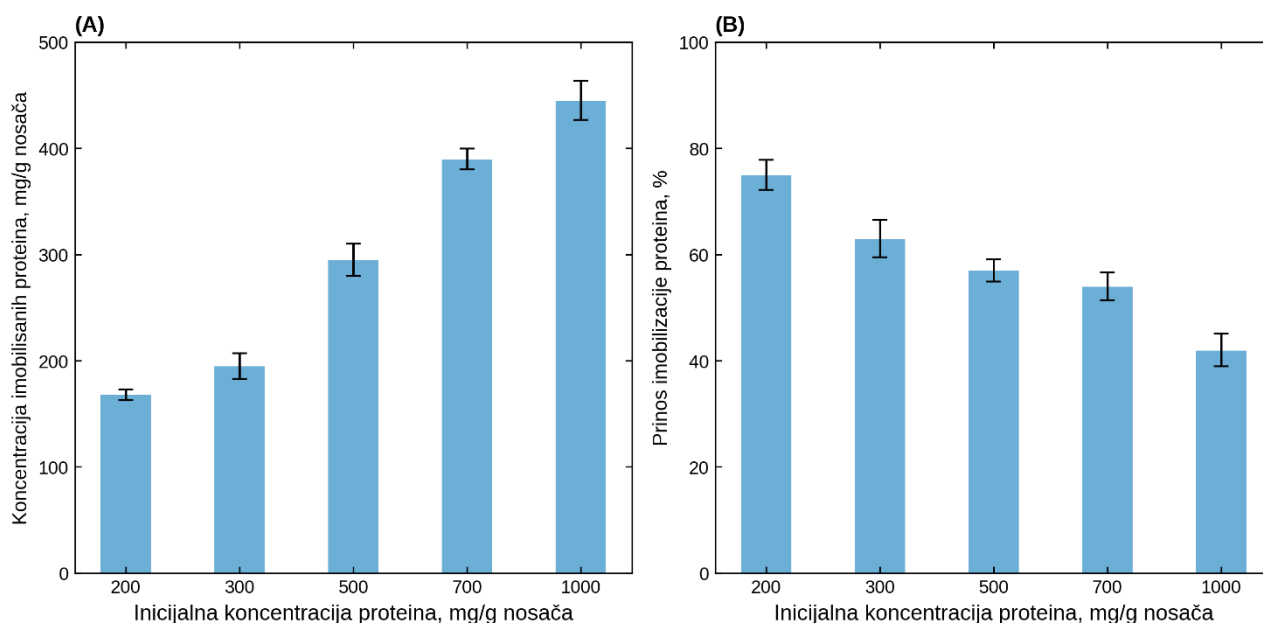
Na pH 5 se ne vezuje samo najveća količina proteina, već je i najveći udeo enzima u katalitički povoljnoj konformaciji i orijentaciji (slika 4.7. (B)), što implicira da se proporcionalno sa povećanjem koncentracije proteina povećava i udeo molekula ksilanaze koji se vezuje u aktivnoj konformaciji. Pad koncentracije imobilisane aktivnosti na pH većoj od 5 ukazuje da se molekuli ksilanaze na ovim pH vrednostima vezuju u nepovoljnoj orijentaciji, pri kojoj pozitivno naelektrisane grupe u blizini

aktivnog centra dolaze u neposrednu blizinu negativno naelektrisanih grupa nosača formirajući privlačne elektrostatičke interakcije, čime je pristup supstrata aktivnom centru otežan, što se direktno odražava kroz sniženu koncentraciju imobilisane aktivnosti.

Na osnovu prikazanih rezultata, pH 5 je izabrana kao optimalna pH vrednost za adsorpciju ksilanaze na CNC. Optimalna pH vrednost u skladu je sa literaturnim podacima za adsorpciju ksilanaze na celuloznim i hitozanskim nosačima jer se pokazalo da je optimalni pH za vezivanje ksilanaze na većinu ispitivanih nosača u opsegu pH 4,5–6 [270-272].

#### 4.3.1.1.2 Efikasnost imobilizacije proteina Rohalase® SEP-Visco na CNC

Pošto je odabrana optimalna pH (pH 5), u narednom setu eksperimenata određivan je kapacitet CNC nosača za vezivanje ksilanaze, kao i koji odnos između potrošene količine enzima i postignutog kapaciteta vezivanja je ekonomski isplativ. Početna koncentracija proteina varirana je u opsegu 200–1000 mg/g nosača, pri istim ostalim uslovima imobilizacije (pH 5, vreme 1 h), a rezultati za koncentraciju imobilisanih proteina i prinos imobilizacije proteina prikazani su na slici 4.8.



*Slika 4.8. Uticaj inicijalne koncentracije proteina na: koncentraciju imobilisanih proteina (A) i prinos imobilizacije proteina (B) prilikom imobilizacije Rohalase® SEP-Visco na CNC. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 200, 300, 500, 700 i 1000 mg/g nosača; 0,1 M Na-acetatni pufer pH 5; vreme imobilizacije 1 h.*

Na CNC nanočesticama porast početne koncentracije ksilanaze od 200 do 1000 mg/g nosača dovodi do kontinuiranog povećanja koncentracije imobilisanih proteina (mg/g nosača), od oko 165 mg/g nosača pri najmanjoj koncentraciji inicijalno ponuđenih proteina (200 mg/g nosača) do približno 440 mg/g nosača pri najvišoj ponuđenoj koncentraciji (1000 mg/g nosača) (Slika 4.8. (A)). Ovakav trend ukazuje na visok kapacitet CNC za vezivanje ksilanaze u ispitivanom opsegu, kao i na to da površina nosača pri najvišoj ponuđenoj koncentraciji proteina još uvek nije potpuno zasićena, mada je uočljivo da se u ispitivanom opsegu približavamo potpunom zasićenju, pošto je razlika u količini vezanih proteina između početnih koncentracija od 700 i 1000 mg/g nosača mala.

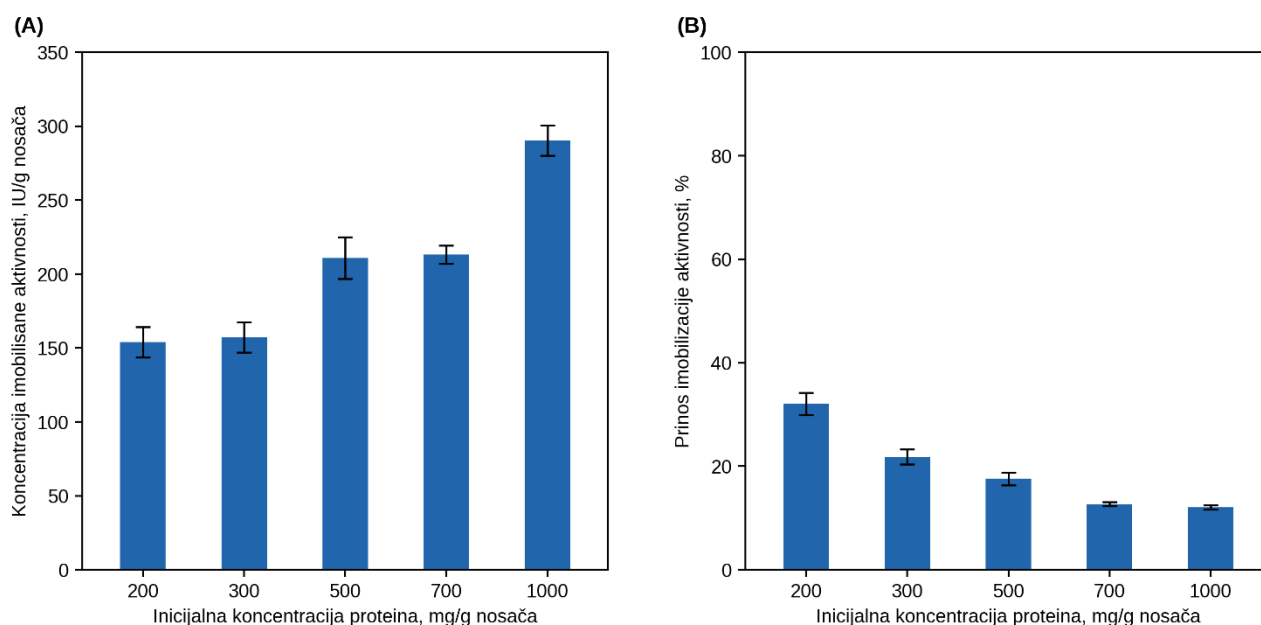
Istovremeno se, sa porastom početne koncentracije ksilanaze, prinos imobilizacije proteina (%) na CNC smanjuje sa oko 76% pri inicijalnoj koncentraciji proteina od 200 mg/g nosača na približno 43% pri početnoj koncentraciji od 1000 mg/g nosača (Slika 4.8. (B)). Ovakav profil je očekivan, jer

pri nižim početnim koncentracijama gotovo svi ponuđeni molekuli enzima pronalaze slobodna mesta za vezivanje, pa je prinos imobilizacije proteina visok, dok pri višim početnim koncentracijama dolazi do postepenog zasićenja površine nosača, te sve veći deo molekula enzima zaostaje u supernatantu nakon završene imobilizacije.

U praksi se kao optimalna početna koncentracija proteina bira 700 mg/g nosača: pri toj vrednosti vezano je oko 400 mg proteina po g nosača, dok se pri početnoj koncentraciji od 1000 mg/g nosača vezuje svega oko 40 mg/g nosača više (440 mg/g nosača). Stoga, sa stanovišta efikasnog iskorišćenja enzima i odnosa između početne koncentracije proteina i koncentracije stvarno vezanog proteina, početna koncentracija od 700 mg/g nosača predstavlja najpovoljniji kompromis između visokog prinosa imobilizacije i zadovoljavajuće ukupne količine imobilisanog enzima, pri čemu konačan izbor optimalne vrednosti zahteva i procenu katalitičke aktivnosti imobilisanog preparata.

#### 4.3.1.1.3 Efikasnost imobilizacije aktivnosti preparata Rohalase® SEP-Visco na CNC

Nakon ispitivanja uticaja inicijalne koncentracije proteina na koncentraciju vezanih proteina prilikom imobilizacije ksilanaze na CNC, ispitivan je uticaj inicijalne koncentracije proteina na koncentraciju imobilisane aktivnosti (IU/g nosača) i prinos imobilizacije aktivnosti (%). Rezultati su prikazani na slici 4.9. Analiziranjem zavisnosti koncentracije imobilisane aktivnosti ksilanaze od inicijalne koncentracije proteina uočava se da imobilisana aktivnost ksilanaze na CNC ispoljava trend sličan onom uočenom u slučaju koncentracije imobilisanih proteina.



*Slika 4.9. Uticaj inicijalne koncentracije proteina na koncentraciju imobilisane aktivnosti (A) i prinos imobilizacije aktivnosti (B) prilikom imobilizacije Rohalase® SEP-Visco na CNC.*

*Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina: 200, 300, 500, 700 i 1000 mg/g nosača; 0,1 M Na-acetatni pufer pH 5; vreme imobilizacije 1 h.*

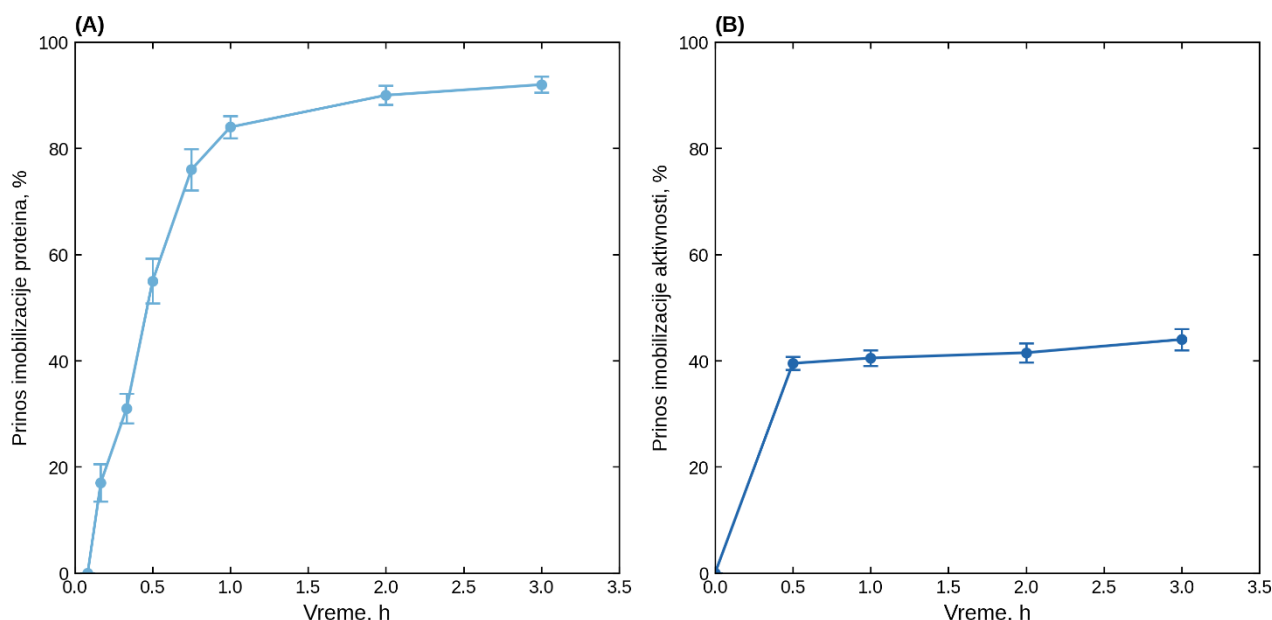
Koncentracija imobilisane aktivnosti ksilanaze (IU/g nosača) na CNC raste sa porastom početne koncentracije proteina od 200 do 1000 mg/g nosača, od 145 do oko 285 IU/g nosača (Slika 4.9. (A)). Porast imobilisane aktivnosti, međutim, nije proporcionalan porastu početne koncentracije proteina ni u jednom delu ispitivanog opsega. Povećanje početne koncentracije sa 200 na 1000 mg/g nosača (pet puta) prati porast imobilisane aktivnosti od svega dva puta. Ovakvo ponašanje karakteristično je za sisteme koji se približavaju zasićenju vezivnih mesta na nosaču, pri čemu sa povećanjem ponuđene količine proteina dolazi do progresivno manje efikasnog iskorišćenja dodatih molekula enzima,

verovatno usled ograničenog kapaciteta CNC i sternih smetnji kao posledice gušćeg pakovanja enzima na površini nosača [271, 273].

Ovaj trend dodatno potvrđuje i prinos imobilizacije aktivnosti (Slika 4.9. (B)), koji opada sa 32% pri početnoj koncentraciji proteina od 200 mg/g nosača na oko 12% pri inicijalnoj koncentraciji od 1000 mg/g nosača. Ipak, koncentracija imobilisane aktivnosti po gramu nosača (IU/g nosača) u celom ispitivanom opsegu početnih koncentracija raste, što znači da dodatno vezani enzimi doprinose ukupnoj aktivnosti po jedinici mase CNC, iako efikasnost iskorišćenja ukupno unete aktivnosti opada. Posmatrajući istovremeno i kapacitet vezivanja i prinos imobilizacije aktivnosti, kao i efikasnu potrošnje enzima, početna koncentracija proteina od 200 mg/g nosača izdvojena je kao najpovoljnija za dalje eksperimente, jer obezbeđuje najviši prinos imobilizacije aktivnosti uz zadovoljavajuću koncentraciju imobilisane aktivnosti na CNC.

#### 4.3.1.1.4 Kinetika imobilizacije preparata Rohalase® SEP-Visco na CNC

Pored pH i početne koncentracije proteina, treći parametar u optimizaciji imobilizacije je vreme kontakta enzima sa nosačem. Ovaj parametar određuje koliko brzo se uspostavlja ravnoteža adsorpcije i u kojem trenutku dalje produžavanje procesa prestaje da donosi korist u smislu povećanja imobilisane aktivnosti. Stoga je na optimalnoj pH vrednosti i početnoj koncentraciji proteina (pH 5, 200 mg/g nosača) praćena kinetika prinosa imobilizacije proteina i prinosa imobilizacije aktivnosti tokom 3 h (Slika 4.10).



*Slika 4.10. Uticaj vremena imobilizacije na promenu prinosa imobilizacije proteina (A) i prinosa imobilizacije aktivnosti (B) tokom imobilizacije Rohalase® SEP-Visco na CNC. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 200 mg/g nosača; 0,1 M Na-acetatni pufer pH 5; vreme 0-3 h.*

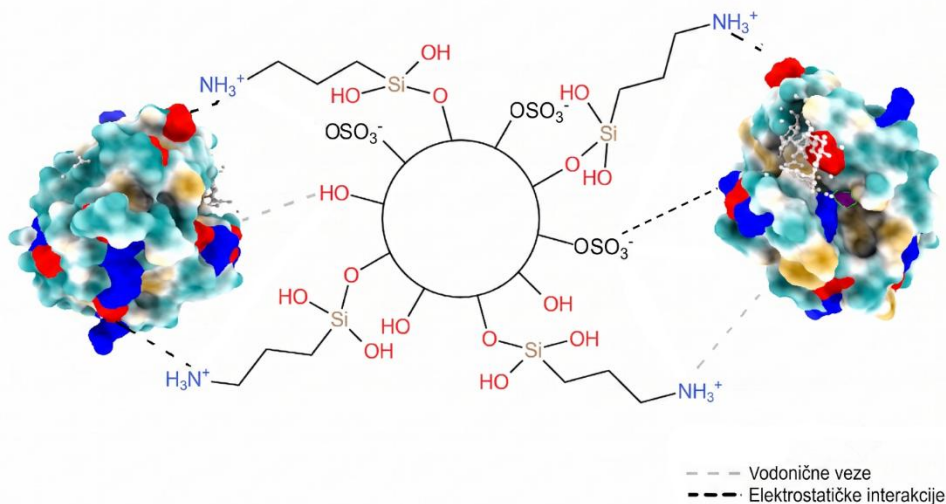
Rezultati pokazuju da prinos imobilizacije proteina na CNC nosaču kontinuirano raste tokom celog ispitivanog perioda (Slika 4.10. (A)), od oko 17% nakon 10 min do približno 92% nakon 3 h, pri čemu je porast najizraženiji u prvim sat vremena sa više od 80% vezanih proteina, dok se u kasnijoj fazi uspostavlja ravnoteža između adsorpcije i desorpcije. Nasuprot tome, maksimalan prinos imobilizacije aktivnosti (Slika 4.10. (B)) dostiže se veoma brzo: već nakon 30 min postiže se približno 40% aktivnosti, a vrednost se u daljem toku eksperimenta (do 3 h) ne menja značajno. Ovakav trend ukazuje da se u početnoj fazi imobilizacije najpre vezuju molekuli ksilanaze u aktivnoj konformaciji, dok se u kasnijim fazama adsorpcije vezuju dodatni molekuli čije vezivanje ne dovodi do proporcionalnog povećanja ukupne imobilisane aktivnosti, verovatno zbog nepovoljne orijentacije

prilikom vezivanja ili sternih smetnji koje nastaju kao posledica gusto pakovanih molekula enzima na površini nosača. Takođe, treba imati u vidu da ovaj preparat nije visokog nivoa prečišćenosti, pa sadrži i druge enzime pa se može pretpostaviti i da se u drugoj fazi više imobilišu ovi molekuli koji ne doprinose ksilanaznoj aktivnosti.

Kada je reč o postizanju maksimalne koncentracije imobilisane aktivnosti i efikasnog iskorišćenja enzima, može se zaključiti da je optimalno vreme adsorpcije na CNC u opsegu 30–60 min. Produžavanje vremena imobilizacije preko 1 h ne dovodi do značajnog porasta koncentracije imobilisane aktivnosti po gramu nosača, iako povećava koncentraciju imobilisanih proteina i prinos imobilizacije proteina. Brza kinetika uspostavljanja adsorpcione ravnoteže, sa više od 90% finalne aktivnosti dostignute u prvih 30 min, konzistentna je sa vrednostima opisanim za adsorpciju enzima na nosačima visoke specifične površine, gde kratke difuzione putanje između nanočestica i enzima u rastvoru ubrzavaju uspostavljanje adsorpcione ravnoteže u poređenju sa makroskopskim nosačima [274]. Slična brza kinetika imobilizacije opisana je i za ksilanazu imobilisanu na magnetnim nanočesticama, gde je ravnoteža postignuta u opsegu 30–60 min [275, 276].

#### 4.3.1.2 Imobilizacija preparata Rohalase® SEP-Visco adsorpcijom na amino-modifikovanu nanocelulozu

Imobilizacija ksilanaze adsorpcijom na amino-modifikovanu nanocelulozu (amino-CNC) ispitivana je sa ciljem da se utvrdi kako uvođenje primarnih amino grupa na površinu CNC utiče na kapacitet vezivanja i katalitičku aktivnost imobilisane ksilanaze. Posebna pažnja posvećena je uticaju pH vrednosti na formiranje elektrostatičkih interakcija između negativno naelektrisanih grupa na površini enzima i protonovanih amino grupa nosača, kao i uticaju početne koncentracije proteina i vremena imobilizacije na koncentraciju vezanih proteina i aktivnost imobilisanog sistema. Mehanizam imobilizacije ksilanaze adsorpcijom na amino-CNC šematski je prikazan na šemi 4.



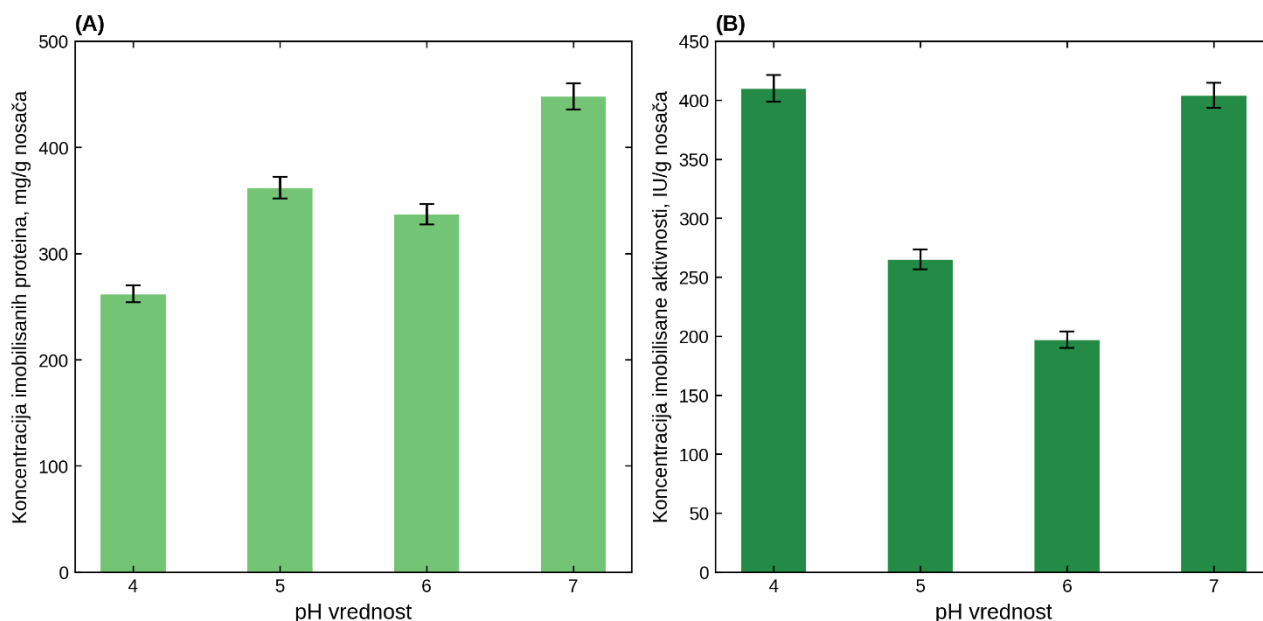
Šema 4. Šematski prikaz imobilizacije ksilanaze na amino-CNC

Za razliku od adsorpcije na nemodifikovanu CNC, na amino-CNC se uz vodonične veze i hidrofobne interakcije očekuje i izraženija privlačnost između protonovanih amino grupa nosača i negativno naelektrisanih površinskih oblasti enzima. Ova razlika u dominantnim mehanizmima trebalo bi da se odrazi i na različit pH optimum adsorpcije, što je razmotreno u nastavku.

#### 4.3.1.2.1 Uticaj pH vrednosti na adsorpciju preparata Rohalase® SEP-Visco na amino-CNC

Prilikom ispitivanja uticaja pH vrednosti na adsorpciju ksilanaze na amino-CNC korišćen je isti opseg pH vrednosti (4–7) kao i za CNC. U tom opsegu amino grupe na površini nosača ostaju pretežno protonovane ( $-\text{NH}_3^+$ ) [255], pa se razlike u efikasnosti adsorpcije ne mogu pripisati promeni naelektrisanja nosača, već promeni ukupnog naelektrisanja enzima u odnosu na njegovu izoelektričnu tačku (pI oko 4,2).

Na Slici 4.11 prikazane su zavisnosti koncentracije imobilisanih proteina (mg/g nosača) i koncentracije imobilisane aktivnosti (IU/g nosača) od pH vrednosti prilikom adsorpcije ksilanaze na amino-CNC, u istim uslovima eksperimenta kao i kod CNC nosača.



*Slika 4.11. Uticaj pH vrednosti na: koncentraciju imobilisanih proteina (A) i koncentraciju imobilisane aktivnosti (B) prilikom imobilizacije Rohalase® SEP-Visco na amino-CNC nosaču. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: početna koncentracija proteina 1000 mg/g nosača; 0,1 M Na-acetatni (pH 4 i 5) ili Na-fosfatni pufer (pH 6 i 7); vreme imobilizacije 0,5 h.*

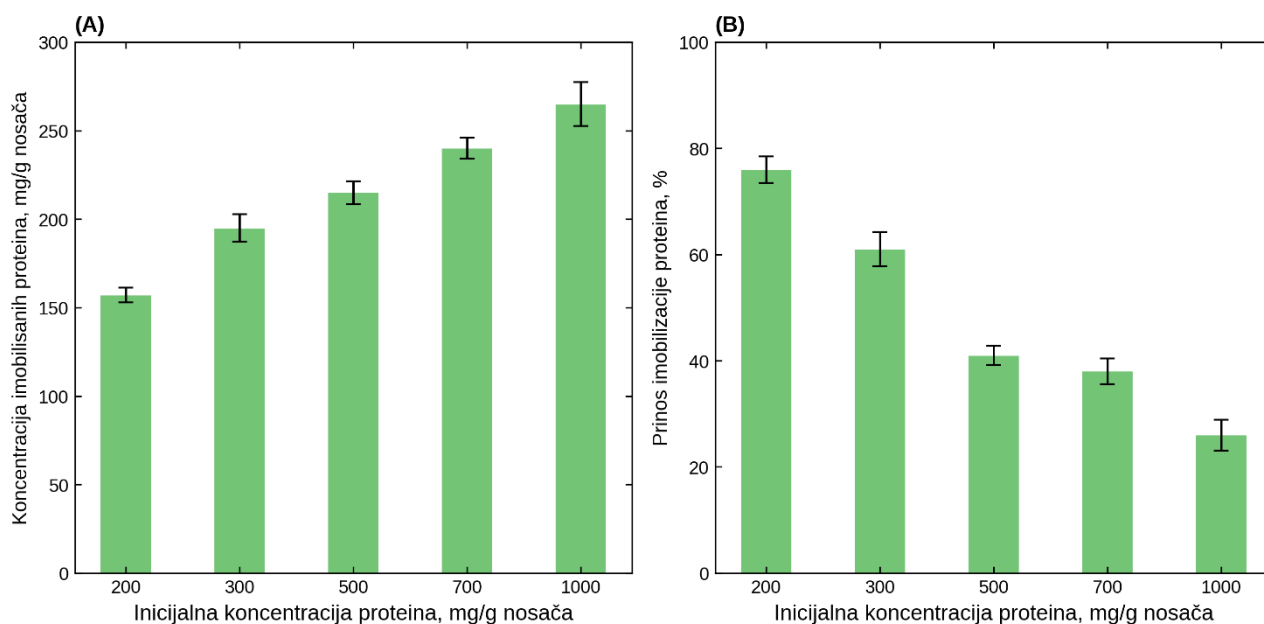
Koncentracija imobilisanih proteina je najviša na pH 7, nešto niža na pH 5 i 6 i skoro dva puta niža na pH 4, što pokazuje da sa porastom pH vrednosti raste i ukupna količina vezanog enzima. Istovremeno, koncentracija imobilisane aktivnosti pokazuje dva izražena maksimuma: oko 400 IU/g nosača na pH 4 i na pH 7, dok je na pH 5 niža (oko 260 IU/g nosača), a na pH 6 značajno niža (oko 200 IU/g nosača). Prisustvo dve maksimalne vrednosti aktivnosti ukazuje da se na ove dve pH ostvaruju različiti dominantni mehanizmi adsorpcije ksilanaze na amino-CNC. Na pH 4, vrednosti bliskoj izoelektričnoj tački ksilanaze ( $\text{pI} \approx 4,2$ ), ukupno naelektrisanje enzima teži nuli, pa su odbojne elektrostatičke interakcije između enzima i amino-CNC nosača, koji i posle modifikacije zadržava neto negativno naelektrisanje, minimalne [274]. Amino grupe na površini nosača su pri tome u celom ispitivanom opsegu pH 4–7 praktično potpuno protonovane ( $-\text{NH}_3^+$ ), pa razlika u stepenu njihove protonovanosti nije uzrok razlika u efikasnosti imobilizacije. U tim uslovima dominantan mehanizam adsorpcije su vodonične veze [277] između polarnih ostataka enzima i površine nosača, kao i hidrofobne interakcije, dok elektrostatičke interakcije imaju manji doprinos [256]. Na pH 7, ksilanaza je pretežno negativno naelektrisana i uspostavlja se privlačne elektrostatičke interakcije sa protonovanim amino grupama nosača. Visoka imobilisana aktivnost postignuta na ovom pH (oko 400 IU/g nosača) pokazuje da je i ovaj mehanizam vezivanja efikasan za povoljnu orijentaciju enzima, a time i za dobru katalitičku efikasnost.

Ipak, pH 4 je odabran kao optimum za dalju optimizaciju iz dva razloga: (1) bliža vrednost procenjenoj izoelektričnoj tački enzima minimizuje ukupno elektrostatičko odbijanje između enzima i nosača, i (2) iako je na obe pH vrednosti koncentracija imobilisane aktivnosti ista, na pH 4 je vezana znatno niža koncentracija imobilisanih proteina. Ova razlika se najjasnije može izraziti kao specifična aktivnost imobilisanog preparata: prilikom imobilizacije na pH 4 specifična aktivnost iznosi 1,6 IU/mg proteina, dok je na pH 7 specifična aktivnost od svega oko 0,9 IU/mg proteina. Drugim rečima, na pH 4 se sličan nivo katalitičke aktivnosti ostvaruje uz gotovo dvostruko manju količinu vezanog enzima, što ukazuje na povoljniju orijentaciju i konformaciju imobilisanih molekula ksilanaze.

Na pH 4, amino grupe amino-CNC nosača su pretežno protonovane ( $\text{NH}_3^+$ ), što pojačava elektrostatičku privlačnost između nosača i negativno naelektrisanih grupa na površini enzima. Na pH 5 su amino grupe amino-CNC nosača i dalje praktično potpuno protonovane, pa se naelektrisanje nosača u opsegu pH 4-5 bitno ne menja; razlika u optimalnom pH adsorpcije stoga ne potiče od nosača, već od promene naelektrisanja samog enzima. Sličan efekat promene optimalnog pH adsorpcije ka nižim vrednostima nakon uvođenja amino grupa na površinu nosača opisan je i u literaturi za imobilizaciju na amino-funkcionalizovanim nanočesticama [66, 274, 275]. Na osnovu dobijenih rezultata za koncentraciju imobilisane aktivnosti (IU/g nosača) i koncentraciju imobilisanih proteina (mg/g nosača) na različitim pH vrednostima, za dalju optimizaciju adsorpcije ksilanaze na amino-CNC odabran je pH 4.

#### 4.3.1.2.2 Efikasnost imobilizacije proteina preparata Rohalase® SEP-Visco na amino-CNC

U narednom koraku proučavan je uticaj početne koncentracije proteina (mg proteina po g nosača) na koncentraciju imobilisanih proteina (mg/g nosača) i prinos imobilizacije proteina (%) prilikom imobilizacije ksilanaze na amino-CNC pri čemu je imobilizacija trajala 1 h. Dobijeni rezultati su grafički prikazani kao zavisnost koncentracije imobilisanih proteina (mg/g nosača), i prinos imobilizacije proteina (%) od početne koncentracije ksilanaze (Slika 4.12.).



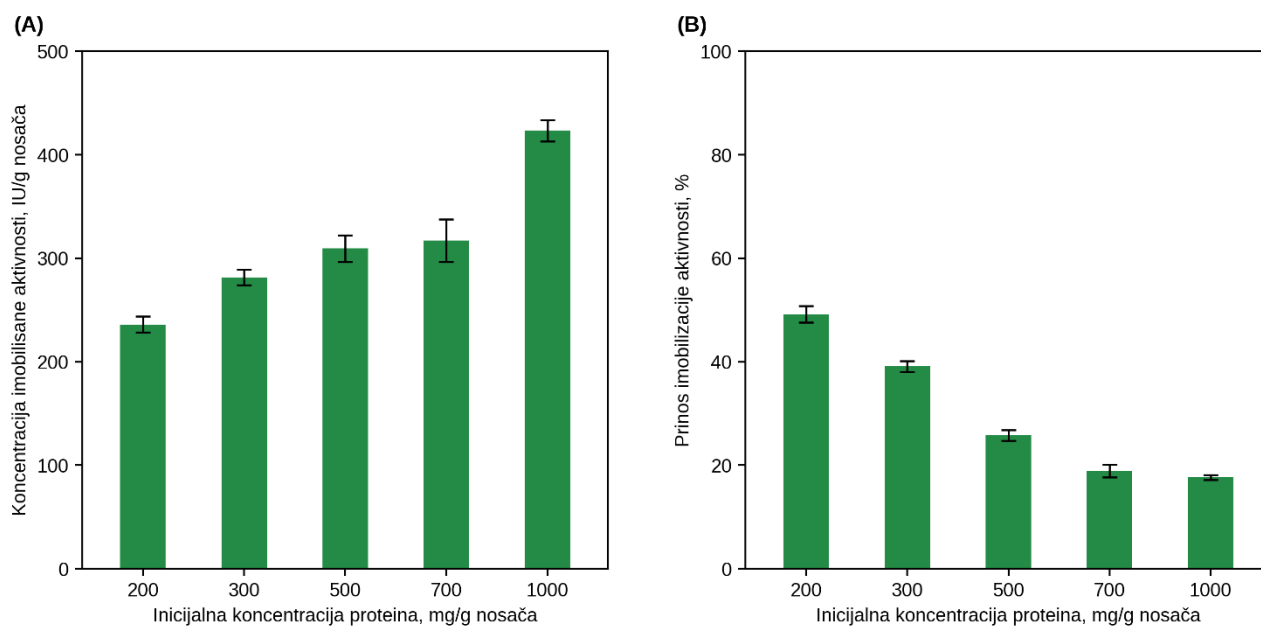
*Slika 4.12. Uticaj inicijalne koncentracije proteina na: koncentraciju imobilisanih proteina (A) i prinos imobilizacije proteina (B) prilikom imobilizacije Rohalase® SEP-Visco na amino-CNC. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 200, 300, 500, 700 i 1000 mg/g nosača; 0,1 M Na-acetatni pufer pH 4; vreme imobilizacije 1 h.*

Prilikom imobilizacije ksilanaze na amino-CNC koncentracija imobilisanih proteina raste sa porastom početne koncentracije ksilanaze, od približno 155 mg/g nosača pri najmanjoj inicijalnoj koncentraciji proteina (200 mg/g nosača) do oko 263 mg/g nosača pri najvećoj inicijalnoj koncentraciji (1000 mg/g nosača) (Slika 4.12. (A)). Pri tome se uočavaju tri karakteristične faze. U prvoj fazi, u opsegu od 200 do 300 mg/g nosača, prisutan je nagli porast vezivanja molekula enzima, što ukazuje na to da su dostupna mesta na nosaču još uvek daleko od zasićenja. U drugoj fazi, u opsegu od 300 do 700 mg/g nosača, porast se nastavlja, ali postaje postepeniji i skoro linearan, što ukazuje na stabilno vezivanje bez ograničenja difuzijom. U trećoj fazi, u opsegu od 700 do 1000 mg/g nosača, kriva se izravnavala i dostiže se najveća koncentracija vezanog proteina (oko 260–270 mg/g nosača), uz istovremeno veću standardnu devijaciju, što ukazuje na približavanje zasićenju nosača. Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da je maksimalni kapacitet ovog nosača za vezivanje ksilanaze oko 260 mg/g nosača.

Istovremeno, prinos imobilizacije proteina na amino-CNC opada sa oko 77% pri početnoj koncentraciji proteina od 200 mg/g nosača na približno 27% pri inicijalnoj koncentraciji od 1000 mg/g nosača (Slika 4.12. (B)). To znači da se pri višim početnim koncentracijama značajan deo ponuđenih molekula proteina ne vezuje za nosač, jer preostaje sve manje dostupnih mesta za imobilizaciju, pa veći deo molekula enzima ostaje u supernatantu nakon završene imobilizacije. Smanjenje prinosa imobilizacije sa porastom početne koncentracije proteina je očekivano, ali je u ovom slučaju izraženo (četvorostruka razlika između najniže i najviše koncentracije ponuđenih proteina) što dodatno potvrđuje da je dostignut nivo blizak maksimalnom kapacitetu nosača za vezivanje ksilanaze.

#### 4.3.1.2.3 Efikasnost imobilizacije aktivnosti preparata Rohalase® SEP-Visco na amino-CNC

Da bi se ispitalo kako količina vezanog proteina utiče na katalitičku efikasnost sistema, određene su koncentracija imobilisane aktivnosti (IU/g nosača) i prinos imobilizacije aktivnosti (%) u zavisnosti od početne koncentracije proteina (mg/g nosača). Na Slici 4.13. prikazane su vrednosti koncentracije imobilisane aktivnosti ksilanaze (IU/g nosača) i prinosa imobilizacije aktivnosti (%) za različite početne koncentracije enzima.



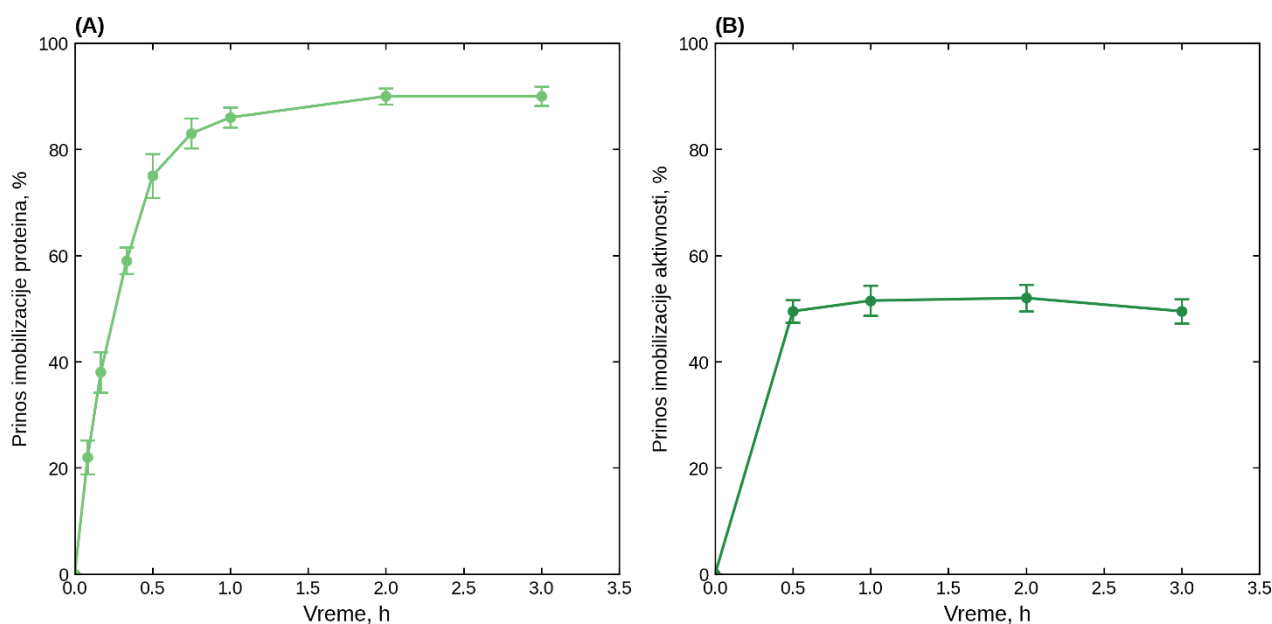
Slika 4.13. Uticaj inicijalne koncentracije proteina na koncentraciju imobilisane aktivnosti (A) i prinos imobilizacije aktivnosti (B) prilikom imobilizacije Rohalase® SEP-Visco na amino-CNC. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina: 200, 300, 500, 700 i 1000 mg/g nosača; 0,1 M Na-acetatni pufer pH 4; vreme imobilizacije 1 h.

Na amino-CNC nosaču koncentracija imobilisane aktivnosti ksilanaze (IU/g nosača) raste u celom ispitivanom opsegu početnih koncentracija proteina, od oko 235 IU/g nosača pri početnoj koncentraciji proteina od 200 mg/g nosača do približno 420 IU/g nosača pri inicijalnoj koncentraciji od 1000 mg/g nosača (Slika 4.13. (A)). Blago povećanje aktivnosti je izraženo kroz čitav opseg ispitivanih vrednosti, sa platoom pri koncentracijama proteina od 500 i 700 mg/g nosača, nakon čega dolazi do skoka aktivnosti sa 310 IU/g nosača na 420 IU/g nosača, koliko je izmereno pri najvećoj ponuđenoj koncentraciji proteina. Prikazani trend imobilizacije ksilanaze i njene ispoljene katalitičke aktivnosti pri različitim inicijalnim koncentracijama proteina ukazuje da se sa porastom početne koncentracije proteina do 700 mg/g nosača blago raste i količina vezanih proteina kao i broj katalitički funkcionalnih molekula na površini amino-CNC pa se može zaključiti da većina vezanih molekula se nalazi u katalitički aktivnoj konformaciji. Uočeni skok katalitičke aktivnosti pri najvećoj ponuđenoj koncentraciji proteina, a pri čemu količina vezanih molekula enzima nije značajno porasla može biti posledica reorijentacije vezanih molekula čime je prilaz supstrata aktivnom centru olakšan. Prinos imobilizacije aktivnosti (%) opada sa porastom početne koncentracije proteina, sa približno 49% pri početnoj koncentraciji proteina od 200 mg/g nosača na oko 18% pri inicijalnoj koncentraciji od 1000 mg/g nosača (Slika 4.13. (B)). Drugim rečima, ukupna koncentracija imobilisane aktivnosti po jedinici mase amino-CNC kontinuirano raste sa porastom početne koncentracije proteina, ali sa progresivno manjom efikasnošću iskorišćenja inicijalno unete aktivnosti na početku imobilizacije. Iz ugla praktične primene, to znači da visoke početne koncentracije proteina dovode do nepotrebno velike potrošnje enzima uz relativno skroman prirast aktivnosti po gramu nosača.

Zbog toga je, posmatrajući istovremeno koncentraciju imobilisanih proteina, koncentraciju imobilisane aktivnosti i prinose imobilizacije proteina i aktivnosti, početna koncentracija enzima od 200 mg/g nosača izabrana kao optimalna u daljim eksperimentima za imobilizaciju ksilanaze na amino-CNC. Ova vrednost obezbeđuje relativno visok prinos imobilizacije aktivnosti i imobilisane aktivnosti po gramu nosača, uz 77% vezanih proteina od inicijalno ponuđenih.

#### 4.3.1.2.4 Kinetika adsorpcije preparata Rohalase® SEP-Visco na amino-CNC

Da bi se utvrdilo da li uvođenje primarnih amino grupa na površinu CNC ima uticaj na proces imobilizacije ksilanaze na nanocelulozu, kinetika adsorpcije ksilanaze na amino-CNC ispitana je pri optimalnim uslovima (pH 4, početna koncentracija proteina 200 mg/g nosača) u toku 3 h. Promene prinosa imobilizacije proteina i prinosa imobilizacije aktivnosti u zavisnosti od vremena prikazane su na slici 4.14.



*Slika 4.14. Uticaj vremena imobilizacije na promenu prinosa imobilizacije proteina (A) i prinosa imobilizacije aktivnosti (B) tokom imobilizacije Rohalase® SEP-Visco na amino-CNC. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 200 mg/g nosača; 0,1 M Na-acetatni pufer pH 4; vreme 0-3 h.*

Rezultati pokazuju da se na amino-CNC već nakon 30 minuta vezuje približno polovina ponuđenih proteina, dok se nakon 1 h dostiže prinos imobilizacije proteina od oko 77%, u saglasnosti sa vrednošću dobijenom u koncentracionoj seriji pri istoj početnoj koncentraciji proteina i istom vremenu imobilizacije (Slika 4.12. (B)), a posle 3 h vrednosti se približavaju punom zasićenju sa blizu 95% vezanih proteina (Slika 4.14. (A)). Prinos imobilizacije aktivnosti takođe veoma brzo dostiže maksimalne vrednosti: približno 50% ukupne početne aktivnosti je imobilisano već nakon 30 minuta, a zatim se prinos aktivnosti tokom daljeg trajanja eksperimenta praktično ne menja značajno (Slika 4.14. (B)).

Ovakav profil ukazuje da se u ranoj fazi adsorpcije vezuju molekuli ksilanaze koji su katalitički aktivni, dok se u kasnijim fazama na površinu amino-CNC uglavnom vežu dodatni molekuli čije prisustvo ne dovodi do proporcionalnog povećanja ukupne imobilisane aktivnosti, verovatno zbog nepovoljne orijentacije prilikom vezivanja ili pojave sternih smetnji zbog gustog pakovanja molekula proteina na površini nosača. U kontekstu efikasnosti procesa, može se zaključiti da je za postizanje maksimalne koncentracije imobilisane aktivnosti na amino-CNC dovoljno vreme imobilizacije od 30–60 minuta, dok produžavanje vremena do 3 h prvenstveno povećava koncentraciju imobilisanih proteina, ali bez značajnog porasta aktivnosti po gramu nosača.

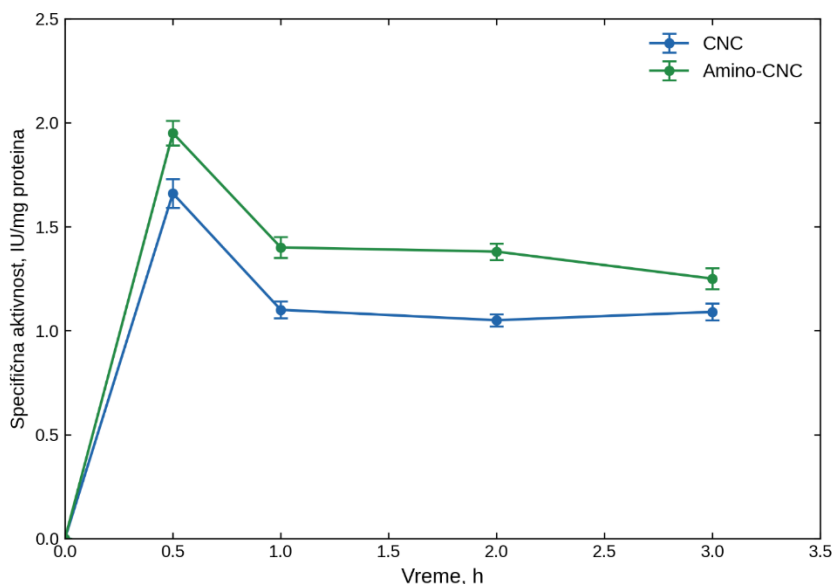
#### 4.3.1.3 Uporedna analiza adsorpcije preparata Rohalase® SEP-Visco na CNC i amino-CNC

Imobilizacija ksilanaze na CNC i amino-CNC odvija se adsorpcijom, ali se mehanizmi razlikuju zbog prisustva primarnih amino grupa na površini amino-CNC, koje menjaju površinsko naelektrisanje i tip dominantnih interakcija sa enzimom. Ova razlika se ogleda i u pH-zavisnosti: dok se pri imobilizaciji na CNC maksimum imobilisane aktivnosti postiže na pH 5, gde je enzim, neposredno iznad svoje izoelektrične tačke (pI oko 4,2), još uvek slabo negativno naelektrisan, pa preovlađuju vodonične veze, uz doprinos hidrofobnih i van der Valsovih interakcija, preparat amino-CNC–ksilanaza ispoljava dva maksimuma: na pH 4, vrednosti najbližoj izoelektričnoj tački, gde su elektrostatičke interakcije najslabije a vezivanje se ostvaruje pretežno vodoničnim vezama, uz

doprinos hidrofobnih interakcija i na pH 7 (privlačne elektrostatičke interakcije između negativno naelektrisanih grupa enzima i protonovanih amino grupa nosača).

Dva nosača razlikuju se i po kapacitetu i po katalitičkoj efikasnosti vezanog enzima. Na nemodifikovanoj CNC ostvaruje se znatno veći kapacitet vezivanja proteina (do 440 naspram 260 mg/g nosača) i viši prinos imobilizacije proteina u celom ispitivanom opsegu, zahvaljujući homogeno raspoređenim  $-OH$  i  $-OSO_3^-$  grupama koje omogućavaju veliki broj vodoničnih veza i povoljnih elektrostatičkih interakcija po celoj površini. Kod amino-CNC, gusto raspoređene pozitivno naelektrisane amino grupe favorizuju jače pojedinačne interakcije, ali mogu dovesti do ranog „zaključavanja“ enzima u orijentacijama koje sterno blokiraju susedna vezivna mesta, čime se ukupni kapacitet smanjuje. Ostvarene koncentracije imobilisanih proteina na oba nosača (do 260, odnosno 440 mg/g nosača) prevazilaze literaturno opisane vrednosti za nanocelulozne nosače (tipično 20–280 mg/g nosača) [272, 275, 278].

Iako koncentracija imobilisane aktivnosti po gramu nosača i prinos imobilizacije aktivnosti pružaju uvid u efikasnost vezivanja, oni ne razdvajaju doprinos vezivanja veće količine vezanog enzima od doprinosa povoljnije orijentacije pojedinačnih molekula. Da bi se ova dva efekta razdvojila, izračunata je specifična aktivnost ksilanaze (IU po mg vezanih proteina) za oba nosača u zavisnosti od vremena imobilizacije, čime je omogućeno poređenje katalitičke efikasnosti vezanih molekula enzima na CNC i amino-CNC (Slika 4.15).



*Slika 4.15. Promena specifične aktivnosti Rohalase® SEP-Visco imobilisane na CNC i amino-CNC u zavisnosti od vremena imobilizacije. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: početna koncentracija proteina 200 mg/g nosača; CNC – 0,1 M Na-acetatni pufer pH 5; amino-CNC – 0,1 M Na-acetatni pufer pH 4; vreme imobilizacije 0–3 h.*

Ključna razlika između dva nosača najjasnije se ogleda u specifičnoj aktivnosti imobilisanog preparata, koja razdvaja doprinos količine vezanog enzima od doprinosa njegove orijentacije. Specifična aktivnost ksilanaze adsorbovane na amino-CNC viša je nego na nemodifikovanoj CNC (1,54 naspram 0,91 IU/mg proteina), što ukazuje na povoljniju orijentaciju vezanih molekula. Ovo se može objasniti rasporedom naelektrisanja na površini enzima (Slika 4.6.): pozitivno naelektrisane grupe nalaze se pretežno na strani suprotnoj od aktivnog centra, dok su u njegovoj neposrednoj blizini negativno naelektrisane grupe. Na dominantno negativnoj površini CNC, elektrostatičko odbijanje između nosača i negativnih grupa oko aktivnog centra može nametnuti rigidnu konformaciju i lokalna naprezanja, uz posledični gubitak aktivnosti. Kod amino-CNC, protonovane amino grupe ublažavaju

to odbijanje i stvaraju heterogenu površinu sa više tipova lokalnih interakcija, što omogućava veći udeo molekula kod kojih aktivni centar ostaje pristupačan supstratu [270, 271, 279].

Kinetika adsorpcije slična je na oba nosača: katalitički aktivni molekuli enzima vezuju se brzo (prinos imobilizacije aktivnosti dostiže 40% na CNC i 50% na amino-CNC već nakon 30 min i potom ostaje praktično nepromenjen), dok prinos imobilizacije proteina nastavlja da raste do 90–95% nakon 3 h. To znači da se u kasnijim fazama vezuju dodatni molekuli koji ne doprinose ukupnoj aktivnosti, pa produžavanje imobilizacije preko 30 min povećava količinu vezanog enzima bez proporcionalnog porasta aktivnosti.

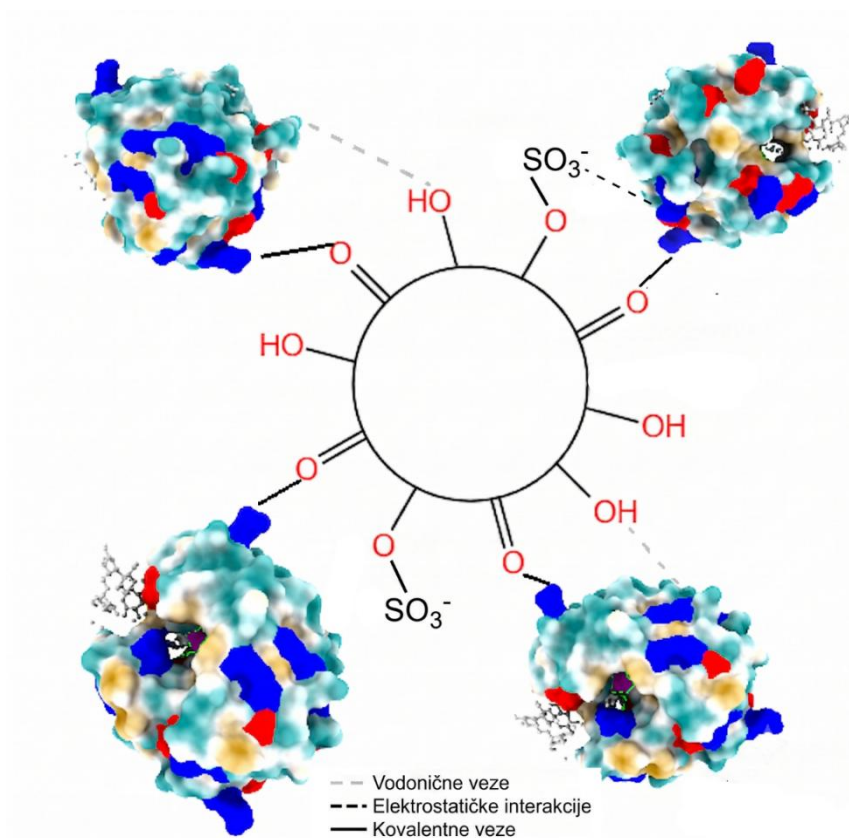
Poređenje dva nosača pokazuje da CNC obezbeđuje veći ukupni kapacitet vezivanja, dok se na amino-CNC dobija preparat više specifične aktivnosti, što ukazuje na to da se na amino-CNC vezuje veći udeo katalitički aktivnih komponenti preparata. Postignute koncentracije imobilisanih proteina na CNC (do 440 mg/g nosača) više su od vrednosti opisanih za funkcionalizovane grafen-oksidge magnetne nanočestice (273 mg/g nosača) [280] i za magnetne nanočestice aktivirane cijanurhloridom (280 mg/g nosača) [276]. Uz uporediv ili veći kapacitet, nanocelulozni nosači se dobijaju iz obnovljivih sirovina, bez metalnih oksida i organskih rastvarača, i imaju povoljniji toksikološki i ekološki profil za primenu u prehrambenoj industriji [27, 276, 280].

Iako adsorpcija na CNC i amino-CNC omogućava visok kapacitet vezivanja i značajnu imobilisanu aktivnost, stabilnost ovih sistema ograničena je reverzibilnom prirodom vezivanja i mogućom desorpcijom enzima prilikom promene uslova procesa (pH, jonska jačina, površinski aktivne supstance). Zbog toga je u nastavku ispitana kovalentna imobilizacija ksilanaze na Ox-CNC i glutaraldehidom aktiviranu amino-CNC, radi dobijanja stabilnijih preparata u kojima je enzim vezan ireverzibilnim kovalentnim vezama, uz što manji gubitak katalitičke aktivnosti.

#### 4.3.1.4 Kovalentna imobilizacija preparata Rohalase® SEP-Visco na oksidovanu nanocelulozu

Nakon detaljne analize imobilizacije ksilanaze adsorpcijom na CNC i amino-CNC, u nastavku rada proučavana je imobilizacija ksilanaze kovalentnim vezivanjem na oksidovane nanočestice celuloze (Ox-CNC). Cilj ovog dela istraživanja je dobijanje stabilnog kovalentno imobilisanog preparata ksilanaze za reakciju hidrolize ksilana i dobijanje XOS, sa što većim prinosom imobilisane aktivnosti i minimalnom mogućnošću desorpcije enzima, što bi činilo ovaj preparat pogodnim za upotrebu u više reakcionih ciklusa. Ox-CNC predstavlja modifikovanu verziju nanoceluloze na čijoj površini se nalaze aldehidne grupe uvedene perjodatnom oksidacijom anhidroglukoznih jedinica, koje omogućavaju direktnu reakciju sa primarnim amino grupama na površini ksilanaze. Kao što je već napomenuto, na taj način formiraju se Šifove baze, odnosno iminske veze između Ox-CNC i enzima, pri čemu u početnoj fazi kontakta i dalje učestvuju vodonične veze i druge slabe interakcije karakteristične za adsorpciju.

Na osnovu literaturno dostupnih podataka o protokolima imobilizacije enzima na nosače sa aldehidnim grupama, kao i prethodno određene vrednosti Zeta-potencijala ovog enzimskog preparata i proučavanjem njegove 3D strukture koja ukazuje na raspodelu lizinskih ostataka pretežno na strani suprotnoj od aktivnog centra, za kovalentnu imobilizaciju na Ox-CNC izabran je Na-karbonatni pufer pH 9,5. Na ovoj pH vrednosti, značajan udeo amino grupa enzima nalazi se u deprotonovanom obliku ( $-NH_2$ ), što omogućava nukleofilni napad na aldehidne grupe nosača i formiranje Šifove baze [18]. Iako pojedinačna iminska veza u vodenom rastvoru podleže reverzibilnoj hidrolizi, stabilnost imobilizacije ostvaruje se kroz „multipoint“ vezivanje enzima preko više lizinskih aminokiselinskih ostataka za susedne aldehidne grupe na površini nosača [18, 281, 282]. Redukcija sa  $NaBH_4$  koja se često koristi je namerno izostavljena kako bi se izbegla potencijalna deaktivacija enzima izazvana redukcionim sredstvom. Mehanizam kovalentnog vezivanja ksilanaze na Ox-CNC šematski je prikazan na šemi 5.

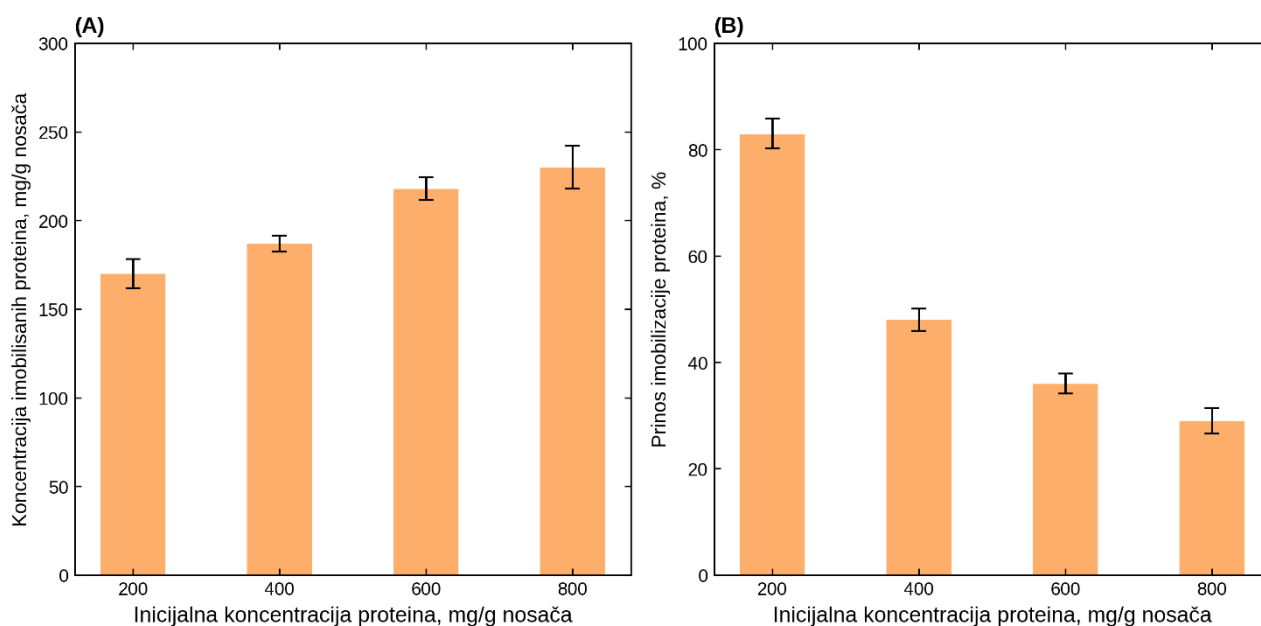


*Šema 5. Šematski prikaz imobilizacije ksilanaze na Ox-CNC*

Šematski prikaz pokazuje da se imobilizacija ksilanaze na Ox-CNC istovremeno odvija formiranjem dva tipa interakcija: kovalentno vezivanje preko Šifovih baza i prateće slabe interakcije sa preostalim hidroksilnim grupama na površini Ox-CNC. U narednim potpoglavljima biće razmatran uticaj početne koncentracije proteina i vremena imobilizacije na efikasnost procesa imobilizacije ksilanaze na Ox-CNC.

#### 4.3.1.4.1 Efikasnost imobilizacije proteina preparata Rohalase® SEP-Visco na Ox-CNC

Pošto kovalentno vezivanje preko Šifovih baza zahteva istovremeno prisustvo dovoljnog broja molekula proteina u rastvoru i raspoloživih aldehydskih grupa na površini Ox-CNC, varirana je početna koncentracija proteina u opsegu 200–800 mg/g nosača pri konstantnoj pH vrednosti i vremenu imobilizacije. Na slici 4.16 prikazane su zavisnosti koncentracije imobilisanih proteina (mg/g nosača) i prinosa imobilizacije proteina (%) od početne koncentracije ksilanaze (mg/g nosača).



*Slika 4.16. Uticaj inicijalne koncentracije proteina na: koncentraciju imobilisanih proteina (A) i prinos imobilizacije proteina (B) prilikom imobilizacije Rohalase® SEP-Visco na Ox-CNC. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina: 200, 400, 600 i 800 mg/g nosača; 0,1 M Na-karbonatni pufer pH 9,5 Ox-CNC; vreme imobilizacije 18 h.*

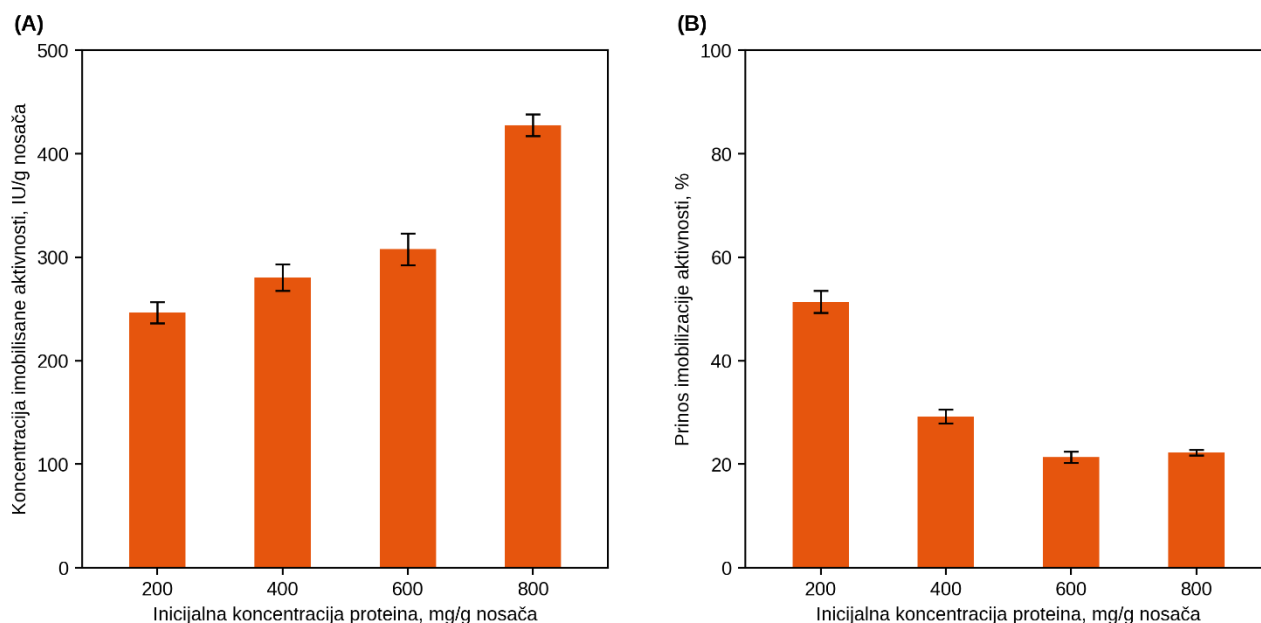
Sa povećanjem početne koncentracije proteina sa 200 na 800 mg/g nosača Ox-CNC, koncentracija imobilisanih proteina kontinuirano raste, od približno 170 mg/g nosača do oko 230 mg/g nosača (Slika 4.16. (A)). Povećanje inicijalne koncentracije ksilanaze omogućava dodatno popunjavanje preostalih slobodnih mesta za vezivanje na površini Ox-CNC, pri čemu se postepeno dostiže zasićenje nosača molekulima enzima sa oko 230 mg/g nosača. Na zasićenje ukazuje i to što porast koncentracije imobilisanih proteina nije proporcionalan porastu početne koncentracije.

Istovremeno, prinos imobilizacije proteina opada sa oko 84% pri početnoj koncentraciji od 200 mg/g nosača na približno 29% pri koncentraciji od 800 mg/g nosača (Slika 4.16. (B)). Na najnižoj početnoj koncentraciji ksilanaze raspoloživa mesta na površini mogu da prime gotovo sve ponuđene molekule enzima, dok pri višim inicijalnim koncentracijama za sve veći deo molekula proteina nema slobodnih mesta za vezivanje, pa oni ostaju u supernatantu nakon završene imobilizacije. Na najvišim početnim koncentracijama (600–800 mg/g nosača) raste i verovatnoća gustog pakovanja i formiranja višeslojnog rasporeda molekula enzima na površini Ox-CNC. Pri tome jedan deo molekula, iako dolazi u kontakt sa površinom nanočestica, ostaje vezan adsorpcijom bilo za sam nosač, bilo za već vezane molekule enzima pri čemu se na osnovu ovih rezultata još uvek ne može razdvojiti udeo molekula vezanih kovalentno (preko aldehidnih grupa nosača) od onih vezanih adsorpcijom, ali ovaj odnos će biti analiziran u nastavku ovog rada.

Zbog toga se, sa stanovišta efikasne primene enzima, kao povoljniji opseg početnih koncentracija za imobilizaciju ksilanaze na Ox-CNC izdvajaju niže i srednje vrednosti, od 200 do 400 mg/g nosača, gde se postiže visok kapacitet vezanih proteina uz relativno visok prinos imobilizacije. To znači da se pri nižim početnim koncentracijama većina ponuđenih molekula proteina vezuje na nosač, dok pri višim koncentracijama sve veći udeo enzima ostaje u rastvoru, usled zasićenja dostupnih površinskih mesta i stvaranja gustog proteinskog sloja.

#### 4.3.1.4.2 Efikasnost imobilizacije aktivnosti preparata Rohalase® SEP-Visco na Ox-CNC

Da bi se utvrdilo kako se promene u koncentraciji imobilisanih proteina pri kovalentnom vezivanju odražavaju na katalitičku efikasnost dobijenog preparata, određena je koncentracija imobilisane aktivnosti i prinos imobilizacije aktivnosti pri konstantnim eksperimentalnim uslovima (Slika 4.17).



*Slika 4.17. Uticaj inicijalne koncentracije proteina na koncentraciju imobilisane aktivnosti (A) i prinos imobilizacije aktivnosti (B) prilikom imobilizacije Rohalase® SEP-Visco na Ox-CNC.*

*Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina: 200, 400, 600 i 800 mg/g nosača; 0,1 M Na-karbonatni pufer pH 9,5 (Ox-CNC); vreme imobilizacije 18 h.*

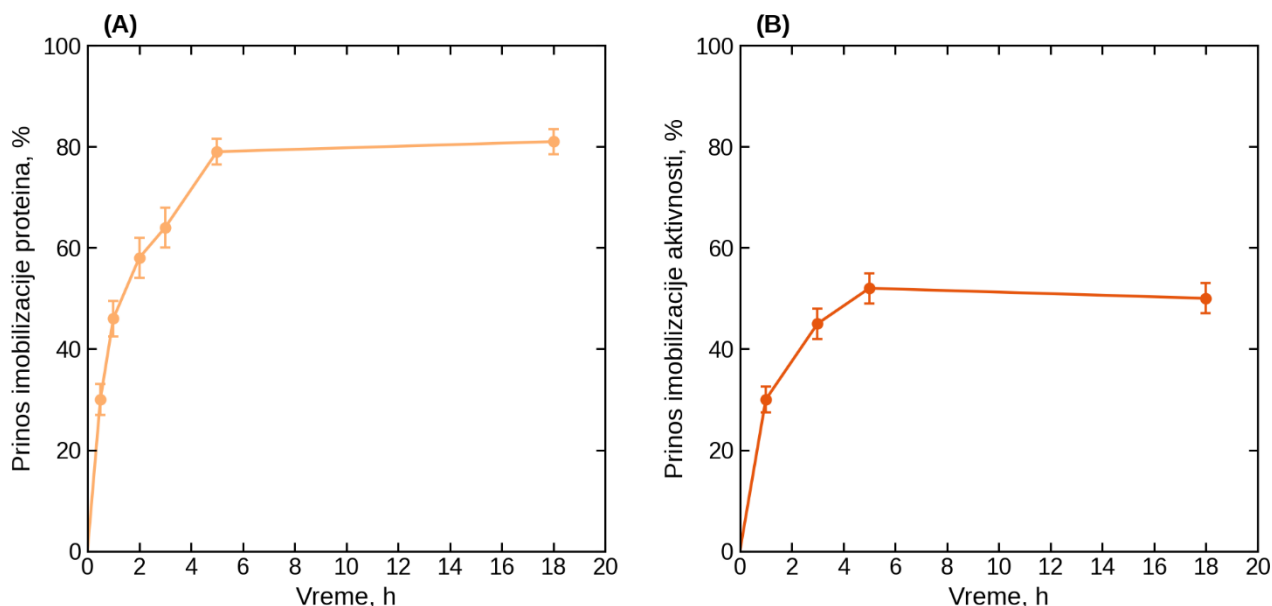
Sa porastom početne koncentracije proteina od 200 do 800 mg/g nosača, koncentracija imobilisane aktivnosti ksilanaze na Ox-CNC raste od oko 245 IU/g nosača pri inicijalnoj koncentraciji proteina od 200 mg/g nosača do približno 425 IU/g nosača pri početnoj koncentraciji od 800 mg/g nosača (Slika 4.17. (A)). Ovaj porast koncentracije imobilisane aktivnosti je nešto izraženiji nego u slučaju koncentracije imobilisanih proteina, što znači da dodatno vezani molekuli proteina iz enzimskog preparata doprinose ukupnoj aktivnosti enzima po gramu Ox-CNC.

Prinos imobilizacije aktivnosti opada sa oko 50% pri najnižoj početnoj koncentraciji (200 mg/g nosača) na 23% pri inicijalnoj koncentraciji od 800 mg/g nosača (Slika 4.17. (B)). Ovakav trend sličan je onome dobijenom za prinos imobilizacije proteina gde sa porastom početne koncentracije sve veći deo ukupno dostupnih molekula enzima na početku imobilizacije ostaje u rastvoru i ne učestvuje u reakciji imobilizacije. Ipak, apsolutna koncentracija imobilisane aktivnosti po jedinici mase Ox-CNC i dalje raste, što pokazuje da je i na višim početnim koncentracijama deo enzima se dodatno veže i katalitički je efikasan, iako ukupan procenat iskorišćenja početno unete aktivnosti opada.

Na osnovu uporedog posmatranja koncentracije imobilisanih proteina i koncentracije imobilisane aktivnosti može se zaključiti da je kovalentnu imobilizaciju ksilanaze na Ox-CNC najpovoljnije raditi pri nižim početnim koncentracijama proteina kao što je 200 mg/g nosača. Na nižim inicijalnim koncentracijama proteina postižu se visoke vrednosti imobilisane aktivnosti uz relativno visok prinos imobilizacije aktivnosti, dok dalji porast početne koncentracije proteina dovodi pre svega do smanjenja efikasnosti iskorišćenja unete aktivnosti slobodne ksilanaze na početku procesa imobilizacije, uz umeren prirast koncentracije imobilisane aktivnosti po gramu nosača.

#### 4.3.1.4.3 Kinetika kovalentne imobilizacije preparata Rohalase® SEP-Visco na Ox-CNC

Vreme imobilizacije je drugi parametar koji utiče na efikasnost kovalentnog vezivanja enzima za nosač koji na površini ima aldehidne grupe: prekratko vreme može značiti da se Šifove baze ne stignu formirati u dovoljnom broju, dok predugo vreme bez praktičnog značaja u pogledu prinosa imobilisane aktivnosti smanjuje efikasnost procesa dobijanja imobilisanog enzimskog preparata. Stoga je pri optimalnoj početnoj koncentraciji od 200 mg/g nosača praćena kinetika prinosa imobilizacije proteina i prinosa imobilizacije aktivnosti tokom 18 h (Slika 4.18).



Slika 4.18. Uticaj vremena imobilizacije na promenu prinosa imobilizacije proteina (A) i prinosa imobilizacije aktivnosti (B) prilikom imobilizacije Rohalase® SEP-Visco na Ox-CNC.

Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina: 200 mg/g nosača; 0,1 M Na-karbonatni pufer pH 9,5 (Ox-CNC); vreme imobilizacije 0-18 h.

Prinos imobilizacije proteina na Ox-CNC brzo raste u prvih nekoliko sati imobilizacije. Već nakon 1 h vezano je oko 40% ukupno ponuđenog proteina, nakon 3 h prinos dostiže približno 70%, a posle 5 h prelazi 80% (Slika 4.18. (A)). Produžavanje vremena imobilizacije sa 5 h na 18 h ne dovodi do zapaženog povećanja prinosa proteina. Prinos imobilizacije aktivnosti ksilanaze na Ox-CNC takođe raste sa vremenom: posle 1 h iznosi oko 30%, nakon 3 h približno 45%, a posle 5 h dostiže 50–52% (Slika 4.18. (B)). Ni ovde produžavanje vremena imobilizacije do 18 h ne dovodi do značajnog daljeg povećanja prinosa aktivnosti, što znači da se najveći deo molekula ksilanaze u katalitički aktivnoj konformaciji veže već u periodu od 3 do 5 h.

Poređenjem promena prinosa proteina i prinosa aktivnosti može se zaključiti da se katalitički aktivni molekuli enzima vezuju u ranijim fazama procesa, dok kasnije preovlađuje vezivanje dodatnih molekula koji u manjoj meri doprinose ukupnoj imobilisanoj aktivnosti. Vreme imobilizacije od 5 h predstavlja dobar kompromis, jer se u tom intervalu postiže visok prinos imobilizacije proteina i gotovo maksimalan prinos imobilisane aktivnosti, dok dalje produžavanje do 18 h donosi samo neznatan porast prinosa proteina bez značajnog povećanja aktivnosti.

#### 4.3.1.4.4 Desorpcija preparata Rohalase® SEP-Visco imobilisanog na Ox-CNC

Visok prinos imobilizacije proteina i aktivnosti dobijen u prethodnim eksperimentima ne govori koliki udeo vezanih molekula enzima je formiralo kovalentne interakcije, a koliki udeo njih je samo adsorbovan na površinu Ox-CNC. Da bi se ova dva doprinosa razdvojila, primenjen je standardni

desorpcioni tretman, kombinacija visoke jonske jačine (1 M  $\text{CaCl}_2$ ) i nejonskog deterdženta (1% (v/v) Triton X-100), koji efikasno dovodi do raskidanja slabih elektrostatičkih i hidrofobnih interakcija, ali ne utiče na uspostavljene kovalentne veze [219, 281].

Tretman desorpcijom je izveden na imobilisanim preparatima dobijenim nakon 3 h i 5 h imobilizacije ksilanaze na Ox-CNC. Nakon tretmana  $\text{CaCl}_2$ /Triton X-100 rastvorom, na preparatu dobijenom posle 3 h imobilizacije detektovano je 63% početno imobilisane aktivnosti. Nakon tretmana ksilanaze imobilisane na Ox-CNC tokom 5 h detektovana je viša rezidualna aktivnost od oko 90%. Ovi rezultati pokazuju da se sa produženjem vremena imobilizacije povećava udeo enzima koji je ireverzibilno kovalentno vezan na Ox-CNC, dok se udeo enzima vezan slabijim elektrostatičkim i hidrofobnim interakcijama smanjuje. Visok udeo rezidualne aktivnosti nakon desorpcije ukazuje da je dominantan mehanizam vezivanja ksilanaze na Ox-CNC kovalentna imobilizacija. Niža rezidualna aktivnost nakon 3 h u odnosu na 5 h imobilizacije takođe ukazuje i da se u ranim fazama procesa na površini nanočestica enzimi vezuju putem adsorpcije, a da se tokom vremena nešto sporije formiraju stabilnije kovalentne interakcije čiji udeo raste do čak 90%.

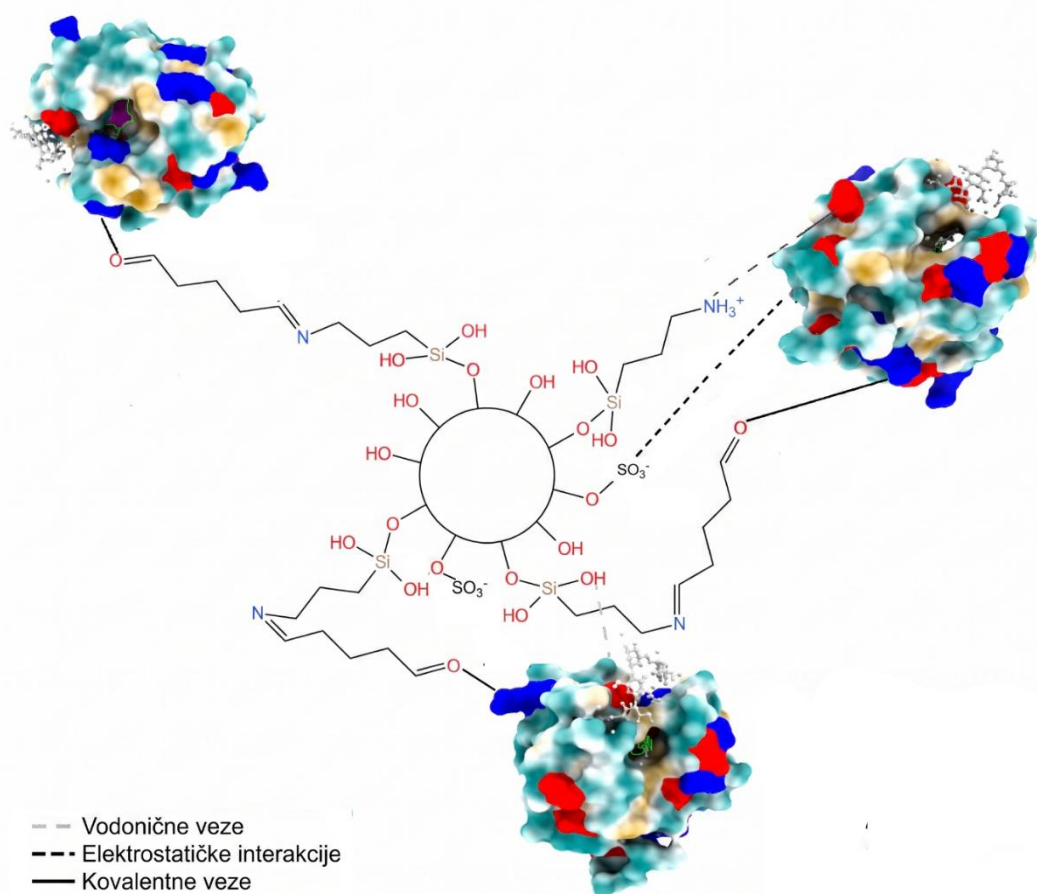
Rezultati ispitivanja efikasnosti imobilizacije proteina i aktivnosti, kao i kinetike procesa, pokazuju da je Ox-CNC efikasan nosač za kovalentnu imobilizaciju ksilanaze u alkalnim uslovima. Sa porastom početne koncentracije proteina rastu koncentracija imobilisanih proteina i imobilisane aktivnosti po gramu nosača, dok prinos imobilizacije proteina i aktivnosti opada, što je očekivano kada je broj reaktivnih mesta na nosaču konačan. Ovakvo ponašanje može se povezati sa gustinom aldehidnih grupa na površini Ox-CNC: postignuti stepen oksidacije od 32% odgovara sadržaju aldehidnih grupa od približno 3,9 mmol/g nosača, budući da potpuna oksidacija jedne glukozne jedinice daje dve aldehidne grupe, što Ox-CNC svrstava među nosače sa visokom gustinom reaktivnih mesta. Ova vrednost je približno četiri puta veća od praga pri kome se, prema literaturi, količina kovalentno vezanog enzima zasićuje sa daljim porastom stepena oksidacije (3,9 naspram približno 1,0 mmol/g nosača, odnosno oko 8 oksidovanih glukoznih jedinica na 100 jedinica glukoze) [278], pa broj aldehidnih grupa u ovom slučaju na površini nije ograničavajući faktor za vezivanje enzima. Drugim rečima, uočeni pad prinosa imobilizacije na višim početnim koncentracijama proteina ne potiče od nedostatka aldehidnih grupa, već od odnosa između količine ponuđenog enzima i dostupne površine nosača: na niskim koncentracijama gotovo svi ponuđeni molekuli pronalaze slobodno reaktivno mesto i prinos je visok, dok na visokim koncentracijama površina postaje prostorno zasićena molekulima enzima, uz pojavu sternih ograničenja, nezavisno od toga što slobodnih aldehidnih grupa još uvek ima [283].

Analiza kinetike imobilizacije pokazuje da se najveći deo katalitički aktivnih molekula vezuje u prvim nekoliko sati, pri čemu vreme imobilizacije od oko 5 h obezbeđuje visok prinos imobilisane aktivnosti uz efikasno iskorišćenje enzima. Desorpcija potvrđuje da veći deo imobilisane aktivnosti potiče od kovalentnog vezivanja ksilanaze na Ox-CNC, posebno kod sistema dobijenih posle dužeg vremena imobilizacije. Na osnovu toga može se zaključiti da je Ox-CNC pogodan nosač za formiranje stabilnih imobilisanih biokatalitičkih sistem ksilanaze sa visokim udelom kovalentno vezane aktivnosti.

#### *4.3.1.5 Kovalentna imobilizacija preparata Rohalase® SEP-Visco na GA-aktiviranu amino-modifikovanu nanocelulozu*

Kovalentna imobilizacija ksilanaze Rohalase® SEP-Visco na glutaraldehidom aktiviranu amino-CNC sprovedena je sa ciljem da se ispita kako uvođenje „mosta“ između enzima i nosača utiče na kapacitet vezivanja, katalitičku aktivnost i udeo ireverzibilno vezanog enzima. Šematski prikaz mehanizma imobilizacije ksilanaze na GA-amino-CNC dat je na šemi 6. GA-amino-CNC nastaje tretiranjem glutaraldehidom amino-CNC nosača, koji je već pokazao potencijal za imobilizaciju ksilanaze adsorpcijom, pri čemu nastaju bifunkcionalni glutaraldehidni mostovi koji omogućavaju

ireverzibilno povezivanje amino grupa prisutnih na površini nosača sa amino grupama aminokiselinskih ostataka enzima.



Šema 6. Šematski prikaz imobilizacije ksilanaze na GA-amino-CNC

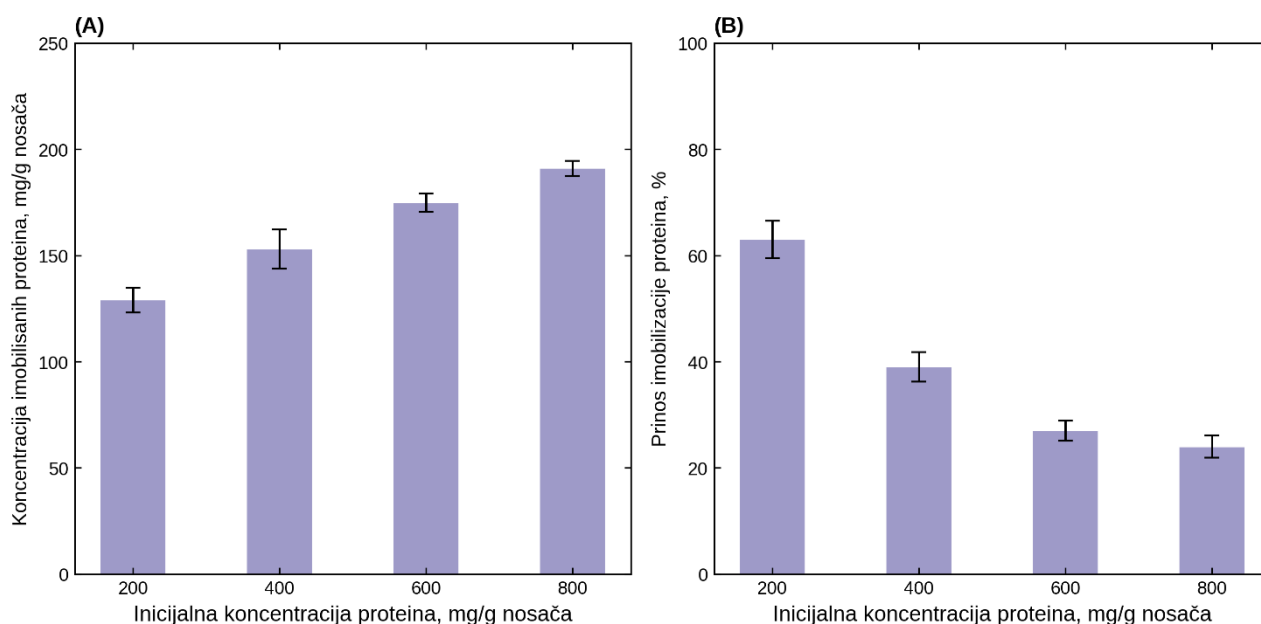
Na površini GA-amino-CNC istovremeno su prisutne slobodne primarne amino grupe (nastale silanizacijom) i glutaraldehidni mostovi sposobni da formiraju kovalentne veze sa amino grupama proteina. Enzim se veže preko mosta koji čini molekul glutaraldehida, tako da je molekul enzima fizički odmaknut od čvrste površine nosača. Ovakav položaj smanjuje direktan uticaj površine na konformaciju proteina i daje veću slobodu prilikom zauzimanja katalitički povoljne konformacije. Istovremeno se ublažava preterano gusto pakovanje enzima na površini i smanjuju sterne smetnje, što olakšava pristup supstrata aktivnim centrima.

Kod Ox-CNC molekuli enzima vezuju se neposredno uz čvrstu površinu, preko kratkih C=N veza koje nastaju direktnom reakcijom aldehidnih grupa nosača sa amino grupama enzima, pa je molekul enzima u bliskoj interakciji sa nosačem. U takvoj situaciji aktivni centar se lako može naći u neposrednoj blizini površine, gde je prostor ograničen, posebno ako je gusto pakovanje molekula enzima, pa se javljaju pojačane sterne smetnje i otežan pristup supstrata aktivnom centru enzima.

#### 4.3.1.5.1 Efikasnost imobilizacije proteina preparata Rohalase® SEP-Visco na GA-amino-CNC

Imobilizacija ksilanaze na GA-amino-CNC izvedena je u 0,1 M Na-fosfatnom puferu pH 7,5, pri čemu je početna koncentracija proteina varirana u opsegu od 200 do 800 mg/g nosača (Slika 4.19.). Vrednost pH 7,5 izabrana je kao kompromis između nekoliko suprotstavljenih kriterijuma da bi proces imobilizacije ksilanaze na glutaraldehidom aktiviran nosač bio uspešan. Generalno prilikom biranja pH za imobilizaciju neophodno je voditi računa da na toj pH enzim zadržava visoku konformacionu stabilnost i katalitičku aktivnost, čime se minimizuje rizik od denaturacije enzima

tokom imobilizacije, što je slučaj sa ksilanazom koja ima pH optimum u blago kiselom pH opsegu [219]. Takođe, na pH vrednosti 7,5 amino grupe lizinskih aminokiselinskih ostataka molekula enzima sa nižim lokalnim pKa nalaze se u dovoljnoj meri u deprotonovanom obliku da omogući nukleofilni napad na karbonilnu grupu molekula glutaraldehida što rezultira formiranjem Šifovih baza [284]. S druge strane iz ugla reaktivnosti amino grupa, činjenica je da na višim pH vrednostima ( $\geq 8,5$ ) reaktivnost amino grupa raste i iz ugla pospešivanja formiranja iminskih veza bilo bi poželjno izvoditi reakciju na višim pH od 8,5. Međutim, na višim pH vrednostima povećava se mogućnost odigravanja neželjenih sporednih reakcija. Naime, aldehidne grupe vezane na površinu nosača mogu da uspostavljaju i nekontrolisano umrežavanje između preostalih amino grupa na površini nosača [219]. Posledica je nehomogena aktivacija nosača i sklonost čestica ka aglomeraciji, čime se smanjuje dostupna površina za vezivanje enzima, ali i negativno utiče na ponovljivost postupka imobilizacije. Iz tih razloga, pH 7,5 izabran je kao kompromis koji obezbeđuje dovoljnu reaktivnost deprotonovanih amino grupa za formiranje Šifovih baza između nosača i molekula enzima, uz nižu verovatnoću odigravanja sporednih reakcija [284].



*Slika 4.19. Uticaj inicijalne koncentracije proteina na: koncentraciju imobilisanih proteina (A) i prinos imobilizacije proteina (B) prilikom imobilizacije Rohalase® SEP-Visco na GA-amino-CNC. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina: 200, 400, 600 i 800 mg/g nosača; 0,1 M Na-fosfatni pufer pH 7,5; vreme imobilizacije 18 h.*

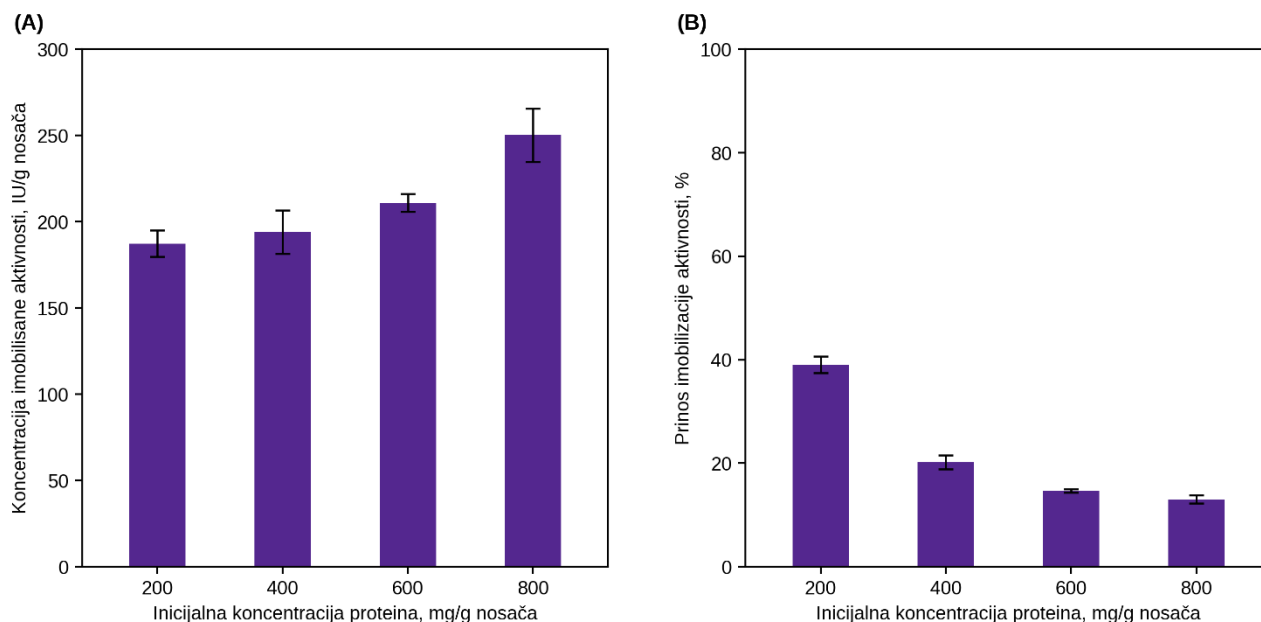
Nakon odabira pH za imobilizaciju ksilanaze na GA-amino-CNC, ispitivan je uticaj početne koncentracije proteina na koncentraciju vezanih proteina. Koncentracija imobilisanih proteina na GA-amino-CNC raste gotovo linearno sa porastom početne koncentracije proteina. Pri početnoj koncentraciji od 200 mg/g nosača vezuje se oko 130 mg proteina po gramu GA-amino-CNC, dok se pri početnoj koncentraciji od 800 mg/g nosača postiže koncentracija imobilisanih proteina od približno 190 mg/g nosača (Slika 4.19. (A)). Trend ukazuje da sa većom dostupnošću proteina raste i stepen imobilizacije na nosač, iako porast nije potpuno linearan, što može ukazivati na postepeno zasićenje dostupnih mesta za vezivanje na nosaču.

Istovremeno, prinos imobilizacije proteina opada sa oko 65% pri početnoj koncentraciji od 200 mg/g nosača na približno 24% pri početnoj koncentraciji od 800 mg/g nosača GA-amino-CNC (Slika 4.19. (B)). Ovakav trend sugerise da na višim koncentracijama proteina nosač postaje zasićen, pa veći udeo proteina ostaje neimobilisan. Takođe, na višim koncentracijama moguća je pojava sternih smetnji i difuzionih efekata koji smanjuju efikasnost vezivanja.

Posmatrano zajedno, rezultati ukazuju da povećanje početne koncentracije proteina omogućava veću apsolutnu količinu imobilisanog enzima, ali uz smanjenje efikasnosti procesa imobilizacije izražene kroz prinos. Za finalni izbor optimalne inicijalne koncentracije proteina u slučaju imobilizacije ksilanaze na GA-amino-CNC nosač potrebno je ispitati i uticaj početne koncentracije proteina na koncentraciju imobilisane aktivnosti.

#### 4.3.1.5.2 Efikasnost imobilizacije aktivnosti preparata Rohalase® SEP-Visco na GA-amino-CNC

Sa ciljem određivanja optimalne početne koncentracije proteina za imobilizaciju ksilanaze na GA-amino-CNC, ispitan je uticaj ovog parametra u opsegu početnih koncentracija od 200 do 800 mg/g nosača na koncentraciju imobilisane aktivnosti i prinos imobilizacije aktivnosti (Slika 4.20.). Kod kovalentne imobilizacije posredovane glutaraldehidnim mostovima izbor početne koncentracije proteina predstavlja važan faktor, jer je poželjno omogućiti višestruko („multi-point“) vezivanje enzima sa nosačem. Takav način vezivanja značajno doprinosi povećanju stabilnosti, a ponekad i katalitičke efikasnosti, ovog tipa nanobiokatalizatora. Međutim, treba imati na umu da previše gusto raspoređeni molekuli enzima na površini nosača mogu ograničiti formiranje višestrukih interakcija između pojedinačnih molekula i nosača. Zbog toga je neophodno uspostaviti optimalan balans između visokog stepena zasićenja nosača proteinom i očuvanja dovoljnog prostora za pravilnu orijentaciju i efikasno višestruko vezivanje svakog imobilisanog molekula enzima.



*Slika 4.20. Uticaj inicijalne koncentracije proteina na koncentraciju imobilisane aktivnosti (A) i prinos imobilizacije aktivnosti (B) prilikom imobilizacije Rohalase® SEP-Visco na GA-amino-CNC. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina: 200, 400, 600 i 800 mg/g nosača; 0,1 M Na-fosfatni pufer pH 7,5; vreme imobilizacije 18 h.*

Sa porastom početne koncentracije proteina od 200 do 800 mg/g nosača, koncentracija imobilisane aktivnosti na GA-amino-CNC raste od približno 185 IU/g nosača pri početnoj koncentraciji proteina od 200 mg/g nosača do oko 250 IU/g nosača pri početnoj koncentraciji od 800 mg/g nosača (Slika 4.20. (A)). Neznatno povećanje imobilisane aktivnosti po gramu nosača od svega 7,5% u opsegu inicijalnih koncentracija proteina od 200-600 mg/g nosača ukazuje da povećanje koncentracije proteina koji su ponuđeni na početku procesa imobilizacije nema značajan uticaj na imobilisanu aktivnost. Jedino je značajniji skok od 50 IU/g nosača uočljiv pri inicijalnoj koncentraciji proteina od 800 mg/g nosača u odnosu na 600 mg/g nosača. Međutim, i ovaj porast koncentracije imobilisane aktivnosti nije proporcionalan povećanju početne koncentracije proteina. Naime, povećanje početne koncentracije četiri puta (sa 200 na 800 mg/g nosača) prati porast imobilisane aktivnosti od svega

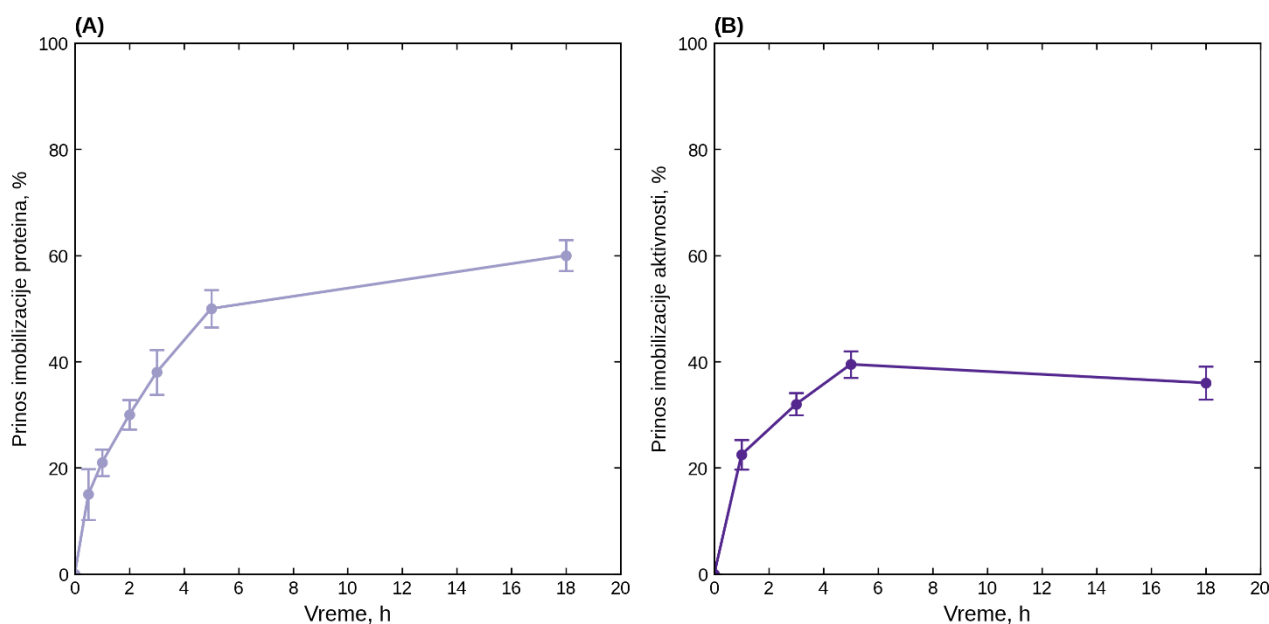
oko 35%, što ukazuje na progresivno manje efikasnu imobilizaciju molekula enzima i iz ugla imobilizacije proteina (Slika 4.19) i aktivnosti (slika 4.20) sa povećanjem inicijalne koncentracije proteina.

Prinos imobilisane aktivnosti opada sa približno 39% pri početnoj koncentraciji od 200 mg/g nosača na oko 13% pri početnoj koncentraciji od 800 mg/g nosača (Slika 4.20. (B)). Ovakav pad prinosa aktivnosti ukazuje na to da pri većim početnim koncentracijama raste udeo molekula čija je orijentacija na površini ili dostupnost aktivnog centra ograničena susednim vezanim molekulima, zbog čega ukupna katalitička aktivnost ne raste srazmerno broju vezanih molekula [273, 285, 286].

Imajući u vidu i kapacitet vezivanja i prinos imobilizacije aktivnosti, kao i efikasnu potrošnju enzima, početna koncentracija proteina od 200 mg/g nosača izdvojena je kao najpovoljnija za dalje eksperimente, jer obezbeđuje najviši prinos imobilizacije aktivnosti uz zadovoljavajuću koncentraciju imobilisane aktivnosti na GA-amino-CNC.

#### 4.3.1.5.3 Kinetika imobilizacije preparata Rohalase® SEP-Visco na GA-amino-CNC

Pošto reakcija formiranja Šifovih baza preko glutaraldehidnog mosta se odigrava nešto sporije, tj. za razliku od adsorpcije koja se odigrava veoma brzo (najčešće za 30 min do 1 h), da bi se kovalentne veze efikasno uspostavile potrebno je više vremena, kinetika imobilizacije ksilanaze na GA-amino-CNC praćena je tokom 18 h pri optimalnoj početnoj koncentraciji proteina (200 mg/g nosača) u 0,1 M Na-fosfatnom puferu pH 7,5. Na slici 4.21 prikazane su zavisnosti prinosa imobilizacije proteina i prinosa imobilizacije aktivnosti od vremena.



*Slika 4.21. Uticaj vremena imobilizacije na promenu prinosa imobilizacije proteina (A) i prinosa imobilizacije aktivnosti (B) prilikom imobilizacije Rohalase® SEP-Visco na GA-amino-CNC.*

*Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina: 200 mg/g nosača; 0,1 M Na-fosfatni pufer pH 7,5; vreme imobilizacije 0-18 h.*

Prinos imobilizacije proteina na GA-amino-CNC u prvih nekoliko sati imobilizacije kontinuirano raste (Slika 4.21. (A)). Najveća brzina vezivanja ostvaruje se u prvih 30 min, kada se veže oko 12% ponuđenog proteina, što je najveći prirast prinosa po jedinici vremena u celom eksperimentu. Do 2 h prinos dostiže približno 38%, posle 3 h oko 42%, a nakon 5 h približno 52%. Produžavanje vremena imobilizacije do 18 h dovodi do daljeg, ali sporijeg porasta, tako da prinos doseže oko 61%. Ovakav tok ukazuje na to da se vezivanje na GA-amino-CNC odvija postepeno tokom celog ispitivanog

intervala, ali sa progresivno manjom brzinom, pa se najveći deo ukupno vezanog enzima akumulira do 5. sata.

Prinos imobilisane aktivnosti na GA-amino-CNC raste do 5 h imobilizacije nakon čega blago opada (Slika 4.21. (B)). Posle 1 h prinos aktivnosti iznosi oko 21%, zatim se povećava na 33% nakon 3 h i 39% nakon 5 h, dok posle 18 h iznosi približno 36%. Ova vrednost je u skladu sa prinosom od oko 39%, dobijenim u seriji sa različitim početnim koncentracijama proteina pri istoj početnoj koncentraciji od 200 mg/g nosača i istom vremenu imobilizacije od 18 h (Slika 4.20. (B)), što potvrđuje ponovljivost oba eksperimenta. Ovaj profil ukazuje da se funkcionalno najefikasniji sloj imobilisane ksilanaze formira u prvim nekoliko sati, pre svega u periodu od 3 do 5 h, dok kasnije preovlađuje vezivanje dodatnih molekula čija katalitička aktivnost nije u potpunosti očuvana ili su vezani u prostorno nepovoljnijim orijentacijama.

Posmatrano iz ugla praktične primene, vreme imobilizacije od 3 do 5 h može se smatrati najpovoljnijim za GA-amino-CNC. U tom intervalu postiže se kombinacija solidnog prinosa imobilisanih proteina i maksimalnog prinosa imobilisane aktivnosti, dok produžavanje procesa do 18 h dovodi pre svega do blagog povećanja prinosa proteina, ali ne i do daljeg poboljšanja katalitičke efikasnosti imobilisanog sistema.

#### 4.3.1.5.4 Desorpcija preparata Rohalase® SEP-Visco imobilisanog na GA-amino-CNC

Kao i u slučaju imobilizacije ksilanaze na Ox-CNC i u slučaju GA-amino-CNC, desorpcija, nakon završetka imobilizacije tretman 1 M CaCl<sub>2</sub> i nejonskim deterdžentom Triton X-100, je izvedena sa ciljem da se odredi udeo katalitički aktivne ksilanaze koja je ireverzibilno kovalentno vezana na GA-amino-CNC, u odnosu na adsorbovan enzim. Tretirani su imobilisani preparati koji su dobijeni imobilizacijom ksilanaze na GA-amino-CNC nakon 3 h i 5 h primenom optimalnih uslova (inicijalna koncentracija od 200 mg/g nosača, 0,1 M Na-fosfatni pufer pH 7,5). Za imobilisani preparat dobijen nakon 3 h imobilizacije na GA-amino-CNC, posle desorpcije zadržano je približno 50% početno imobilisane aktivnosti. Ovaj rezultat pokazuje da se već u prvoj fazi imobilizacije formira značajan udeo kovalentnih veza između molekula enzima i nosača, dok preostali deo aktivnosti potiče od reverzibilno adsorbovane ksilanaze. Kod sistema dobijenog nakon 5 h imobilizacije, rezidualna aktivnost nakon desorpcije iznosi oko 78% početne imobilisane aktivnosti. Povećanje udela rezidualne aktivnosti sa 50% na 78% ukazuje da se tokom produženja vremena imobilizacije deo adsorbovanih molekula je formirao kovalentne veze sa nosačem posredstvom glutaraldehidnih mostova.

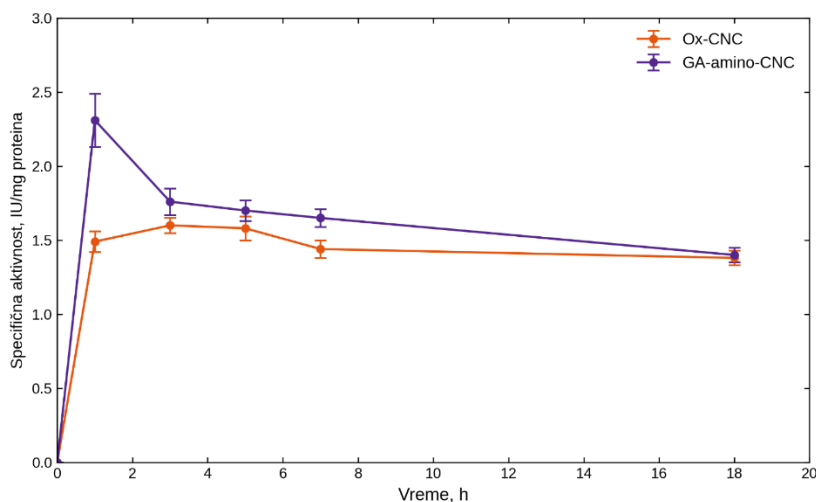
Desorpcija pokazuje dvofazni mehanizam imobilizacije ksilanaze na GA-amino-CNC: brzu reverzibilnu adsorpciju (50% kovalentno imobilisane aktivnosti nakon 3 h) i sporije kovalentno vezivanje (78% nakon 5 h). Glutaraldehidni most omogućava postepenu reorijentaciju adsorbovanih molekula i formiranje kovalentnih veza, čime se adsorbovani molekuli prevode u stabilno, ireverzibilno vezano stanje.

#### 4.3.1.6 Uporedna analiza kovalentne imobilizacije preparata Rohalase® SEP-Visco na Ox-CNC i GA-amino-CNC

Ksilanaza imobilisana na Ox-CNC u celom ispitivanom opsegu početnih koncentracija proteina dostiže više vrednosti i koncentracije imobilisanih proteina i imobilisane aktivnosti nego na GA-amino-CNC. Kao optimalan opseg za oba nosača izdvaja se početna koncentracija od 200–400 mg proteina po gramu nosača, u kome se postiže najbolji kompromis između visokog udela vezanog enzima i očuvane aktivnosti. Na višim koncentracijama dolazi do nagomilavanja molekula proteina i ne detektuje se značajan porast aktivnosti usled sternih smetnji i ograničenog pristupa supstrata aktivnom centru [279]. Glavna razlika koju je prvenstveno potrebno izdvojiti, pri imobilizaciji preparata ksilanaze na ova dva nosača, jeste ukupna koncentracija imobilisane aktivnosti koja je kod

imobilizacije na Ox-CNC za 75% viša nego prilikom imobilizacije na GA-amino-CNC, i iznosi 247 IU/g nosača [287].

Međutim, kako bi ova analiza bila potpuna, potrebno je uporediti i specifične aktivnosti imobilisanih preparata, i ona je predstavljena u toku vremena imobilizacije (Slika 4.22). Ovaj parametar razdvaja doprinos količine vezanog enzima od doprinosa katalitičke efikasnosti pojedinačnih molekula.



*Slika 4.22. Promena specifične aktivnosti kovalentno imobilisane Rohalase® SEP-Visco na Ox-CNC i GA-amino-CNC u zavisnosti od vremena imobilizacije. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 200 mg/g nosača; Ox-CNC – 0,1 M Na-karbonatni pufer pH 9,5; GA-amino-CNC – 0,1 M Na-fosfatni pufer pH 7,5; vreme imobilizacije 0–18 h.*

Prilikom imobilizacije na Ox-CNC specifična aktivnost enzima ostaje praktično konstantna tokom celog procesa imobilizacije (1,4–1,6 IU/mg proteina), što znači da dodatno vezivanje enzima ne dovodi do vezivanja katalitički neaktivnih molekula. Nasuprot tome, specifična aktivnost enzima imobilisanog na GA-amino-CNC je u prvom satu visoka (2,2 IU/mg proteina), ali potom opada: molekuli vezani na početku zadržavaju povoljnu orijentaciju aktivnog centra, dok kasnije vezivanje na sve popunjenijoj površini daje veći udeo katalitički nepovoljno orijentisanih, odnosno u nepovoljnoj konformaciji vezanih molekula.

Desorpcioni eksperiment (jednočasovni tretman rastvorom visoke jonske jačine i nejonskim deterdžentom) potvrđuje dvofazni mehanizam vezivanja na oba nosača: brzu reverzibilnu adsorpciju kao prvi korak, praćenu sporijim formiranjem stabilnih kovalentnih veza. Kod enzima imobilisanog na Ox-CNC udeo kovalentno vezane aktivnosti raste sa oko 63% nakon 1 h na preko 90% nakon 5 h, dok kod enzima imobilisanog na GA-amino-CNC raste sa 50% na oko 78%. Udeo adsorbovanih molekula prevedenih u kovalentno vezan oblik time je znatno viši na Ox-CNC, što je u skladu sa njegovim višim prinosima aktivnosti i bržom kinetikom.

Ova razlika u performansama posledica je pre svega različitih pH vrednosti imobilizacije. Formiranje iminskih veza zahteva deprotonovane amino grupe lizinskih ostataka enzima. Za slobodan lizin pKa iznosi oko 10,5. U proteinu lizinski ostaci izloženi rastvaraču zadržavaju vrednost blisku toj, dok se kod ostataka smeštenih u manje polarnom okruženju ili u blizini pozitivno naelektrisanih grupa pKa najčešće pomera naniže, pa je udeo deprotonovanih grupa na datoj pH vrednosti raspodeljen u širem opsegu [269]. Vrednost od 10,5 se stoga u nastavku koristi samo kao orijentaciona. Uz orijentacionu vrednost od 10,5, na pH 7,5, korišćenom za GA-amino-CNC, deprotonovano je manje od 1% lizinskih ostataka, dok na pH 9,5, korišćenom za Ox-CNC, taj udeo raste na oko 9%, čime se povećavaju reaktivnost amino grupa i broj formiranih kovalentnih veza [219, 284]. Niži pH za imobilizaciju na GA-amino-CNC nije proizvoljan izbor, već je neophodan da bi se izbeglo neželjeno umrežavanje i aglomeracija amino-CNC čestica glutaraldehidom, ali po cenu smanjene efikasnosti

kovalentnog vezivanja [219]. Dužina glutaraldehidnog mosta, koja se često navodi kao prednost ovakvih nosača, u slučaju ksilanaze nije dovela do veće aktivnosti imobilisanog preparata. Treba imati u vidu da je aktivnost ovde određena prema rastvornom supstratu male molekulske mase, kod koga sterne smetnje na površini nosača nisu izražene, pa se eventualna prednost prostornog udaljavanja enzima od površine može ispoljiti tek pri hidrolizi ksilana, što je ispitano u poglavlju o primeni [281].

Ovakvi rezultati u skladu su sa prethodnim istraživanjima. Na glioksal-agarozu, nosaču na kome se direktno formiraju veze sa enzimom preko aldehidnih prisutnih na površini nosača (analognom Ox-CNC), prinos aktivnosti je uporediv ili viši nego na amino-nosačima aktiviranim glutaraldehidom, što se pripisuje odsustvu jonskih interakcija koje na amino-nosačima mogu uticati na nepovoljnu konformaciju enzima [282]. Isto tako, kod magnetnih grafenskih nanočestica sa polietilenglikol-bisaminskim mostom (analognim glutaraldehidnom mostu) specifična aktivnost opada sa porastom početne koncentracije enzima [280]. Na osnovu dobijenih rezultata, vreme imobilizacije od 5 h odabrano je kao optimalno za primenu na Ox-CNC, jer obezbeđuje visok udeo kovalentno vezanog enzima (oko 90%) uz maksimalnu imobilisanu aktivnost.

Specifične aktivnosti kovalentno imobilisanih preparata ksilanaze na dva nosača su bliske. Kada se uz njih uzme u obzir i apsolutna imobilisana aktivnost, Ox-CNC se izdvaja kao efikasniji nosač: aldehidne grupe ugrađene u celulozni lanac i povoljnija pH vrednost imobilizacije omogućavaju viši kapacitet vezivanja, viši prinos imobilizacije aktivnosti (51% naspram 39%), stabilnu specifičnu aktivnost i veći udeo enzima zadržanog nakon desorpcije.

#### 4.3.1.7 Poređenje imobilizacije adsorpcijom i kovalentne imobilizacije preparata Rohalase® SEP-Visco na nanocelulozne nosače

Imobilizacija ksilanaze Rohalase® SEP-Visco ispitana je na četiri funkcionalizovana nanocelulozna nosača: CNC i amino-CNC kao nosači za adsorpciju, i Ox-CNC i GA-amino-CNC kao nosači za kovalentnu imobilizaciju. Uporedni pregled ključnih parametara imobilizacije korišćenjem optimalnih uslova za svaki sistem prikazan je u tabeli 4.2.

*Tabela 4.2. Poređenje parametara imobilizacije ksilanaze na CNC, amino-CNC, Ox-CNC i GA-amino-CNC pri optimalnim uslovima za svaki nosač (početna koncentracija proteina 200 mg/g nosača; CNC pH 5, 1 h; amino-CNC pH 4, 1 h; Ox-CNC pH 9,5, 5 h; GA-amino-CNC pH 7,5, 5 h).*

| Nosač        | Koncentracija imobilisanih proteina (mg/g nosača) | Prinos imobilizacije proteina (%) | Koncentracija imobilisane aktivnosti (IU/g nosača) | Prinos imobilizacije aktivnosti (%) | Specifična aktivnost (IU/mg proteina) |
|--------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| CNC          | 161                                               | 77                                | 153                                                | 32                                  | 0,91                                  |
| amino-CNC    | 156                                               | 76                                | 236                                                | 49                                  | 1,54                                  |
| Ox-CNC       | 171                                               | 84                                | 247                                                | 51                                  | 1,47                                  |
| GA-amino-CNC | 128                                               | 64                                | 187                                                | 39                                  | 1,40                                  |

Sva četiri sistema postižu uporedive koncentracije imobilisanih proteina (128–171 mg/g nosača), dok se po katalitičkim svojstvima jasno razlikuju. Najinformativniji pokazatelj je specifična aktivnost (IU/mg proteina), jer opisuje očuvanu katalitičku efikasnost enzima nezavisno od količine vezanog proteina. U odnosu na slobodni enzim (2,4 IU/mg proteina), ksilanaza je zadržala oko 38% specifične aktivnosti na CNC, 58% na GA-amino-CNC, 61% na Ox-CNC i 64% na amino-CNC. Znatno niža vrednost na nemodifikovanim CNC ukazuje da značajan deo enzima zauzima konformacije u kojima aktivni centar nije lako dostupan supstratu, dok se na preostala tri nosača postižu međusobno bliske, više vrednosti zahvaljujući povoljnijoj orijentaciji enzima na nosaču. Može se pretpostaviti da je to posledica povoljnog položaja lizinskih ostataka koji se nalaze pre svega na suprotnoj strani od

aktivnog centra, zbog čega kovalentno vezivanje na Ox-CNC i GA-amino-CNC ne ometa pristup supstrata aktivnom centru.

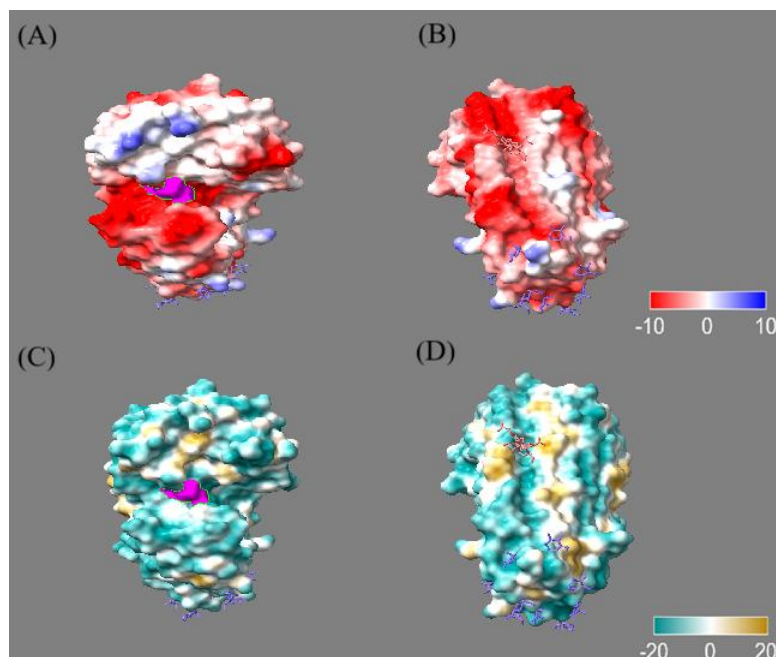
Iako ksilanaza imobilisana na amino-CNC ostvaruje najvišu specifičnu aktivnost (1,54 IU/mg proteina, 64% slobodnog enzima), enzim je na njega vezan adsorpcijom, pa je podložan desorpciji prilikom promene jonske jačine, pH ili u prisustvu surfaktanata [273]. Nasuprot tome, enzim imobilisan na Ox-CNC zadržava više od 90% aktivnosti nakon desorpcionog tretmana, uz specifičnu aktivnost (1,47 IU/mg proteina) tek neznatno nižu od amino-CNC. Zbog toga je Ox-CNC odabran kao optimalan nosač za dalju primenu: u procesima sa višekratnim ciklusima ili tamo gde je kontaminacija proizvoda enzimom neprihvatljiva, stabilnost kovalentnog vezivanja važniji je kriterijum od marginalne razlike u specifičnoj aktivnosti. Ox-CNC je povoljniji izbor za imobilizaciju ksilanaze i u odnosu na GA-amino-CNC jer imobilisani enzim zadržava viši udeo kovalentno vezanog enzima (90% naspram 78%) uz jednostavniju pripremu nosača.

Postignute vrednosti za kovalentno imobilisanu ksilanazu na Ox-CNC (247 IU/g nosača i 1,47 IU/mg proteina) slične su ili više od literaturno opisanih za alternativne nanostrukturne nosače. Postignuta je koncentracija imobilisane aktivnosti 168 IU/g nosača za magnetne nanočestice obložene hiperrazgranatim poliglicerolom [275] i 112–189 IU/g nosača za funkcionalizovane magnetne nanočestice [280], dok su niže vrednosti specifične aktivnosti postignute prilikom imobilizacije  $\beta$ -ksilanaze na hitozanu aktiviranom glutaraldehidom, analognom GA-amino-CNC sistemu [288]. Ova prednost može se pripisati visokoj specifičnoj površini nanoceluloze, povoljnijoj orijentaciji enzima prilikom imobilizacije i nižim difuzionim ograničenjima.

#### 4.3.2 Imobilizacija enzimskog preparata Pectinex® Ultra SP-L na nanocelulozne nosače

Pectinex® Ultra SP-L je komercijalni višekomponentni enzimski preparat visoke pektinolititičke aktivnosti, dobijen mikrobnom fermentacijom plesni *Aspergillus aculeatus*, kod koga preovlađuje endopoligalakturonazna aktivnost (EC 3.2.1.15), ali se mogu detektovati i neki drugi pektinolititički enzimi kao što su pektin-metil-esteraza, pektin-liaza ali i manje količine hemicelulaza [289, 290]. Prema tehničkoj dokumentaciji proizvođača, preparat je stabilan u kiselom pH opsegu 2,8–6,5 i na temperaturama 15–55 °C, što ga čini pogodnim za primenu u procesima prerade voća i povrća, naročito u bistrenju i depektinizaciji sokova, kao i u enološkim i drugim prehrambenim tehnologijama u kojima se zahteva efikasna razgradnja pektina [290]. Dominantna komponenta preparata, endopoligalakturonaza iz *A. aculeatus*, čija je kristalna struktura deponovana u „Protein Data Bank“ pod pristupnim kodom 1IA5 [216], predstavlja glikoprotein molekulske mase približno 42 kDa [291].

Da bi se sagledali raspored aktivnog centra i raspodela površinskih svojstava endopoligalakturonaze koji direktno utiču na njenu interakciju sa nanocelulozom, urađen je prikaz trodimenzionalne strukture endopoligalakturonaze (Slika 4.23.). Prikazani su raspored pozitivno i negativno naelektrisanih grupa (Slika 4.23. (A) i (B)) i polarnih/nepolarnih regija (Slika 4.23. (C) i (D)) na površini molekula.



Slika 4.23. Trodimenzionalna struktura molekula endopoligalakturonaze iz *Aspergillus aculeatus* (PDB kod 1IA5) [216] sa prikazom aktivnog centra i raspodele površinskog naelektrisanja i polarnih/nepolarnih regija. Prednja strana molekula endopoligalakturonaze gde se vidi aktivni centar obojen u magenta, negativno naelektrisanje molekula obojeno u crveno, a pozitivno naelektrisanje u plavo (A); Rotacija molekula endopoligalakturonaze za  $180^\circ$  u x-y ravni, negativno naelektrisanje molekula obojeno u crveno, pozitivno u plavo (B); Prednja strana molekula endopoligalakturonaze gde se vidi aktivni centar obojen u magenta, polarne regije molekula obojene u svetlo plavo, nepolarne u žuto (C); Rotacija molekula endopoligalakturonaze za  $180^\circ$  u x-y ravni, polarne regije molekula obojene u svetlo plavo, nepolarne u žuto (D).

Na slikama 4.23. (A) i (C) se može videti dugačak žleb na površini  $\beta$ -heliksa, u kojem se nalazi aktivni centar enzima, kao i raspodela površinskog naelektrisanja i polarnih odnosno nepolarnih regija koji mogu učestvovati u različitim interakcijama enzima sa čvrstim nosačima. Na slikama 4.23. (A) i (B) prikazana je raspodela elektrostatičkog potencijala na površini enzima pri čemu su negativno naelektrisane grupe obojene crveno, a pozitivno naelektrisane grupe plavo, dok na slikama 4.23. (C) i (D) se vidi raspodela polarnih (plavo) i nepolarnih (žuto) regija na površini molekula. Ovakva raspodela funkcionalnih grupa potvrđuje da je okolina aktivnog centra pretežno negativno naelektrisana i polarna, što pogoduje vezivanju pozitivno naelektrisanih i protonovanih grupa supstrata, dok se potencijalne kontaktne zone za imobilizaciju na čvrstim nosačima nalaze na suprotnoj strani molekula, gde su raspoređeni pozitivno naelektrisani i delimično hidrofobne regije pogodne za uspostavljanje elektrostatičkih, vodoničnih i hidrofobnih interakcija sa površinom CNC, amino-CNC, Ox-CNC i GA-amino-CNC.

Izoelektrična tačka endopoligalakturonaza iz različitih sojeva roda *Aspergillus* nalazi se u relativno širokom opsegu pH od 3,55 do 6,1, u zavisnosti od vrste i izoforme enzima [292-294]. Teorijska vrednost pI za sekvencu enzima čija je struktura deponovana pod PDB oznakom 1IA5 izračunata je pomoću „ProtParam“ alata i iznosi 4,70 [295]. Ovako niske vrednosti izoelektrične tačke ukazuju da je površina endopoligalakturonaze pri eksperimentalno primenjenim pH vrednostima za imobilizaciju (pH 4–7) pretežno negativno naelektrisana ili neutralna, što je od ključnog značaja za razumevanje mehanizma adsorpcije na nosače različitih površinskih svojstava i za racionalan izbor uslova pH na kojima se ostvaruje povoljan odnos između elektrostatičkih interakcija, vodoničnih veza i hidrofobnih interakcija između enzima i nosača.

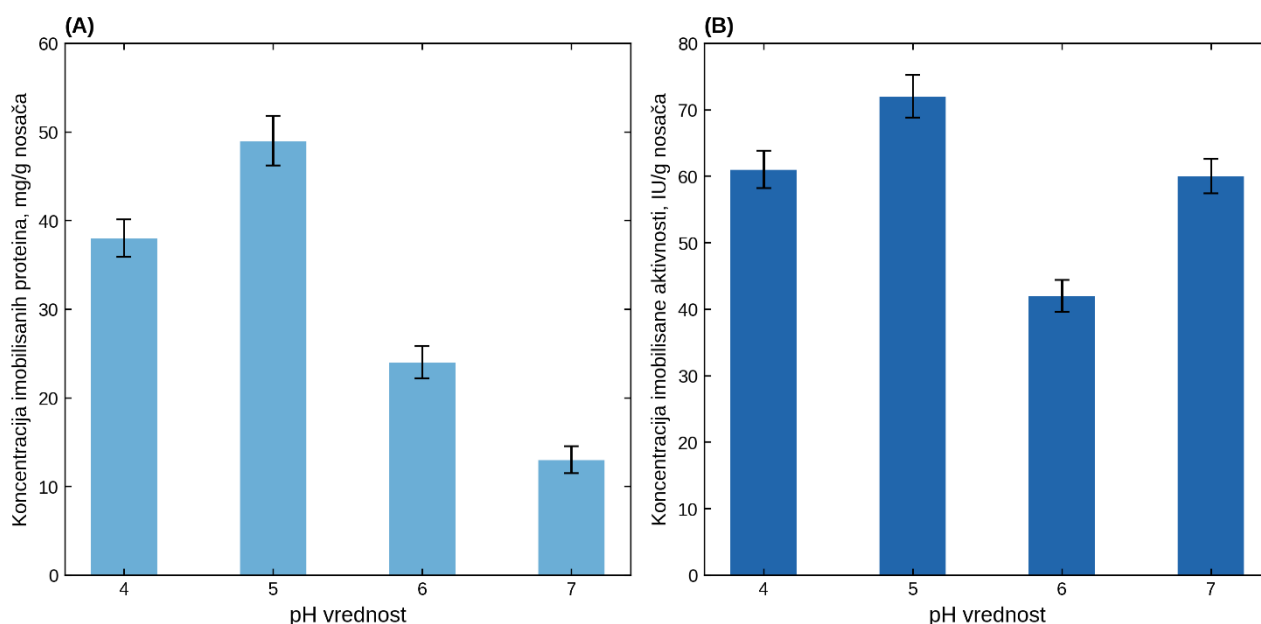
#### 4.3.2.1 Imobilizacija preparata Pectinex® Ultra SP-L adsorpcijom na nemodifikovanu nanocelulozu

Imobilizacija enzimskog preparata na nemodifikovanu nanocelulozu (CNC) sprovedena je adsorpcijom, sa ciljem da se ispita CNC kao nosač za imobilizaciju i da doprinese razumevanju dominantnih mehanizma interakcije između pektinolitičkih enzima, a pre svega endopoligalakturonaze i površine nanoceluloze. CNC nosač dobijen kiselinskom hidrolizom mikrokristalne celuloze sumpornom kiselinom odlikuje se visokom specifičnom površinom i prisustvom hidroksilnih grupa, hidrofilnih i hidrofobnih regija i negativno naelektrisanih sulfatnih poluestarskih grupa ( $-\text{OSO}_3^-$ ) na površini. Adsorpcija enzima na CNC može se posmatrati kao rezultat kombinovanog delovanja vodoničnih veza između polarnih ostataka na površini enzima i  $-\text{OH}$  grupa nanoceluloze, hidrofobnih interakcija između nepolarnih regija proteina i kristalnih ravni celuloze, kao i privlačnih elektrostatičkih interakcija između negativno naelektrisanih sulfatnih grupa CNC i naelektrisane površine enzima. Glavni tipovi interakcija koje se uspostavljaju između endopoligalakturonaze i CNC nosača analogni su interakcijama prikazanim na šemi 3 (vezivanje više molekula enzima preko kombinacije vodoničnih i elektrostatičkih interakcija na površini nanoceluloze), s obzirom na veoma mali udeo hidrofobnih regija i na površini molekula enzima i na nosaču.

U narednom delu disertacije biće ispitani parametri imobilizacije kao što su početna koncentracija enzima i kinetika imobilizacije endopoligalakturonaze na CNC. Aktivnost enzima, izražena u IU, određena je pomoću DNS metode, koristeći pektin iz jabuke kao supstrat. Stoga ova vrednost odražava samo aktivnost enzima koji razgrađuju pektin do redukujućih šećera, dok aktivnosti enzima koji deluju na druge supstrate ili daju strukturno drugačije proizvode nisu detektovane ovom metodom.

##### 4.3.2.1.1 Uticaj pH vrednosti na efikasnost imobilizacije preparata Pectinex® Ultra SP-L adsorpcijom na CNC

Uticaj pH vrednosti pufera na adsorpciju enzimskog preparata Pectinex® Ultra SP-L na CNC nosač ispitan je sa fiksnom početnom koncentracijom proteina od 100 mg/g nosača i vremenom imobilizacije od 0,5 h, u uslovima različitih pH: 0,1 M Na-acetatnom puferu za pH 4 i 5, odnosno 0,1 M Na-fosfatnom puferu za pH 6 i 7. Dobijeni rezultati prikazani su na slici 4.24.



*Slika 4.24. Uticaj pH vrednosti na: koncentraciju imobilisanih proteina (A) i koncentraciju imobilisane pektinolitičke aktivnosti (B) prilikom imobilizacije Pectinex® Ultra SP-L na CNC nosaču. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 100 mg/g nosača; 0,1 M Na-acetatni pufer pH 4 i 5 i 0,1 M Na-fosfatni pufer pH 6 i 7; vreme imobilizacije 0,5 h.*

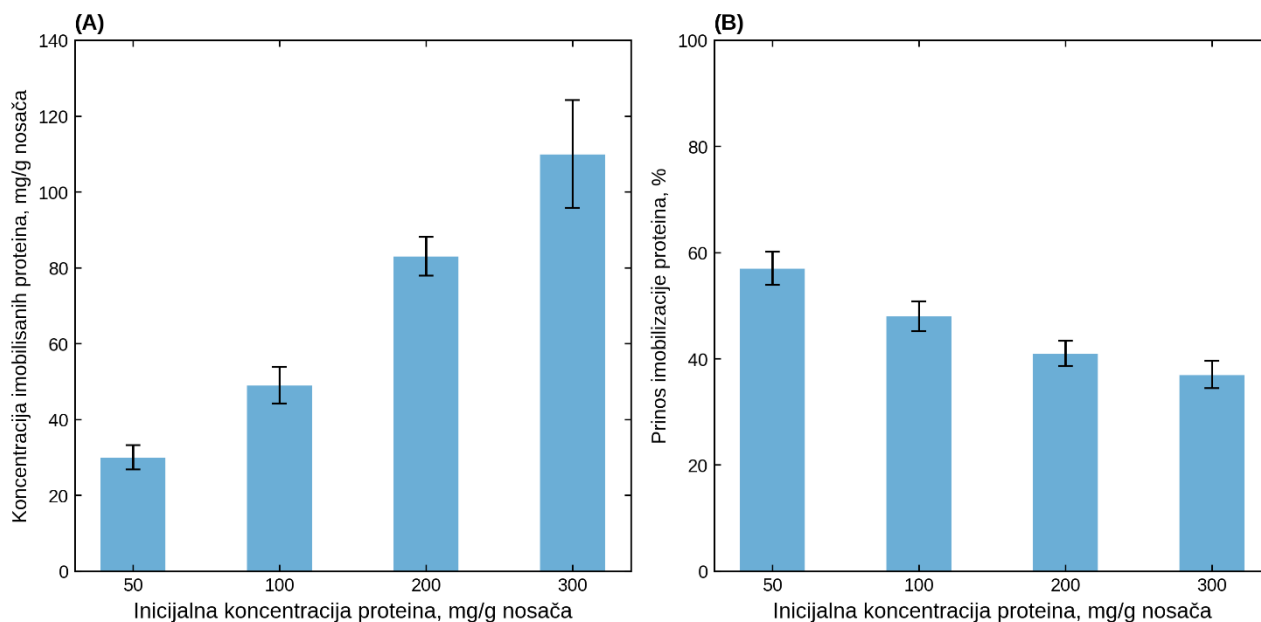
Maksimalna koncentracija imobilisanih proteina od približno 49 mg/g nosača postignuta je na pH 5, dok su na pH 4, 6 i 7 zabeležene niže vrednosti, u opsegu od oko 24–38 mg/g nosača (Slika 4.24. (A)). Ovakav profil se može objasniti uvidom u izoelektričnu tačku dominantno prisutnog enzima u preparatu, endopoligalakturonaze ( $pI = 4,70$ ). Na pH vrednostima bliskim  $pI$  neto naelektrisanje enzima teži nuli, što minimizuje elektrostatičko odbijanje prema negativno naelektrisanim sulfatnim grupama na površini CNC i pogoduje efikasnoj adsorpciji enzima. Na pH vrednostima iznad  $pI$  enzima, povećanje negativnog naelektrisanja površine endopoligalakturonaze dovodi do pojačanog elektrostatičkog odbijanja prema  $-OSO_3^-$  grupama na CNC, što rezultuje manjim stepenom adsorpcije.

Koncentracija imobilisane pektinolitičke aktivnosti prati profil koncentracije imobilisanih proteina, sa maksimumom od približno 73 IU/g nosača na pH 5 i neznatno nižim vrednostima na pH 6 i 7 (Slika 4.24. (B)). Podudarnost optimuma za vezivanje proteina i maksimuma imobilisane aktivnosti ukazuje da je veća aktivnost na pH 5 pre svega posledica većeg broja adsorbovanih molekula endopoligalakturonaze na površini CNC, a ne drastične promene u orijentaciji enzima, što je u skladu sa zaključkom da pH blizak  $pI$  enzima pogoduje efikasnoj adsorpciji na slabo ili umereno naelektrisane nosače. U tim uslovima na površini CNC uspostavlja se povoljan balans između fizičke adsorpcije i minimalnog elektrostatičkog odbijanja prema negativno naelektrisanim sulfatnim grupama, što rezultuje najvišom koncentracijom vezanih proteina i najvišom imobilisanom pektinolitičkom aktivnošću. Polazeći od ovako definisanih optimalnih pH uslova, u narednom koraku ispitan je uticaj početne koncentracije proteina na kapacitet vezivanja i prinos imobilizacije proteina na CNC nosaču, kako bi se odredila koncentracija na kojoj se postiže najpovoljniji odnos između visoke imobilisane aktivnosti i efikasne upotrebe enzima.

#### 4.3.2.1.2 Efikasnost imobilizacije proteina preparata Pectinex® Ultra SP-L na CNC

Nakon što je utvrđena optimalna pH vrednost za adsorpciju na CNC nosač (pH 5), ispitan je uticaj početne koncentracije proteina na kapacitet vezivanja i prinos imobilizacije proteina. Inicijalna koncentracija proteina varirana je u opsegu od 50 do 300 mg/g nosača, sa konstantnim uslovima pH

5, vremenu kontakta od 1 h i ostalim uslovima identičnim kao u ispitivanjima uticaja pH. Na slici 4.25. prikazani su promena koncentracije imobilisanih proteina i prinos imobilizacije proteina izražen u procentima, na CNC nosaču u zavisnosti od početne koncentracije proteina.



*Slika 4.25. Uticaj inicijalne koncentracije proteina na: koncentraciju imobilisanih proteina (A) i prinos imobilizacije proteina (B) prilikom imobilizacije Pectinex® Ultra SP-L na CNC.*

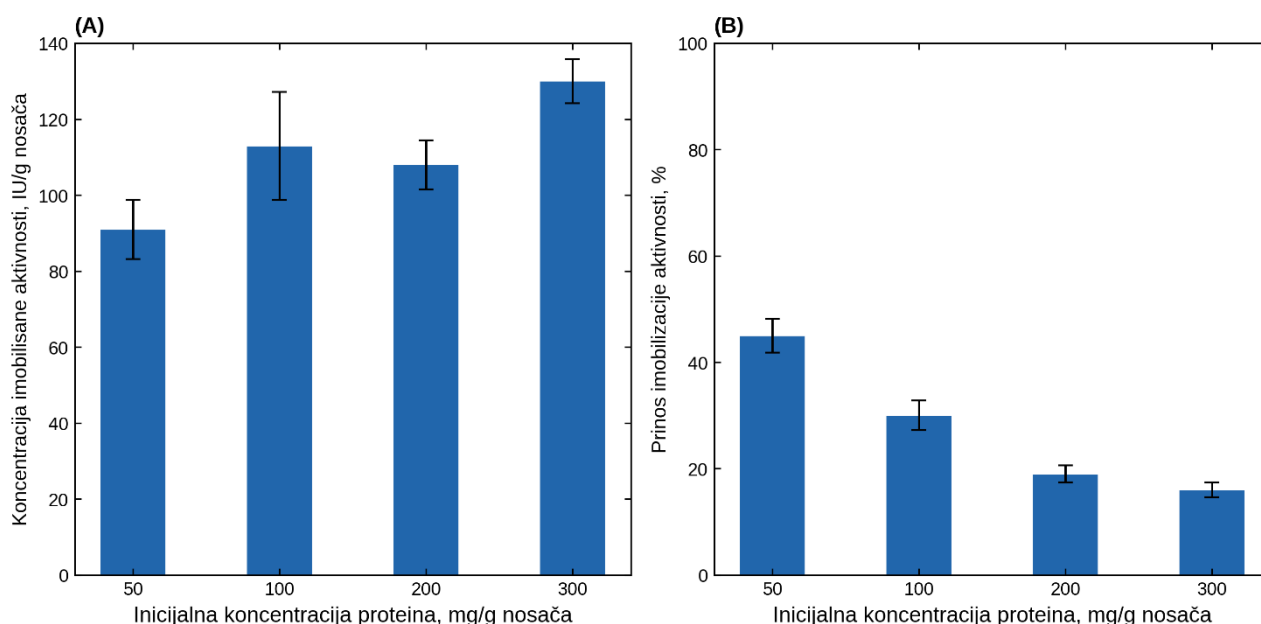
*Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 50, 100, 200 i 300 mg/g nosača; 0,1 M Na-acetatni pufer pH 5; vreme imobilizacije 1 h.*

Sa porastom početne koncentracije proteina sa 50 na 300 mg/g nosača koncentracija imobilisanih proteina na CNC raste približno linearno, od oko 29 mg/g nosača pri početnoj koncentraciji proteina od 50 mg/g nosača do oko 109 mg/g nosača pri početnoj koncentraciji od 300 mg/g nosača, što ukazuje da povećanje dostupne količine enzima u rastvoru dovodi do progresivnog zasićenja raspoloživih adsorpcionih mesta na površini nosača (Slika 4.25. (A)). Istovremeno, prinos imobilizacije proteina na CNC opada sa približno 58% pri najnižoj ispitivanoj koncentraciji na oko 36% pri najvišoj, što je u skladu sa očekivanim ponašanjem sistema imobilizacije enzima, u kojima višak proteina u rastvoru dovodi do manje efikasnog iskorišćenja dodate količine proteina (Slika 4.25. (B)).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se optimalan kompromis između visoke imobilisane količine proteina i prihvatljivog prinosa imobilizacije postiže u opsegu početnih koncentracija od 100 do 200 mg/g nosača, gde se obezbeđuje značajno povećanje imobilisane količine enzima u odnosu na 50 mg/g nosača, uz još uvek relativno visok procenat vezivanja. Međutim, potrebno je uzeti u obzir i aktivnost imobilisanog enzima, kako bi se odredila optimalna početna koncentracija.

#### 4.3.2.1.3 Efikasnost imobilizacije aktivnosti preparata Pectinex® Ultra SP-L na CNC

Pored uticaja početne koncentracije proteina na kapacitet vezivanja, ispitan je i uticaj ovog parametra na koncentraciju imobilisane pektinolitičke aktivnosti na CNC nosaču na optimalnoj pH vrednosti 5. Na Slici 4.26. prikazane su zavisnosti koncentracije imobilisane aktivnosti od početne koncentracije proteina, kao i odgovarajući prinos imobilisane aktivnosti izražen u procentima.



*Slika 4.26. Uticaj inicijalne koncentracije proteina na koncentraciju imobilisane aktivnosti (A) i prinos imobilizacije aktivnosti (B) prilikom imobilizacije Pectinex® Ultra SP-L na CNC. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina: 50, 100, 200, 300 mg/g nosača; 0,1 M Na-acetatni pufer pH 5; vreme imobilizacije 1 h.*

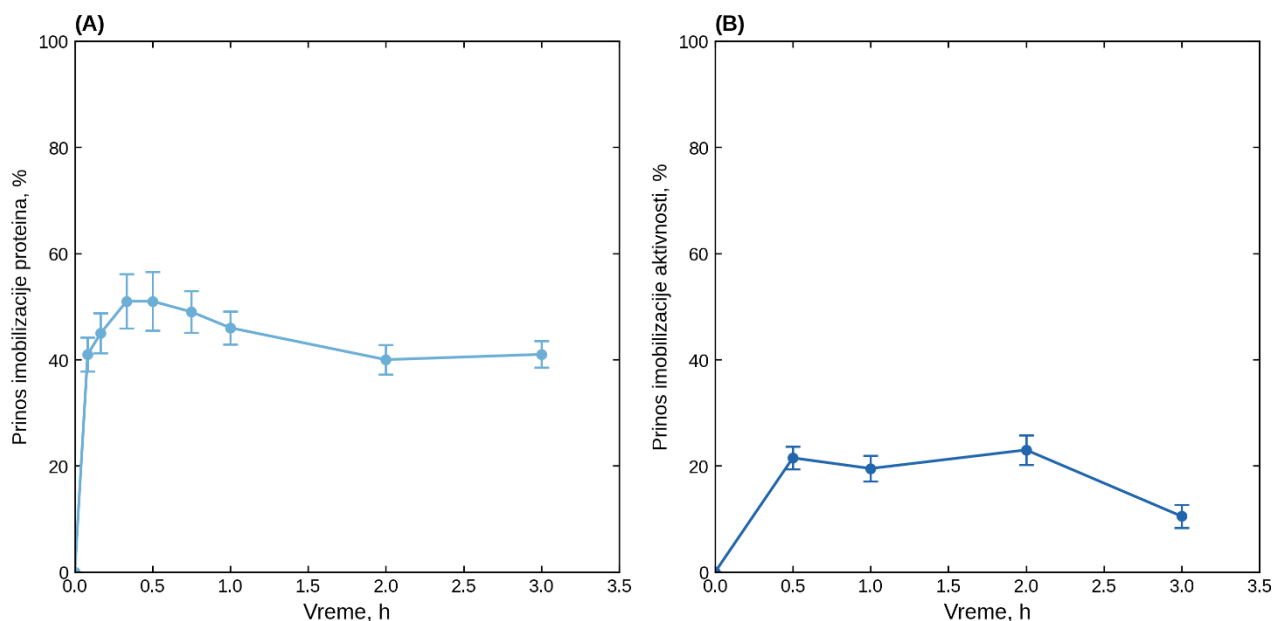
Sa porastom početne koncentracije proteina od 50 do 300 mg/g nosača koncentracija imobilisane aktivnosti na CNC-u raste od približno 91 IU/g nosača do oko 130 IU/g nosača, što je u skladu sa povećanjem koncentracije imobilisanih proteina i ukazuje da dodatno vezivanje enzima pri višim koncentracijama rezultuje i porastom ukupne katalitičke aktivnosti po gramu nosača (Slika 4.26. (A)).

Porast imobilisane aktivnosti je umeren u ispitivanom opsegu početnih koncentracija enzima sa 91 na 130 IU/g nosača, dakle za oko 39 IU/g nosača, što prati postepeno popunjavanje dostupne površine nosača. Međutim, prinos imobilisane aktivnosti (odnos aktivnosti imobilisanog preparata i ukupne aktivnosti dodate u sistem) pokazuje opadajući trend sa povećanjem početne koncentracije proteina, opadajući sa oko 30% pri inicijalnoj koncentraciji proteina od 50 mg/g nosača na približno 7% pri početnoj koncentraciji od 300 mg/g nosača (Slika 4.26. (B)). Ovakvo ponašanje ukazuje da, iako se pri visokim početnim koncentracijama proteina postižu najveće apsolutne vrednosti imobilisane aktivnosti, efikasnost iskorišćenja dodate količine enzima opada, što se može pripisati pojavi difuzionih ograničenja i zasićenju dostupnih adsorpcionih mesta na višim početnim koncentracijama. Dodatni doprinos padu prinosa imobilisane aktivnosti na višim početnim koncentracijama proteina može biti i otežan pristup supstrata aktivnim centrima enzima koji su adsorbovani u ranim fazama procesa, jer gusto pakovanje proteinskih molekula na površini CNC može sterno ometati difuziju supstrata do aktivnog centra. Uzimajući u obzir i rezultate količine vezanih proteina, ovi podaci potvrđuju da početna koncentracija od 100 mg/g nosača predstavlja dobar kompromis, pri kojem se postiže značajna imobilisana aktivnost uz još uvek relativno visok prinos imobilizacije, pa je ova vrednost odabrana kao optimalna za dalje ispitivanja imobilizacije preparata Pectinex® Ultra SP-L na CNC nosaču.

#### 4.3.2.1.4 Kinetika imobilizacije preparata Pectinex® Ultra SP-L na CNC

Iako su pH 5 i početna koncentracija od 100 mg/g nosača identifikovani kao optimalni za imobilizaciju preparata Pectinex® Ultra SP-L na CNC, jednako važan parametar je vreme imobilizacije, naročito kod višekomponentnog preparata, gde različite proteinske komponente mogu postepeno zamenjivati jedna drugu na površini nosača. Stoga je korišćenjem prethodno definisanih

uslova imobilizacije praćen prinos imobilizacije proteina i prinos imobilizacije aktivnosti u opsegu vremena 0–3 h (Slika 4.27).



Slika 4.27. Uticaj vremena imobilizacije na promenu prinosa imobilizacije proteina (A) i prinosa imobilizacije aktivnosti (B) tokom imobilizacije Pectinex® Ultra SP-L na CNC. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 100 mg/g nosača; 0,1 M Na-acetatni pufer pH 5; vreme 0–3 h.

Prinos imobilizacije proteina raste brzo u prvih 30 min, dostižući maksimum od približno 51% nakon 0,5 h, nakon čega blago opada i stabilizuje se na nivou od oko 40–46% između 1 i 3 h (Slika 4.27. (A)). Ovakav profil ukazuje da se ravnotežno stanje adsorpcije proteina na CNC uspostavlja u prvih 30 min, nakon čega ukupan broj vezanih proteinskih molekula ostaje relativno konstantan uz blagi pad koji može biti posledica delimične desorpcije slabije vezanih molekula.

Prinos imobilizacije aktivnosti pokazuje drugačiji profil: od približno 13% nakon 0,5 h, preko 11% nakon 1 h i 14% nakon 2 h, do izraženog pada na oko 6% nakon 3 h (Slika 4.27. (B)). Pad pektinolitičke aktivnosti adsorbovanog preparata na CNC nakon 2 h, uprkos relativno stabilnoj koncentraciji imobilisanih proteina, može se objasniti Vromanovim efektom odnosno pojavom kompetitivne zamene jednih adsorbovanih proteinskih vrsta drugima u višekomponentnim proteinskim smešama [296, 297]. Pectinex® Ultra SP-L sadrži više enzima različitih molekulskih masa, izoelektričnih tačaka i afiniteta prema površini CNC. U skladu sa Vromanovim efektom, u početnoj fazi adsorpcije na površinu nosača vezuju se prvenstveno proteini prisutni u višoj koncentraciji, među kojima su i pektinolitički aktivni enzimi (endopoligalakturonaza, pektin liaza, pektin esteraza). Tokom produžene inkubacije ove komponente postepeno zamenjuju proteini sa većim afinitetom prema površini CNC, koji ne moraju nužno biti pektinolitički aktivni prema korišćenom supstratu, što se na nivou ukupne aktivnosti registruje kao smanjenje prinosa imobilizacije aktivnosti [257]. U skladu sa tim, vreme imobilizacije od 0,5 h odabrano je kao optimalno, jer obezbeđuje stabilan i reproduktibilan prinos aktivnosti na CNC nosaču pre nego što kompetitivna замена adsorbovanih proteina počne da utiče na sastav imobilisanog enzimskog sloja.

U nastavku ovog poglavlja je izvršena optimizacija adsorpcije preparata Pectinex® Ultra SP-L na amino-CNC nosač kao i poređenje efikasnosti adsorpcije na CNC i amino-CNC nosače, a kako bi se sagledao uticaj pozitivno naelektrisanih amino grupa na mehanizam adsorpcije i efikasnost imobilizacije.

#### 4.3.2.2 Imobilizacija preparata Pectinex® Ultra SP-L adsorpcijom na amino-modifikovanu nanocelulozu

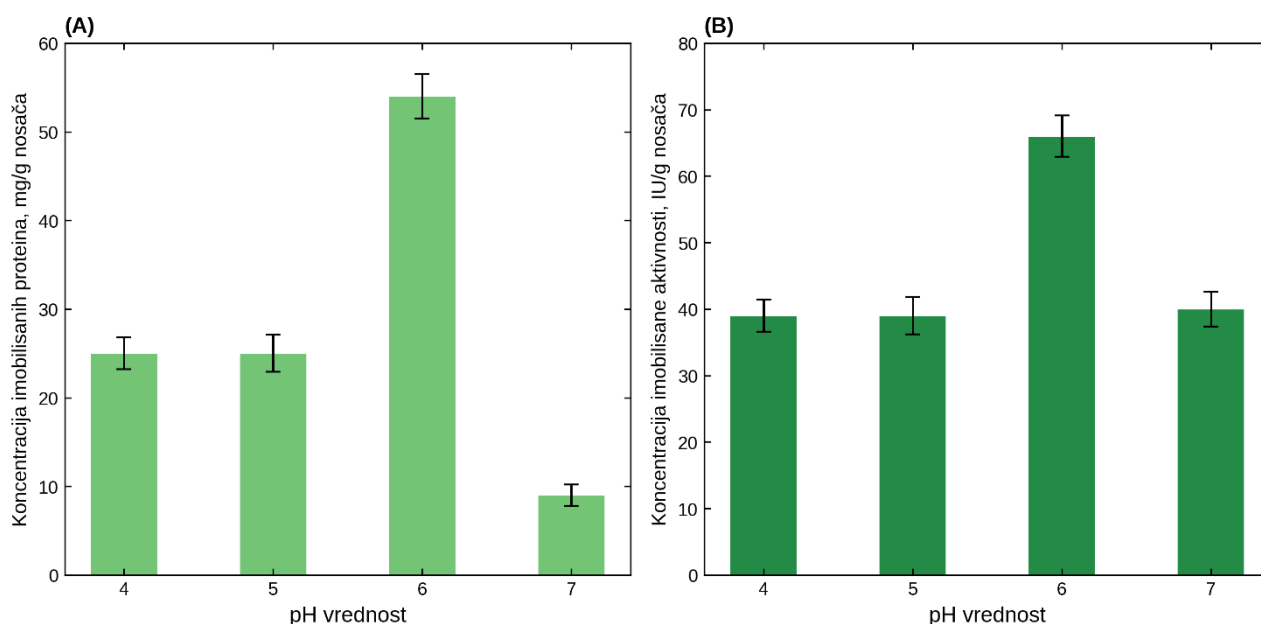
Imobilizacija enzimskog preparata na amino-CNC izvedena je sa ciljem da se ispita uticaj uvođenja pozitivno naelektrisanih amino grupa na površinu nosača na efikasnost adsorpcije enzima. Na pH vrednostima nižim od izoelektrične tačke endopoligalakturonaze amino grupe na površini nosača su protonovane u  $-\text{NH}_3^+$  oblik. Kao i kod ksilanaze, te grupe uspostavljaju elektrostatičke interakcije sa negativno naelektrisanim karboksilnim ostacima enzima, uz doprinos vodoničnih veza koje nastaju i pri imobilizaciji na CNC. Glavne interakcije koje se pri tome uspostavljaju između endopoligalakturonaze i amino-CNC nosača (vodonične veze između hidroksilnih grupa nanoceluloze i polarnih ostataka enzima, kao i dominantne elektrostatičke interakcije između protonovanih amino grupa nosača i negativno naelektrisanih domena na površini enzima) analogne su prikazu datom na šemi 4.

Nosač amino-CNC nosač ima na površini primarne amino grupe uvedene silanizacijom pomoću APTES, koje su na nižim pH vrednostima u protonovanom obliku ( $-\text{NH}_3^+$ ) što omogućava dodatne interakcije između enzima i nosača u odnosu na CNC. Uslovljeno tim razlikama u površinskom naelektrisanju, očekuje se da se na amino-CNC ostvaruju izraženije elektrostatičke interakcije sa negativno naelektrisanim karboksilnim grupama na površini endopoligalakturonaze na pH vrednostima iznad pI enzima, čime se istovremeno utiče i na ukupan kapacitet vezivanja i na selektivnost adsorpcije pojedinih komponenti iz enzimskog preparata.

Polazeći od strukture endopoligalakturonaze i površinskih svojstava nanoceluloznih nosača, u nastavku je najpre analiziran uticaj pH vrednosti pufera za imobilizaciju na adsorpciju proteina i pektinolitičke aktivnosti na amino-CNC nosač.

##### 4.3.2.2.1 Uticaj pH vrednosti na efikasnost imobilizacije preparata Pectinex® Ultra SP-L adsorpcijom na amino-CNC

Uticaj pH vrednosti na imobilizaciju preparata Pectinex® Ultra SP-L na amino-CNC ispitan je u opsegu pH 4–7, pri početnoj koncentraciji proteina od 100 mg/g nosača i vremenu imobilizacije od 0,5 h, korišćenjem 0,1 M Na-acetatnog pufera za pH 4 i 5 i 0,1 M Na-fosfatnog pufera za pH 6 i 7. Na Slici 4.28. prikazane su zavisnosti koncentracije imobilisane pektinolitičke aktivnosti od pH vrednosti za amino-CNC kao i koncentracije imobilisanih proteina.



*Slika 4.28. Uticaj pH vrednosti na: koncentraciju imobilisanih proteina (A) i koncentraciju imobilisane pektinolitičke aktivnosti (B) prilikom imobilizacije Pectinex® Ultra SP-L na amino-CNC. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 100 mg/g nosača; 0,1 M Na-acetatni pufer pH 4 i 5 i 0,1 M Na-fosfatni pufer pH 6 i 7; vreme imobilizacije 0,5 h.*

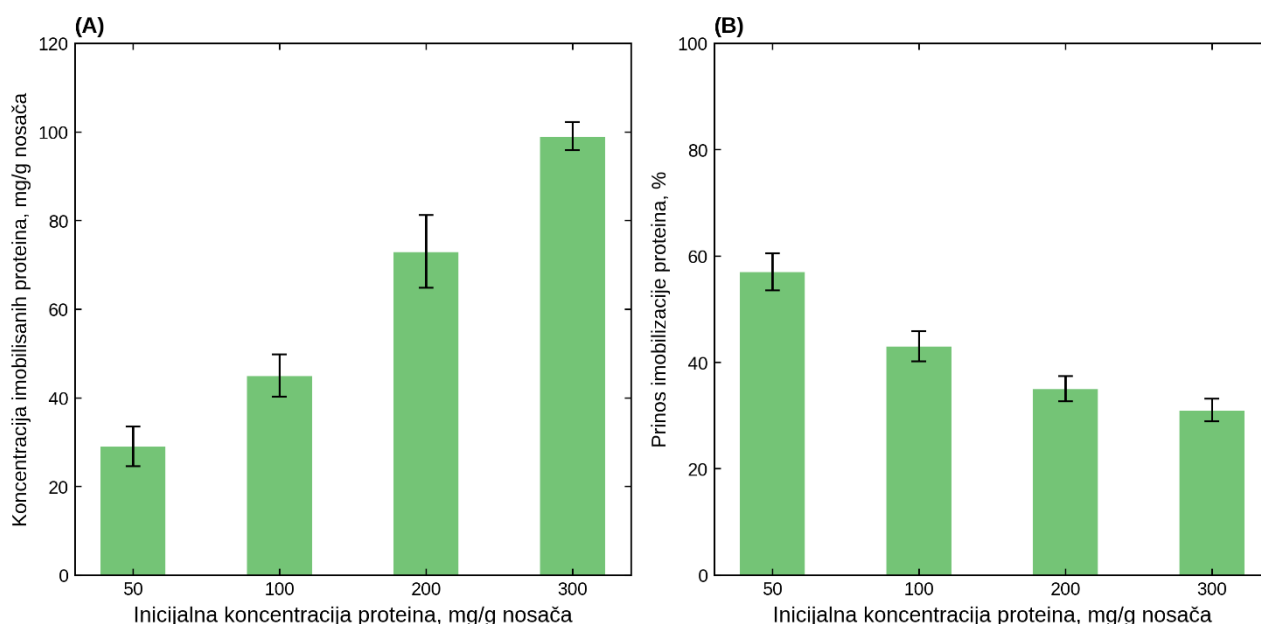
Maksimalna koncentracija imobilisanih proteina na amino-CNC nosaču, od približno 55 mg/g nosača, postignuta je na pH 6, dok su na pH 4 i 5 zabeležene znatno niže vrednosti (oko 25 mg/g nosača), a na pH 7 dolazi do blagog smanjenja u odnosu na pH 6 (Slika 4.28. (A)). Drugačiji pH optimum adsorpcije ka višim pH vrednostima u odnosu na nemodifikovanu CNC (pH 5) u skladu je sa mehanizmom adsorpcije na amino-CNC: na pH 6, koji je 1,3 jedinice iznad izoelektrične tačke endopoligalakturonaze ( $pI = 4,70$ ), što znači da površina enzima nosi izraženije negativno naelektrisanje, što pospešuje privlačne elektrostatičke interakcije sa protonovanim amino grupama nosača ( $-NH_3^+$ ).

Koncentracija imobilisane pektinolitičke aktivnosti prati profil koncentracije imobilisanih proteina, sa maksimumom od približno 70 IU/g nosača na pH 6 i nižim vrednostima na pH 4 i 5 (Slika 4.28. (B)). Podudarnost pH optimuma za vezivanje proteina i imobilisanu aktivnost ukazuje da viša aktivnost na amino-CNC na pH 6 prvenstveno potiče od veće ukupne količine adsorbovanog enzima, uz povoljnu orijentaciju molekula određenu elektrostatičkim privlačenjem između negativno naelektrisane površine enzima i pozitivno naelektrisanih amino grupa nosača. Na osnovu ovih rezultata pH 6 je odabran kao optimalna vrednost za adsorpciju preparata Pectinex® Ultra SP-L na amino-CNC i korišćen je u daljim eksperimentima sa ovim nosačem.

Polazeći od ovako definisanih optimalnih pH uslova za amino-CNC, u narednom koraku ispitan je uticaj početne koncentracije proteina na kapacitet vezivanja i prinos imobilizacije proteina i aktivnosti preparata Pectinex® Ultra SP-L, kako bi se za svaki nosač odredila koncentracija na kojoj se postiže najpovoljniji odnos između visoke imobilisane aktivnosti i efikasne potrošnje enzima.

#### 4.3.2.2.2 Efikasnost imobilizacije proteina preparata Pectinex® Ultra SP-L na amino-CNC

Uticaj početne koncentracije proteina na imobilizaciju proteina (imobilisana koncentracija proteina i prinos imobilizacije proteina) preparata Pectinex® Ultra SP-L na amino-CNC nosaču ispitan je na optimalnoj pH vrednosti i vremenu imobilizacije od 1 h, za opseg početnih koncentracija od 50 do 300 mg/g nosača, i grafički je prikazan na slici 4.29.



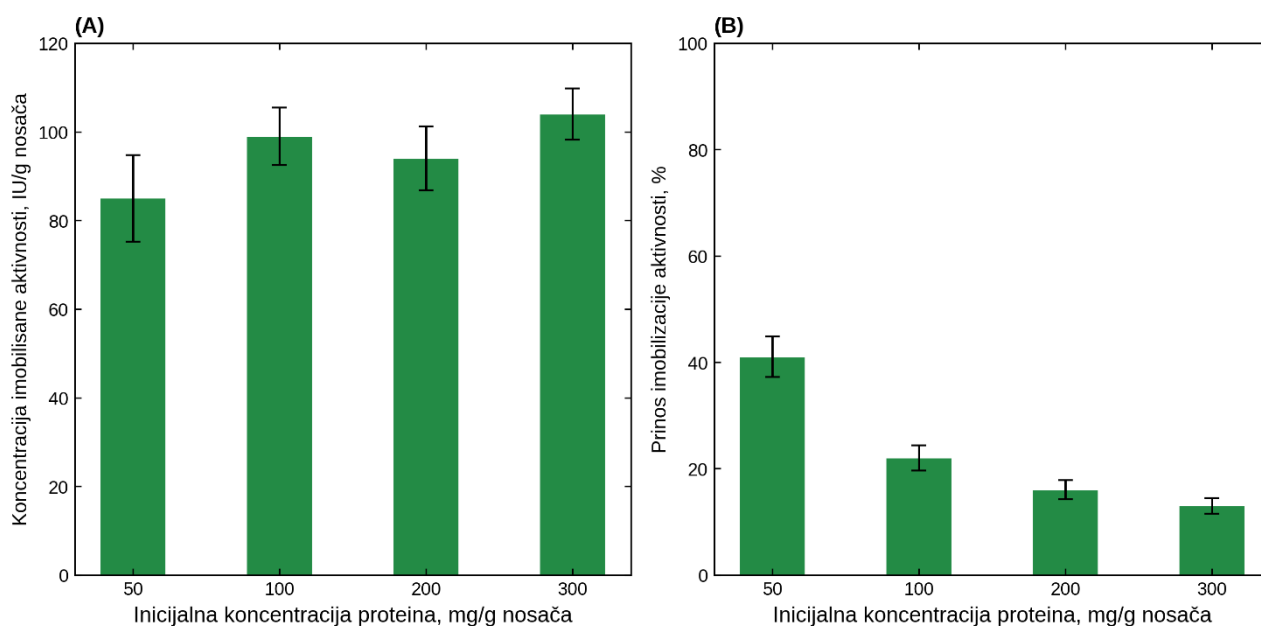
*Slika 4.29. Uticaj inicijalne koncentracije proteina na: koncentraciju imobilisanih proteina (A) i prinos imobilizacije proteina (B) prilikom imobilizacije Pectinex® Ultra SP-L na amino-CNC. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina: 50, 100, 200, 300 mg/g nosača; 0,1 M Na-fosfatni pufer pH 6; vreme imobilizacije 1 h.*

Sa porastom početne koncentracije proteina od 50 do 300 mg/g nosača koncentracija imobilisanih proteina na amino-CNC raste od 30 mg/g nosača do oko 95 mg/g nosača, što ukazuje da povećanje dostupne količine enzima u rastvoru vodi progresivnom popunjavanju dostupnih mesta na površini amino-CNC (Slika 4.29. (A)). Istovremeno, prinos imobilizacije proteina opada sa 62% pri inicijalnoj koncentraciji proteina od 50 mg/g nosača na oko 31% pri početnoj koncentraciji od 300 mg/g nosača, što je očekivano za sisteme imobilizacije u kojima višak proteina u rastvoru dovodi do manjeg iskorišćenja dodate količine enzima, uz ograničen broj dostupnih veznih mesta i moguću kompeticiju pojedinih enzima iz smeše (Slika 4.29. (B)).

Sa praktičnog stanovišta, pogodno je raditi imobilizaciju u opsegu inicijalnih koncentracija pri kojima se postiže zadovoljavajući kompromis između visokog kapaciteta vezivanja i prihvatljivog prinosa imobilizacije, a rezultati pokazuju da je za amino-CNC takav opseg koncentracije od 100–200 mg/g nosača. Da bi se procenilo kako promena početne koncentracije proteina utiče na katalitičku efikasnost imobilisanog preparata na amino-CNC nosaču, paralelno su određene i koncentracije imobilisane aktivnosti i prinosi imobilizacije aktivnosti pektinaza korišćenjem istih uslova imobilizacije.

#### 4.3.2.2.3 Efikasnost imobilizacije aktivnosti preparata Pectinex® Ultra SP-L na amino-CNC

Sa ciljem određivanja optimalne početne koncentracije proteina za adsorpciju preparata Pectinex® Ultra SP-L na amino-CNC, ispitan je uticaj ovog parametra u opsegu inicijalnih koncentracija proteina od 50 do 300 mg/g nosača na koncentraciju imobilisane pektinolitičke aktivnosti i prinos imobilizacije aktivnosti pri prethodno utvrđenoj optimalnoj pH vrednosti od 6 (Slika 4.30).



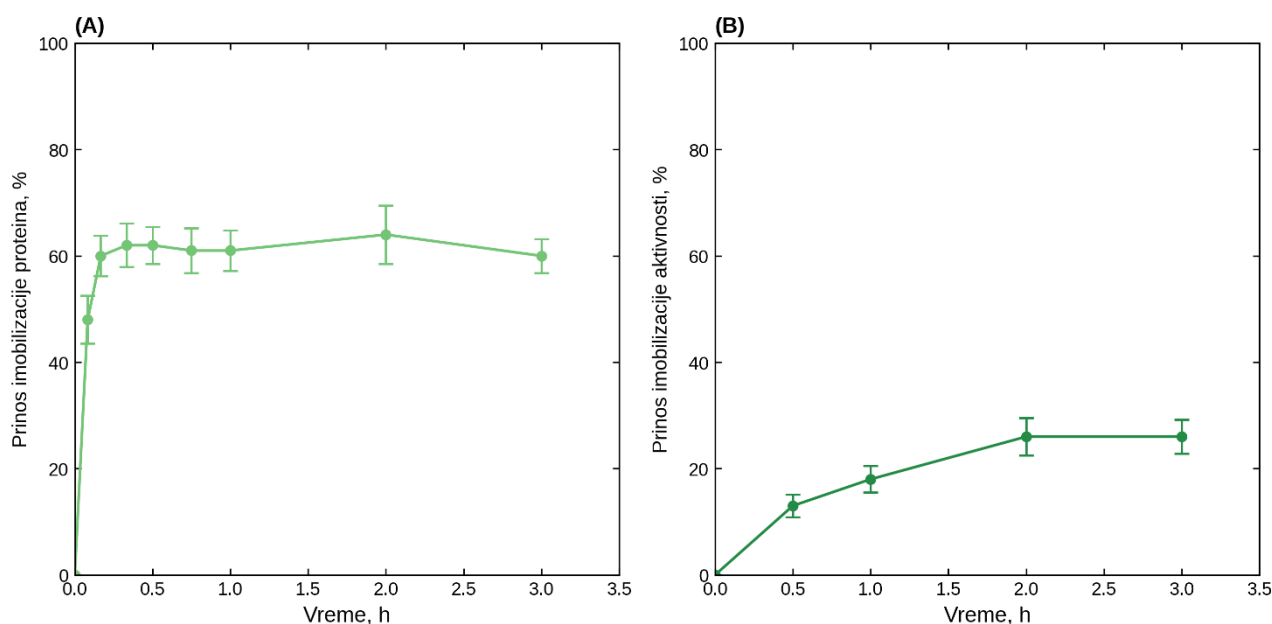
*Slika 4.30. Uticaj inicijalne koncentracije proteina na koncentraciju imobilisane aktivnosti (A) i prinos imobilizacije aktivnosti (B) prilikom imobilizacije Pectinex® Ultra SP-L na amino-CNC. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina: 50, 100, 200, 300 mg/g nosača; 0,1 M Na-fosfatni pufer pH 6; vreme imobilizacije 1 h.*

Sa porastom početne koncentracije proteina od 50 do 300 mg/g nosača koncentracija imobilisane aktivnosti na amino-CNC raste od približno 85 IU/g nosača do oko 104 IU/g nosača, što ukazuje da dodatno vezivanje proteina pri višim koncentracijama dovodi do umerenog povećanja ukupne katalitičke aktivnosti po gramu nosača, ali da se porast aktivnosti postepeno približava platou (Slika 4.30. (A)). Prinos imobilisane aktivnosti, međutim, opada od oko 28% pri početnoj koncentraciji proteina od 50 mg/g nosača do 6% pri inicijalnoj koncentraciji od 300 mg/g nosača, što potvrđuje da se pri višim početnim koncentracijama značajan deo enzima ne vezuje na nosač u katalitički aktivnoj formi ili ostaje u rastvoru (Slika 4.30. (B)). Činjenica da se koncentracije imobilisane aktivnosti relativno malo menjaju, sugerise da veći deo vezanog proteina (slika 4.29.(A)) ne doprinosi merenoj pektinolitičkoj aktivnosti, što može biti i posledica vezivanja drugih enzima iz ovog preparata.

Na osnovu dobijenih rezultata, inicijalna koncentracija proteina od 100 mg/g nosača odabrana je kao pogodna za dalja ispitivanja imobilizacije pektinaza na amino-CNC, jer obezbeđuje visok apsolutni nivo imobilisane aktivnosti uz još uvek umerene gubitke prinosa imobilizacije aktivnosti i proteina.

#### 4.3.2.2.4 Kinetika adsorpcije preparata Pectinex® Ultra SP-L na amino-CNC

Pošto je u enzimskom preparatu prisutno više proteinskih komponenti različitog afiniteta prema amino-CNC nosaču, vreme imobilizacije može uticati na konačni sastav adsorbovanog sloja. Da bi se utvrdilo koliko brzo se uspostavlja stabilna ravnoteža, kinetika imobilizacije proteina i pektinolitičke aktivnosti na amino-CNC praćena je sa prethodno određenim optimalnim uslovima (pH 6, 100 mg/g nosača) u intervalu 0–3 h (Slika 4.31).



*Slika 4.31. Uticaj vremena imobilizacije na promenu prinosa imobilizacije proteina (A) i prinosa imobilizacije aktivnosti (B) tokom imobilizacije Pectinex® Ultra SP-L na amino-CNC. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 100 mg/g nosača; 0,1 M Na-fosfatni pufer pH 6; vreme 0-3 h.*

Prilikom praćenja promena u prinosu imobilizacije proteina na amino-CNC u funkciji vremena, uočava se veoma brza adsorpcija u prvoj fazi: već u prvih 0,5 h prinos imobilizacije proteina dostiže približno 62% (Slika 4.31. (A)). U daljem toku eksperimenta, do 3 h, vrednosti prinosa osciluju u relativno uskom intervalu od približno 60–64%, što ukazuje da se ravnoteža adsorpcije proteina na amino-CNC praktično uspostavlja tokom prvih 30 minuta do 1 h imobilizacije, a produženje vremena kontakta dovodi samo do manjih lokalnih promena u raspodeli i rearanžmanu adsorbovanog sloja bez značajnijeg dodatnog vezivanja.

Tokom praćenog vremena beleži se i postepen porast prinosa aktivnosti sa oko 11% nakon 1 h, do 16% posle 3 h imobilizacije (Slika 4.31. (B)). Ovakav profil ukazuje da se katalitički najefikasnija frakcija enzima vezuje i reorganizuje nešto sporije od ukupno vezanih proteina, odnosno da nakon brze inicijalne adsorpcije sledi faza sporijih konformacionih prilagođavanja i moguće redistribucije molekula na površini nosača, koja dovodi do blagog, ali kontinuiranog porasta imobilisane aktivnosti. Imajući u vidu da se već nakon 1–2 h dostiže najveći deo maksimalnog prinosa aktivnosti, dok produženje vremena imobilizacije do 3 h obezbeđuje samo ograničeno dodatno povećanje aktivnosti, kao kompromisno vreme za imobilizaciju preparata Pectinex® Ultra SP-L na amino-CNC nosaču može se smatrati opseg od 2 h.

Na taj način za amino-CNC nosač dobijen je skup optimalnih uslova imobilizacije pektinaze, koji će u nastavku rada biti razmatrani u okviru uporedne analize sa CNC nosačem, a posle i drugim metodama imobilizacije na modifikovane nosače od nanoceluloze.

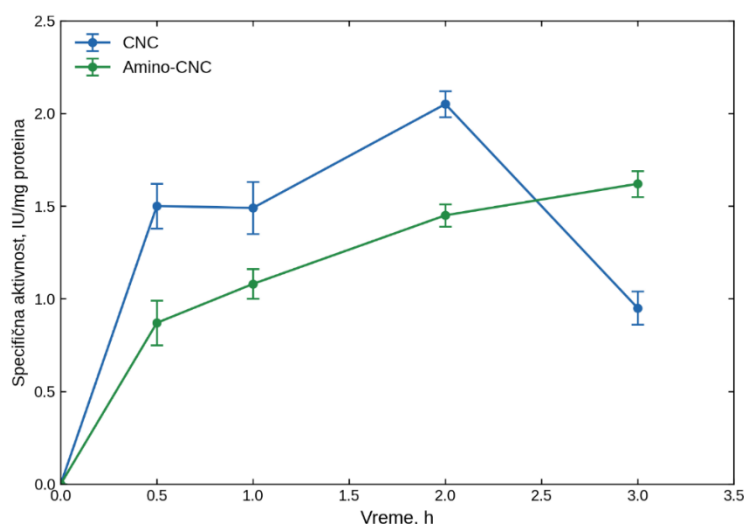
#### 4.3.2.3 Uporedna analiza adsorpcije preparata Pectinex® Ultra SP-L na CNC i amino-CNC

Uporedna analiza adsorpcije preparata Pectinex® Ultra SP-L na CNC i amino-CNC pokazuje obrazac sličan onom uočenom kod ksilanaze, ali dodatno naglašava složenost interakcija u višekomponentnim enzimskim smešama. Optimalna pH vrednost za imobilizaciju pomera se sa pH 5 na CNC ka pH 6 na amino-CNC, što odražava dodatnu komponentu elektrostatičkog privlačenja između protonovanih amino grupa nosača i negativno naelektrisanih karboksilnih ostataka enzima. Obe optimalne pH vrednosti su u opsegu literaturno opisanih vrednosti za slobodnu i imobilisanu pektinazu (pH 4,5–

6,0) [298], a pomeraj ka višim pH na amino-CNC u skladu je sa efektom lokalnog pozitivnog mikrookruženja oko nosača koji efektivno snižava lokalnu koncentraciju  $H^+$  jona i pomera prividni optimum enzima ka višim pH vrednostima [299, 300].

Kao optimalna za oba nosača izdvojena je početna koncentracija proteina od 100 mg/g nosača. Treba imati u vidu da su eksperimenti ispitivanja uticaja početne koncentracije proteina i kinetike imobilizacije izvedeni kao zasebne serije, sa nezavisno pripremljenim rastvorima enzimskog preparata i zasebno određenom polaznom aktivnošću, pa se apsolutne vrednosti prinosa pri istoj početnoj koncentraciji proteina razlikuju između dve serije, dok su trendovi i međusobni odnosi nosača uporedivi. Ključna razlika ogleda se u toku aktivnosti tokom vremena: na CNC imobilisana aktivnost dostiže maksimum nakon 1 h i zatim opada, što se može objasniti delimičnom desorpcijom endopoligalakturonaze i kompetitivnim vezivanjem drugih komponenti smeše (Vromanov efekat), dok na amino-CNC ostaje stabilna u intervalu 2–3 h, što ukazuje na stabilnije vezivanje endopoligalakturonaze i manju sklonost ka reorganizaciji adsorbovanih molekula enzima. Treba imati u vidu i to da pH vrednost određuje naelektrisanje svih proteinskih komponenti preparata, ne samo pektinolitičkih, pa se pri istim uslovima menja i udeo pratećih proteina koji se vezuju za nosač, što se odražava na specifičnu aktivnost imobilisanog preparata.

Kao i kod ksilanaze, da bi se razlike između CNC i amino-CNC razdvojile na doprinos količine vezanog enzima i doprinos orijentacije pojedinačnih molekula, praćena je specifična aktivnost (IU po mg vezanog proteina) u funkciji vremena imobilizacije (Slika 4.32).



*Slika 4.32. Promena specifične aktivnosti Pectinex® Ultra SP-L imobilisanog na CNC i amino-CNC u zavisnosti od vremena imobilizacije. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: početna koncentracija proteina 100 mg/g nosača; CNC – 0,1 M Na-acetatni pufer pH 5; amino-CNC – 0,1 M Na-fosfatni pufer pH 6; vreme imobilizacije 0–3 h.*

Na CNC specifična aktivnost brzo raste i dostiže maksimum od 2,0 IU/mg proteina nakon 2 h, nakon čega naglo opada na 0,9 IU/mg proteina nakon 3 h, što ukazuje na sterne smetnje unutar proteinskog sloja i kompetitivnu zamenu endopoligalakturonaze drugim komponentama smeše tokom produžene inkubacije. Na amino-CNC specifična aktivnost raste sporije ali kontinuirano, dostižući 1,6 IU/mg proteina nakon 3 h bez znakova zasićenja, što ukazuje na postepeno popunjavanje površine katalitički funkcionalnim molekulima endopoligalakturonaze. Iz ovih podataka proizilazi da je za CNC optimalno zadržati kraće vreme imobilizacije (do 2 h), dok je za amino-CNC povoljnije produženo vreme do uspostavljanja ravnoteže.

Zanimljivo je da je redosled specifičnih aktivnosti na CNC i amino-CNC kod pektinolitičkog preparata obrnut u odnosu na preparat sa dominantnom ksilanaznom aktivnošću. Kod ksilanaze viša

specifična aktivnost postignuta je na amino-CNC (1,54 naspram 0,91 IU/mg proteina), dok se kod preparata Pectinex<sup>®</sup> Ultra SP-L bolji rezultat ostvaruje na nemodifikovanoj CNC (2,00 naspram 1,45 IU/mg proteina). Ova razlika verovatno potiče od različitog rasporeda naelektrisanih grupa na površinama dva enzima: kod ksilanaze se pozitivno naelektrisane grupe nalaze pretežno na strani suprotnoj od aktivnog centra, pa vezivanje na amino-CNC ne zaklanja aktivni centar, dok su kod endopoligalakturonaze raspoređene bliže aktivnom centru, odnosno dubokoj pukotini u  $\beta$ -heliksu, pa elektrostatičke interakcije sa amino grupama nosača nose veći rizik od nepovoljne orijentacije. Na nemodifikovanoj CNC, gde preovlađuju vodonične veze i hidrofobne interakcije, veći udeo vezanih molekula endopoligalakturonaze zadržava aktivni centar dostupan supstratu [271]. Sličan trend, da isti nosač može da obezbedi povoljniju orijentaciju za jedan enzim, a nepovoljniju za drugi, opisan je u literaturi [219, 273], što ilustruje princip da optimalan nosač za imobilizaciju nije univerzalan, već zavisi od specifične distribucije funkcionalnih grupa na površini konkretnog enzima.

Adsorpcija preparata Pectinex<sup>®</sup> Ultra SP-L na CNC i amino-CNC pokazala se kao efikasan i jednostavan način imobilizacije, ali nosi ograničenje reverzibilnog karaktera. Sa ciljem prevazilaženja ovih ograničenja i postizanja trajnijeg vezivanja enzima, u nastavku istraživanja ispitana je kovalentna imobilizacija preparata Pectinex<sup>®</sup> Ultra SP-L na modifikovanim nosačima, gde se preko aldehidnih grupa nosača i amino grupa lizinskih ostataka enzima formiraju stabilne kovalentne veze koje sprečavaju desorpciju enzima tokom primene.

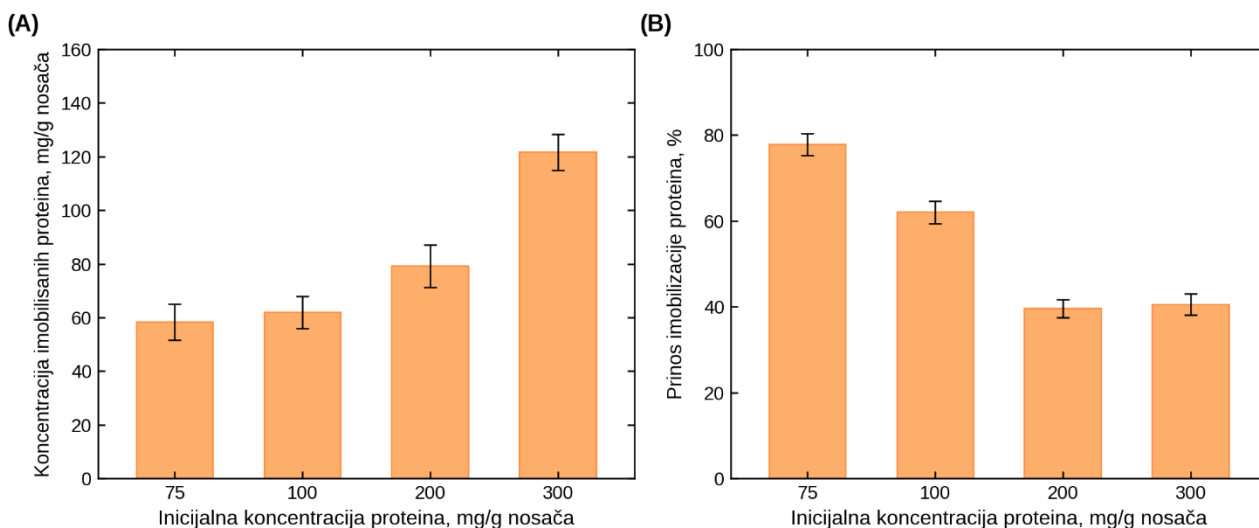
#### 4.3.2.4 Kovalentna imobilizacija preparata Pectinex<sup>®</sup> Ultra SP-L na oksidovanu nanocelulozu

U nastavku je ispitana kovalentna imobilizacija na Ox-CNC, sa ciljem dobijanja stabilnijeg preparata sa manjom sklonošću ka desorpciji i mogućnošću višekratne upotrebe. Mehanizam vezivanja i obrazloženje izbora Na-karbonatnog pufera pH 9,5 istovetni su kao kod ksilanaze i detaljno su izloženi u odeljku o kovalentnoj imobilizaciji preparata Rohalase<sup>®</sup> SEP-Visco na Ox-CNC, pa su i ovde primenjeni isti uslovi, uz produženo vreme kontakta enzima i nosača. Mehanizam kovalentne imobilizacije endopoligalakturonaze na Ox-CNC nosač analogan je prikazu datom na šemi 5 (aldehidne grupe koje stvaraju kovalentne veze sa amino grupama ostataka lizina, uz doprinoseće vodonične veze i elektrostatičke interakcije između hidroksilnih i karboksilnih grupa nosača i naelektrisanih ostataka enzima). Treba imati u vidu da pKa amino grupa lizinskih ostataka nije ista u svim proteinima, jer zavisi od lokalnog okruženja svakog ostatka [269], pa procena udela deprotonovanih grupa na datoj pH vrednosti služi samo kao orijentacija.

U nastavku je, u skladu sa pristupom primenjenim kod ksilanaze, najpre ispitan uticaj početne koncentracije proteina na koncentraciju imobilisanih proteina, koncentraciju imobilisane pektinolitčke aktivnosti i prinos imobilizacije proteina i aktivnosti preparata Pectinex<sup>®</sup> Ultra SP-L na Ox-CNC nosaču sa fiksnim uslovima pH i vremena imobilizacije.

##### 4.3.2.4.1 Efikasnost imobilizacije proteina preparata Pectinex<sup>®</sup> Ultra SP-L na Ox-CNC

Sa ciljem određivanja optimalne početne koncentracije proteina za kovalentnu imobilizaciju preparata Pectinex<sup>®</sup> Ultra SP-L na Ox-CNC, ispitan je uticaj ovog parametra u opsegu inicijalnih koncentracija proteina od 75 do 300 mg/g nosača na koncentraciju imobilisanih proteina i prinos imobilizacije proteina korišćenjem prethodno utvrđenih radnih uslova imobilizacije (Slika 4.33).



*Slika 4.33. Uticaj inicijalne koncentracije proteina na: koncentraciju imobilisanih proteina (A) i prinos imobilizacije proteina (B) prilikom imobilizacije Pectinex® Ultra SP-L na Ox-CNC.*

*Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina: 75, 100, 200, 300 mg/g nosača; 0,1 M Na-karbonatni pufer pH 9,5; vreme imobilizacije 18 h.*

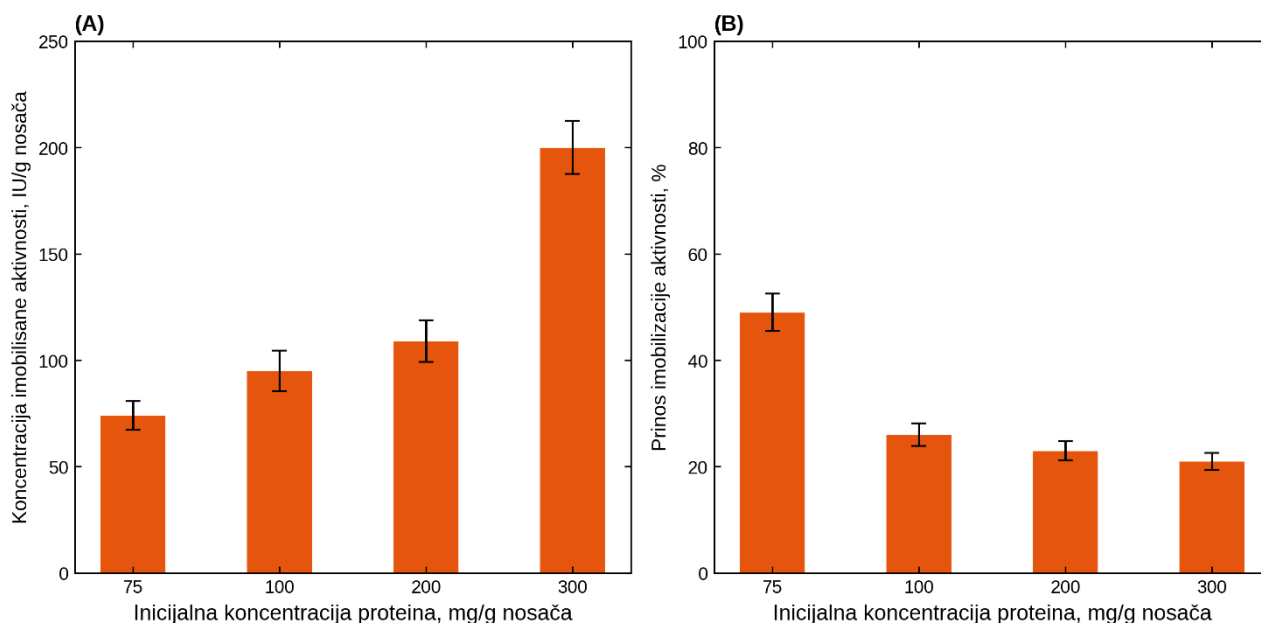
Koncentracija imobilisanih proteina na Ox-CNC nosaču raste sa povećanjem početne koncentracije proteina u opsegu od 75 do 300 mg/g nosača, dostižući vrednosti imobilisane koncentracije proteina od 58 do 125 mg/g nosača (Slika 4.33. (A)). Karakteristično je da se između 75 i 100 mg/g nosača praktično ne uočava porast koncentracije imobilisanih proteina (vrednosti oko 60 mg/g), što ukazuje na privremeno zasićenje većine dostupnih aldehidnih grupa na površini Ox-CNC na ovim uslovima. Dalje povećanje inicijalne koncentracije na 300 mg/g nosača dovodi do dodatnog porasta vezane količine proteina, što verovatno odražava kombinovani doprinos stvaranja kovalentnih veza ali i nespecifične fizičke adsorpcije na preostalim slobodnim mestima na površini nosača [219].

Prinos imobilizacije proteina na Ox-CNC pokazuje tipičan opadajući trend sa porastom inicijalne koncentracije, opadajući sa 80% pri inicijalnoj koncentraciji od 75 mg/g nosača na oko 40% pri inicijalnoj koncentraciji 300 mg/g nosača (Slika 4.33. (B)). Ovakvo ponašanje je u skladu sa time da je ukupan broj reaktivnih mesta na površini nosača ograničen: na nižim početnim koncentracijama gotovo svi ponuđeni molekuli enzima pronalaze dostupno mesto za vezivanje, dok na višim koncentracijama proteina sve veći deo ostaje u rastvoru nakon uspostavljanja ravnoteže [219]. Istovremeno, visoke vrednosti prinosa na nižim inicijalnim koncentracijama (50–100 mg/g nosača) u odnosu na adsorpciju istog preparata na CNC i amino-CNC potvrđuju visok kapacitet Ox-CNC za kovalentnu imobilizaciju proteina [246, 258].

Posmatranjem zavisnosti koncentracije imobilisanih proteina i prinosa imobilizacije u funkciji početne koncentracije proteina može se zaključiti da Ox-CNC obezbeđuje visok kapacitet vezivanja komponenti enzimskog preparata u celom ispitivanom opsegu (75–300 mg/g nosača), uz očekivani pad prinosa sa porastom početne koncentracije proteina [246, 258]. Međutim, sama koncentracija imobilisanih proteina ne daje direktan uvid u katalitičku efikasnost dobijenog biokatalizatora, pa je u narednom koraku analizirana zavisnost imobilisane pektinolitičke aktivnosti i prinosa imobilizacije aktivnosti preparata Pectinex® Ultra SP-L na Ox-CNC nosaču u istom opsegu početnih koncentracija proteina.

#### 4.3.2.4.2 Efikasnost imobilizacije aktivnosti preparata Pectinex® Ultra SP-L na Ox-CNC

Pošto preparat sadrži više enzima različite katalitičke aktivnosti, sama količina imobilisanog proteina ne pokazuje koliko je efikasno vezana baš ona katalitička komponenta odgovorna za hidrolizu pektina. Iz tog razloga, određena je koncentracija imobilisane pektinolitičke aktivnosti i prinos imobilizacije aktivnosti sa konstantnim uslovima imobilizacije (Slika 4.34).



Slika 4.34. Uticaj inicijalne koncentracije proteina na koncentraciju imobilisane aktivnosti (A) i prinos imobilizacije aktivnosti (B) prilikom imobilizacije Pectinex® Ultra SP-L na Ox-CNC.

Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina: 75, 100, 200, 300 mg/g nosača; 0,1 M Na-karbonatni pufer pH 9,5; vreme imobilizacije 18 h.

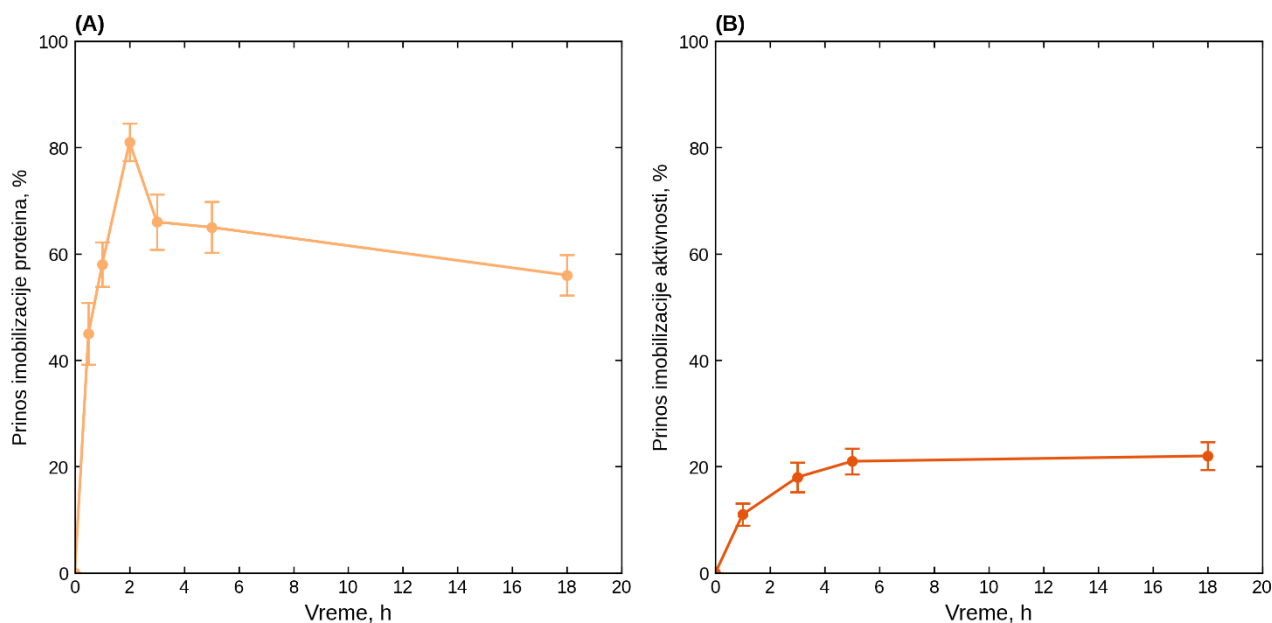
Koncentracija imobilisane pektinolitičke aktivnosti na Ox-CNC nosaču raste sa povećanjem inicijalne koncentracije proteina u opsegu od 75 do 300 mg/g nosača, dostižući vrednosti od 74 IU/g nosača pri inicijalnoj koncentraciji proteina od 75 mg/g nosača do oko 200 IU/g nosača pri početnoj koncentraciji od 300 mg/g nosača (Slika 4.34. (A)). Ovakav trend pokazuje da povećanje početne koncentracije proteina dovodi do porasta broja katalitički funkcionalnih enzima sa pektinolitičkom aktivnošću na površini Ox-CNC, pri čemu se pri najvišoj ispitivanoj početnoj koncentraciji uočava izražen skok ukupne imobilisane aktivnosti, verovatno usled kombinovanog efekta kovalentnog vezivanja preko Šifovih baza i dodatne stabilizacije fizički adsorbovanih, katalitički aktivnih komponenti preparata.

Važno je istaći da merenjem pektinolitičke aktivnosti pratimo isključivo ponašanje enzima koji ispoljavaju pektinolitičko dejstvo, dok ostale proteinske komponente preparata kao što su hemicelulaze, celulaze i druge prateće aktivnosti karakteristične za enzimске preparate dobijene iz *A. aculeatus* [289, 290] doprinose izmerenim vrednostima koncentracije imobilisanih proteina, ali ne i pektinolitičkoj aktivnosti. Zbog toga su prinosi imobilizacije aktivnosti na Ox-CNC niži u poređenju sa prinosima imobilizacije proteina: prinos imobilizacije aktivnosti opada sa približno 17% pri inicijalnoj koncentraciji od 75 mg/g nosača na oko 9% pri inicijalnoj koncentraciji od 190 mg/g nosača, uz porast na 11% pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji od 310 mg/g nosača (Slika 4.34. (B)). Ovakav profil je tipičan za komercijalne preparate koji sadrže više enzima sa različitim katalitičkim dejstvom, kod kojih se ukupna količina vezanog proteina povećava brže od broja katalitički relevantnih molekula [285, 301]. Pored toga, na višim površinskim gustinama vezanih proteina sterni i konformacioni efekti opisani u literaturi kao molekularno nagomilavanje imobilisanih enzima mogu dodatno smanjiti dostupnu aktivnost [302, 303].

Uzimajući u obzir koncentraciju imobilisanih proteina i koncentraciju imobilisane pektinolitike aktivnosti, početna koncentracija proteina od 100 mg/g Ox-CNC nosača izdvojena je kao najpovoljnija za dalje eksperimente. Ova vrednost obezbeđuje visok prinos imobilizacije proteina, uz zadovoljavajući nivo imobilisane pektinolitike aktivnosti i efikasnu potrošnju enzima.

#### 4.3.2.4.3 Kinetika kovalentne imobilizacije preparata Pectinex® Ultra SP-L na Ox-CNC

Kinetika kovalentne imobilizacije preparata Pectinex® Ultra SP-L na Ox-CNC nosaču praćena je sa prethodno određenom optimalnom početnom koncentracijom proteina od 100 mg/g nosača, određivanjem prinosa imobilizacije proteina i prinosa imobilizacije pektinolitike aktivnosti u funkciji vremena inkubacije (Slika 4.35.).



*Slika 4.35. Uticaj vremena imobilizacije na promenu prinosa imobilizacije proteina (A) i prinosa imobilizacije aktivnosti (B) prilikom imobilizacije Pectinex® Ultra SP-L na Ox-CNC.*

*Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina: 100 mg/g nosača; 0,1 M Na-karbonatni pufer pH 9,5; vreme imobilizacije 0-18 h.*

Prinos imobilizacije proteina na Ox-CNC raste od približno 45% nakon 0,5 h do oko 80% nakon 2 h, čime se pokazuje da se već u prvih nekoliko sati zauzima najveći deo dostupnih aldehydnih vezivnih mesta na površini nosača (Slika 4.35. (A)). Nakon toga dolazi do blagog opadanja prinosa imobilizacije proteina, sa oko 65% u intervalu od 3–5 h do približno 55% nakon 18 h, što verovatno odražava delimičnu desorpciju reverzibilno adsorbovanih proteina ili reorganizaciju sloja na površini tokom ispiranja nosača [246]. Istovremeno, prinos imobilisane pektinolitike aktivnosti pokazuje suprotan trend i kontinuirano raste tokom čitavog ispitivanog intervala, od oko 8% nakon 1 h do približno 15% nakon 18 h, sa najvećim porastom u prvih 5 h, dok dalje produženje inkubacije donosi samo marginalno povećanje (Slika 4.35. (B)).

Ovakav naizgled paradoksalan odnos (istovremeni pad prinosa proteina i rast prinosa aktivnosti) u skladu je sa dvostepenim mehanizmom kovalentne imobilizacije koji je opisan za nosače sa elektrofilnim aldehydним grupama, kao što su gliksal-agarozni nosači sa sličnim mehanizmom vezivanja [299, 304]. U prvom, bržem koraku, enzimi se adsorbuju na površinu nosača nespecifičnim interakcijama, pri čemu se samo deo molekula pozicionira u orijentaciji u kojoj su  $\epsilon$ -amino grupe lizinskih ostataka dovoljno blizu aldehydnih mesta na Ox-CNC da bi došlo do nukleofilnog napada i formiranja Šifove baze. U drugom, sporijem koraku, povoljno orijentisani molekuli postepeno formiraju stabilne kovalentne veze, dok molekuli adsorbovani u nepovoljnoj orijentaciji ostaju

reverzibilno vezani i tokom ispiranja nosača bivaju delimično uklonjeni, što se manifestuje kao pad ukupnog prinosa imobilisanih proteina nakon 2 h. Ako bi rast prinosa aktivnosti u istom intervalu zaista bio posledica selektivnog zadržavanja katalitički aktivnih endopoligalakturonaznih molekula sa povoljnom orijentacijom, to bi značilo da kovalentno vezivanje deluje kao filter koji obogaćuje ovaj sistem aktivnim komponentama smeše. Ova hipoteza se direktno proverava desorpcionim eksperimentima, prikazanim u nastavku, kojima se kvantifikuje udeo kovalentno vezanog enzima u ukupnoj izmerenoj aktivnosti imobilizata.

#### 4.3.2.4.4 Desorpcija preparata Pectinex® Ultra SP-L imobilisanog na Ox-CNC

Radi kvantifikacije udela kovalentno vezanog enzima naspram reverzibilno adsorbovanog na Ox-CNC nosaču, sprovedeni su desorpcioni eksperimenti na imobilisanim enzimima dobijenim sa optimalnom početnom koncentracijom proteina od 100 mg/g nosača, nakon 1 i 5 h imobilizacije. Uzorci su tretirani rastvorom  $\text{CaCl}_2$  i nejonskim deterdžentom Triton X-100, kako bi se uklonili molekuli adsorbovani elektrostatičkim i hidrofobnim interakcijama, dok kovalentno vezani molekuli ostaju na nosaču.

Dobijeni rezultati, pokazuju da pektinaza imobilisana na Ox-CNC nakon 1 h zadržava svega 37% početne imobilisane aktivnosti posle desorpcije, što ukazuje da je u ranoj fazi procesa dominantan doprinos reverzibilno adsorbovanih molekula enzima slabim interakcijama sa hidrofilnom i naelektrisanom površinom nosača. Nakon 5 h imobilizacije, udeo preostale aktivnosti posle tretmana  $\text{CaCl}_2$ /Triton X-100 raste na 83%, što pokazuje da se tokom produžene inkubacije formiraju kovalentne veze između aldehidnih grupa Ox-CNC i amino grupa enzima, najverovatnije putem dvostepenog procesa imobilizacije enzima na nosače sa elektrofilnim reaktivnim grupama opisanim u literaturi [66, 219].

Imajući u vidu da se pri imobilizaciji kompleksnog preparata prate isključivo komponente sa pektinolitičkom aktivnošću, dok ostale komponente doprinose ukupnoj imobilisanoj masi proteina ali ne i pektinolitičkoj aktivnosti, može se pretpostaviti da realni udeo kovalentno vezanih katalitički aktivnih molekula endopoligalakturonaze na Ox-CNC nosaču ne odgovara vrednosti preostale aktivnosti nakon desorpcije. On je verovatno i viši, jer deo neaktivnih proteinskih frakcija može kompetitivno zauzimati kovalentna vezivna mesta [246]. Na osnovu ovih rezultata, za dalja ispitivanja odabran je preparat dobijen kovalentnom imobilizacijom na Ox-CNC tokom 5 h inkubacije, koji obezbeđuje visok udeo kovalentno vezanog enzima uz zadovoljavajuću imobilisanu pektinolitičku aktivnost, dok će rezultati za GA-amino-CNC i detaljno poređenje dva nosača biti razmotreni u sledećem poglavlju.

#### 4.3.2.5 Kovalentna imobilizacija preparata Pectinex® Ultra SP-L na GA-aktiviranu amino-modifikovanu nanocelulozu

GA-amino-CNC, dobijen aktivacijom amino-CNC glutaraldehydom, obezbeđuje udaljenost između površine nosača i enzima, što prema rezultatima opisanim u sekciji o ksilanazi može doprineti povoljnijoj orijentaciji enzima i očuvanju katalitičke aktivnosti [219].

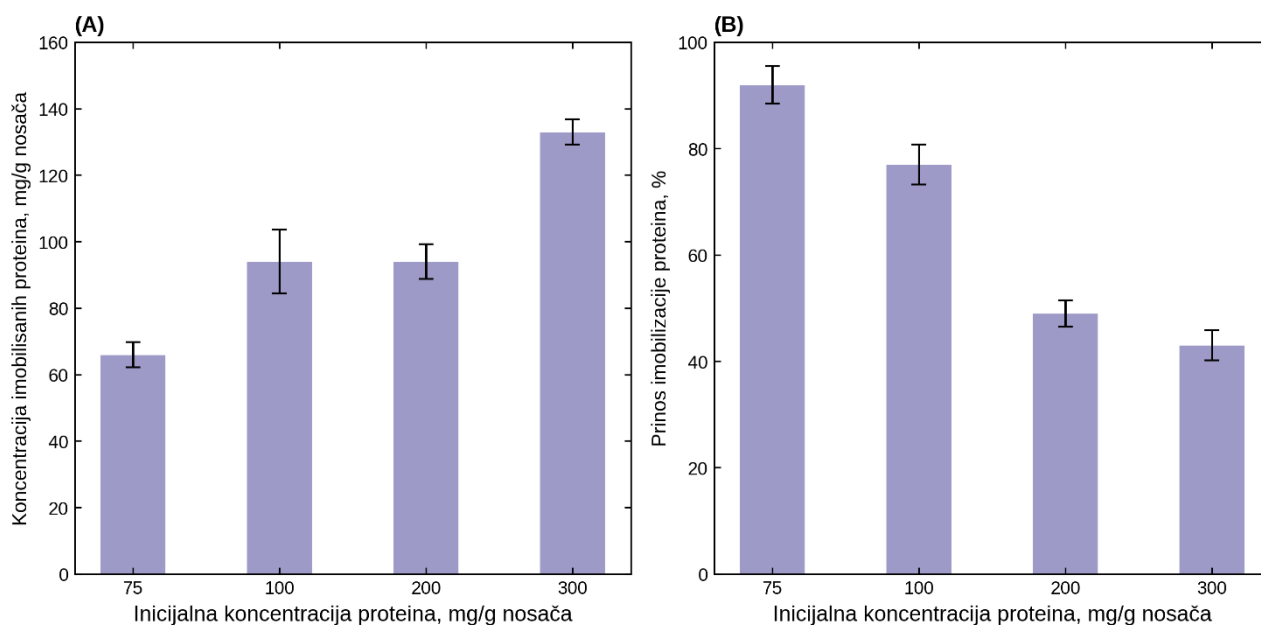
Mehanizam kovalentne imobilizacije endopoligalakturonaze na GA-amino-CNC nosaču odgovara prikazu datom na šemi 6, gde glutaraldehyd formira most između amino-grupa nanoceluloze i amino-grupa lizinskih ostataka na površini enzima putem nastanka iminskih veza, pri čemu dužina glutaraldehydnog mosta i određena konformaciona sloboda koju on omogućava doprinose manjoj rigidnosti vezivanja enzima za površinu nosača u poređenju sa vezivanjem direktno na površinu nosača kao u slučaju Ox-CNC.

Pored dominantnih kovalentnih veza, na površini GA-amino-CNC mogu se uspostaviti i dodatne vodonične veze i elektrostatičke interakcije između amino grupa nosača i naelektrisanih ostataka enzima, koje doprinose inicijalnoj adsorpciji i orijentaciji molekula pre konačnog „zaključavanja“ u kovalentno vezano stanje [219, 246].

Polazeći od opisanog mehanizma, uslovi kovalentne imobilizacije pektinaza na GA-amino-CNC podešeni su tako da obezbede efikasnu reakciju glutaraldehidno aktiviranih nosača sa amino-grupama enzima, uz očuvanje stabilnosti pektinolitičkih enzima iz preparata, što se omogućava korišćenjem 0,1 M Na-fosfatnog pufera pH 7,5 i produženog vremena inkubacije. U narednim potpoglavljima detaljno su analizirani uticaj inicijalne koncentracije proteina, kinetika kovalentnog vezivanja i desorpcija adsorbovanih enzima, sa ciljem identifikacije uslova pod kojima GA-amino-CNC obezbeđuje najpovoljniji kompromis između udela kovalentno vezanog enzima i očuvane pektinolitičke aktivnosti.

#### 4.3.2.5.1 Efikasnost imobilizacije proteina preparata Pectinex® Ultra SP-L na GA-amino-CNC

Kovalentno vezivanje na GA-amino-CNC izvodi se na nižoj pH vrednosti (7,5) nego na Ox-CNC (9,5), jer pri višim pH vrednostima glutaraldehid reaguje sa amino grupama susednih nanokristala nosača i dovodi do njihovog međusobnog umrežavanja i aglomeracije. Zbog nižeg pH manji je i udeo deprotonovanih amino grupa enzima, pa se očekuje manji broj formiranih kovalentnih veza i niži ukupan kapacitet vezivanja. Da bi se utvrdilo kako početna koncentracija proteina utiče na imobilizaciju u ovim uslovima, ona je varirana u opsegu 75–300 mg/g nosača, a rezultati su prikazani na slici 4.36.



*Slika 4.36. Uticaj inicijalne koncentracije proteina na: koncentraciju imobilisanih proteina (A) i prinos imobilizacije proteina (B) prilikom imobilizacije Pectinex® Ultra SP-L na GA-amino-CNC.*

*Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina: 75, 100, 200, 300 mg/g nosača; 0,1 M Na-fosfatni pufer pH 7,5; vreme imobilizacije 18 h.*

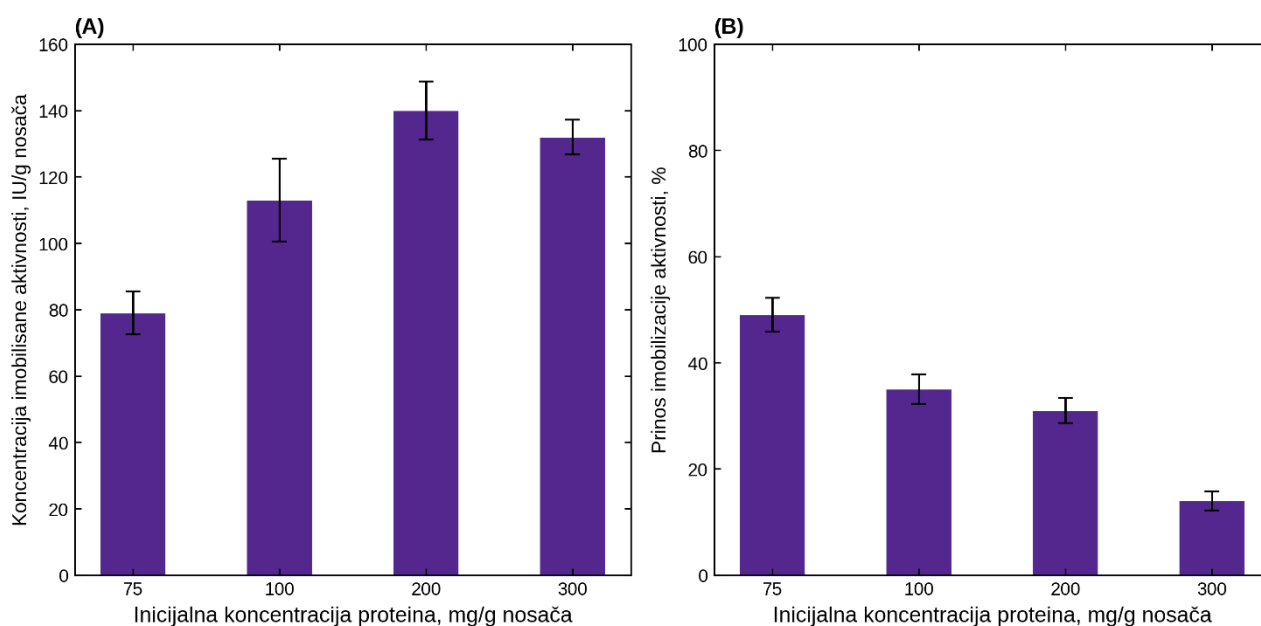
Koncentracija imobilisanih proteina enzimskog preparata Pectinex® Ultra SP-L na GA-amino-CNC nosaču raste sa povećanjem inicijalne koncentracije proteina u opsegu od 75 do 300 mg/g nosača, od imobilisane koncentracije od 68 mg/g nosača do oko 134 mg/g nosača (Slika 4.36. (A)). Ovakav trend pokazuje da površinske amino-grupe, aktivirane glutaraldehidom, obezbeđuju dovoljno reaktivnih mesta za kovalentno vezivanje proteinskih komponenti u celom ispitivanom opsegu, pri čemu se u intervalu inicijalnih koncentracija proteina od 100 do 200 mg/g nosača uočava izražen plato gde su

vrednosti koncentracije imobilisanih proteina dobijene sa ovim početnim koncentracijama praktično identične (94–95 mg/g nosača). Dalje povećanje inicijalne koncentracije na 300 mg/g dovodi do dodatnog porasta vezane količine proteina, što verovatno odražava kombinovani doprinos novih kovalentnih veza na preostalim reaktivnim mestima i nespecifične adsorpcije na površini nosača.

Prinos imobilizacije proteina na GA-amino-CNC opada sa povećanjem inicijalne koncentracije proteina, sa 91% na 43% (Slika 4.36. (B)). Ovo je isti obrazac kao na Ox-CNC i posledica je ograničenog broja reaktivnih mesta na nosaču [299]. U narednom koraku analizirano je koliki deo vezanog proteinskog sloja čine katalitički aktivne endopoligalakturonaze [219].

#### 4.3.2.5.2 Efikasnost imobilizacije aktivnosti preparata Pectinex® Ultra SP-L na GA-amino-CNC

Pošto sama količina vezanog proteina ne ukazuje koliko od te frakcije čine katalitički funkcionalne endopoligalakturonaze, paralelno sa praćenjem koncentracije imobilisanih proteina određena je i koncentracija imobilisane pektinolitičke aktivnosti i prinos imobilizacije aktivnosti sa istim eksperimentalnim uslovima (Slika 4.37).



*Slika 4.37. Uticaj inicijalne koncentracije proteina na koncentraciju imobilisane aktivnosti (A) i prinos imobilizacije aktivnosti (B) prilikom imobilizacije Pectinex® Ultra SP-L na GA-amino-CNC.*

*Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina: 75, 100, 200, 300 mg/g nosača; 0,1 M Na-fosfatni pufer pH 7,5; vreme imobilizacije 18 h.*

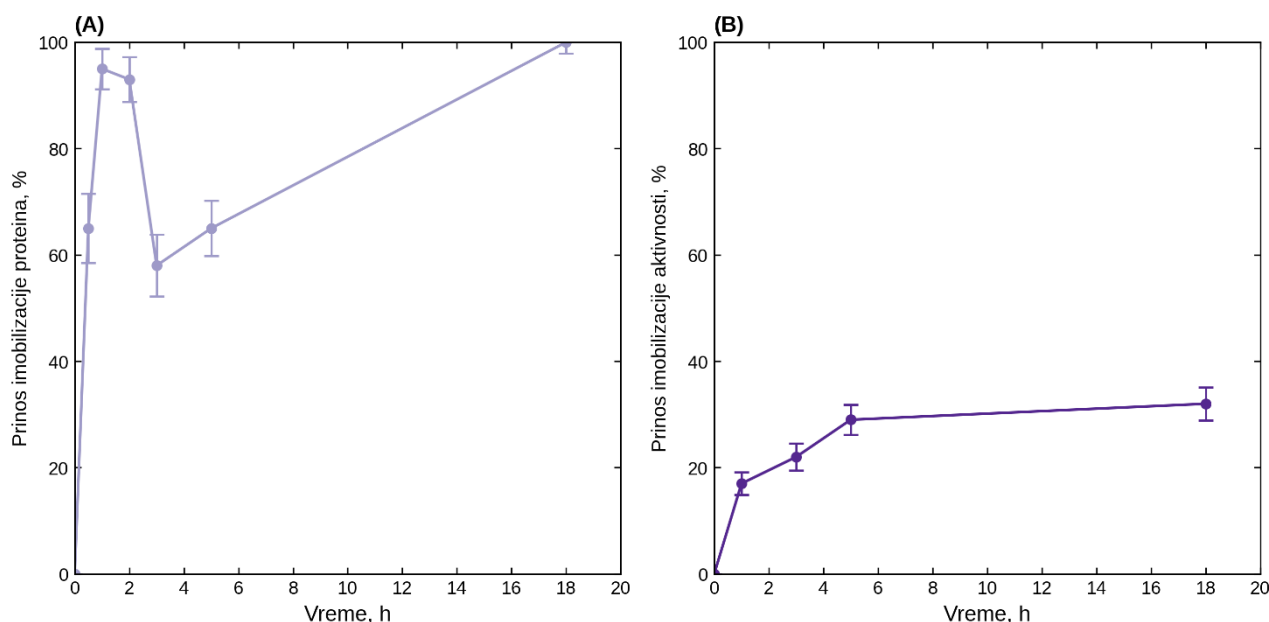
Koncentracija imobilisane pektinolitičke aktivnosti na GA-amino-CNC nosaču raste sa povećanjem inicijalne koncentracije proteina od 75 mg/g nosača do 200 mg/g nosača, od 79 IU/g nosača do 140 IU/g nosača, dok se pri inicijalnoj koncentraciji proteina od 300 mg/g nosača beleži nešto niža vrednost aktivnosti od oko 132 IU/g nosača (Slika 4.37. (A)). Porast imobilisane aktivnosti je izraženiji do 200 mg/g nosača (sa 79 na 140 IU/g nosača, gotovo dvostruko), dok povećanje inicijalne koncentracije na 300 mg/g nosača ne donosi dalji porast, već blagi pad na oko 132 IU/g nosača. Ovakav profil ukazuje da porast početne koncentracije od 200 mg/g dovodi do povećanja broja katalitički funkcionalnih endopoligalakturonaznih molekula vezanih preko glutaraldehidnog mosta, dok dodatno povećanje koncentracije proteina na 300 mg/g ne donosi proporcionalan porast aktivnosti, zbog manje povoljne orijentacije i međusobnih steričnih smetnji između molekula enzima, kao i moguće imobilizacije proteina iz preparata koji ne ispoljavaju pektinolitičku aktivnost [219].

Prinos imobilizacije pektinolititičke aktivnosti na GA-amino-CNC opada sa porastom inicijalne koncentracije proteina, sa 18% na oko 7% (Slika 4.37. (B)). Ovakav pad prinosa, uz istovremeno povećanje apsolutne vrednosti imobilisane aktivnosti u opsegu nižih koncentracija, tipičan je za imobilizaciju enzimskih preparata sa različitim katalitičkim aktivnostima, kod kojih se ukupna količina vezanog proteina povećava brže od broja katalitički aktivnih molekula, a na višim početnim koncentracijama raste udeo proteina vezanih u konformacijama ili mikrookruženjima koja nisu optimalna za katalizu ili nemaju uticaj na ispitivani supstrat [219].

Posmatrajući istovremeno koncentraciju imobilisane aktivnosti i efikasnu primenu enzima, početna koncentracija proteina od 100 mg/g GA-amino-CNC nosača izdvojena je kao najpovoljnija za dalje eksperimente, budući da obezbeđuje visok prinos imobilizacije proteina i značajnu imobilisanu pektinolititičku aktivnost.

#### 4.3.2.5.3 Kinetika imobilizacije preparata Pectinex® Ultra SP-L na GA-amino-CNC

Kinetika imobilizacije na GA-amino-CNC nosaču praćena je sa početnom koncentracijom proteina od 100 mg/g nosača, određivanjem prinosa imobilizacije proteina i prinosa imobilisane pektinolititičke aktivnosti u funkciji vremena (Slika 4.38.)



Slika 4.38. Uticaj vremena imobilizacije na promenu prinosa imobilizacije proteina (A) i prinosa imobilizacije aktivnosti (B) prilikom imobilizacije Pectinex® Ultra SP-L na GA-amino-CNC.

Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina: 100 mg/g nosača; 0,1 M Na-fosfatni pufer pH 7,5; vreme imobilizacije 0-18 h.

Prinos imobilizacije proteina raste veoma brzo u prvom satu imobilizacije, dostižući vrednosti bliske potpunom vezivanju (oko 95%), što ukazuje da se gotovo sve proteinske komponente preparata u početnoj fazi vezuju pre svega adsorpcijom i eventualnim brzim formiranjem kovalentnih veza (Slika 4.38. (A)). U nastavku procesa uočava se smanjenje prinosa imobilizacije proteina oko 2–3 h, a zatim ponovni porast do maksimalne vrednosti nakon 18 h. Ovakav profil sa inicijalnim skokom praćenim prolaznim padom karakterističan je za višekomponentne enzimske preparate i može se objasniti kompetitivnim istiskivanjem adsorbovanih komponenti tokom imobilizacije (Vromanov efekat) [296]. U ranoj fazi imobilizacije na nosač se adsorpcijom neselektivno vežu sve proteinske komponente preparata, dok se u kasnijoj fazi kompetitivnim mehanizmom desorbuju one komponente koje nisu uspostavile kovalentne veze, pri čemu na površini ostaju kovalentno fiksirani molekuli [305, 306]. Ponovni porast prinosa proteina nakon 5 h može odražavati postepeno

formiranje dodatnih kovalentnih veza između preostalih adsorbovanih molekula i aldehidnih grupa glutaraldehidnih mostova, što stabilizuje proteinski sloj i sprečava dalju desorpciju [219].

Prinos imobilizacije pektinolitičke aktivnosti na GA-amino-CNC raste sporije, ali gotovo monotono u ispitivanom intervalu, od oko 11% nakon 1 h do 21% nakon 18 h (Slika 4.38. (B)). Suprotnost između brzog dostizanja platoa kod prinosa proteina i postepenog rasta prinosa aktivnosti u skladu je sa dvostepenim mehanizmom imobilizacije: u prvom, bržem koraku enzimi se neselektivno adsorbuju na površinu GA-amino-CNC preko različitih interakcija sa glutaraldehidnim mostovima i preostalim amino grupama nosača, dok se u drugom, sporijem koraku oni molekuli čije su  $\epsilon$ -amino grupe lizinskih ostataka prostorno dobro pozicionirane postepeno kovalentno vezuju formiranjem Šifovih baza sa aldehidnim krajevima glutaraldehida. Kontinuirani rast prinosa aktivnosti kroz ceo ispitivani interval sugerše da proces kovalentnog fiksiranja katalitički aktivnih komponenti smeše nije zasićen ni nakon 18 h, mada je dinamika sporija u kasnijoj fazi.

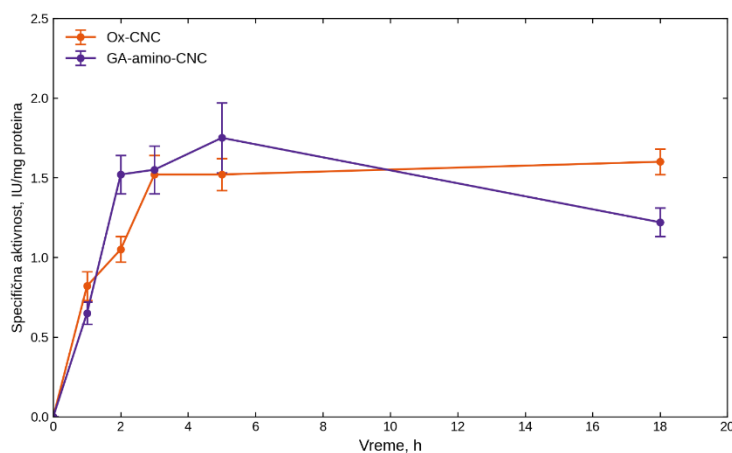
Prikazani rezultati pokazuju da GA-amino-CNC obezbeđuje brzo početno vezivanje komponenti preparata, uz postepeno kovalentno fiksiranje katalitički aktivnih molekula tokom produžene inkubacije, preko Šifovih baza između aldehidnih krajeva glutaraldehidnih mostova i amino grupa lizinskih ostataka enzima [219].

Imajući u vidu da se pektinolitička aktivnost prati kao jedini pokazatelj katalitičke efikasnosti imobilisanog preparata, dok ostale proteinske komponente preparata doprinose ukupnoj koncentraciji vezanog proteina bez doprinosa izmerljivoj aktivnosti, prikazani udeo preostale aktivnosti nakon desorpcije predstavlja samo udeo kovalentno vezanih enzima sa pektinolitičkom aktivnošću. Na osnovu dobijenih rezultata, za dalja ispitivanja primene odabran je preparat dobijen imobilizacijom u trajanju od 5 h.

#### *4.3.2.6 Uporedna analiza kovalentne imobilizacije preparata Pectinex® Ultra SP-L na Ox-CNC i GA-amino-CNC*

Na Ox-CNC i GA-amino-CNC vezuje se slična koncentracija proteina u celom ispitivanom opsegu početnih koncentracija, uz očekivano opadanje prinosa imobilizacije proteina sa porastom inicijalne koncentracije, kako se i očekuje prilikom imobilizacije velikih molekula proteina na nosače [219]. Koncentracija imobilisane pektinolitičke aktivnosti raste sa porastom početne koncentracije proteina na oba nosača, ali ne na isti način: u opsegu inicijalne koncentracije proteina od 100–200 mg/g nosača, na GA-amino-CNC se postižu više vrednosti imobilisane koncentracije enzima (113–139 IU/g nosača) nego na Ox-CNC (79–106 IU/g nosača), što ukazuje da glutaraldehidni most sa umerenim inicijalnim koncentracijama proteina pogoduje katalitički povoljnoj orijentaciji enzima, dok se na najvišoj inicijalnoj koncentraciji proteina odnos obrće u korist Ox-CNC. Posmatrajući sve parametre, kao najpovoljnija za oba nosača izdvaja se početna koncentracija proteina od 100 mg/g nosača, koja obezbeđuje visok prinos imobilizacije proteina i zadovoljavajuću imobilisanu aktivnost uz efikasnu potrošnju enzima.

Vremenski profili specifične aktivnosti (Slika 4.39) pokazuju razlike između dva nosača koje su u skladu sa različitim načinom vezivanja.



*Slika 4.39. Promena specifične aktivnosti kovalentno imobilisanog Pectinex® Ultra SP-L na Ox-CNC i GA-amino-CNC u zavisnosti od vremena imobilizacije. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 100 mg/g nosača; Ox-CNC – 0,1 M Na-karbonatni pufer pH 9,5; GA-amino-CNC – 0,1 M Na-fosfatni pufer pH 7,5; vreme imobilizacije 0–18 h.*

Specifična aktivnost se dobija kao količnik imobilisane aktivnosti i koncentracije imobilisanih proteina, pa njen tok ne prati nužno oblik nijedne od te dve krive: maksimum u krivoj vezanih proteina, ako nije praćen istovremenim porastom aktivnosti, u krivoj specifične aktivnosti se ispoljava kao prevoj ili lokalni minimum. Na GA-amino-CNC specifična aktivnost raste od 0,8 IU/mg proteina nakon 1 h na 1,7 IU/mg proteina posle 5 h, nakon čega opada u intervalu od 5 do 18 h, što ukazuje da glutaraldehidni most pogoduje brzom formiranju katalitički povoljnog sloja, ali da nakon dužeg vremena inkubacije raste udeo molekula u nepovoljnoj orijentaciji usled gušćeg rasporeda vezanih proteina. Na Ox-CNC specifična aktivnost raste postepeno od 0,75 IU/mg proteina nakon 1 h do 1,5 IU/mg proteina nakon 5 h i zatim ulazi u plato bez naknadnog pada, što se može objasniti time da direktne kovalentne veze između aldehidnih grupa nosača i amino grupa lizinskih ostataka enzima fiksiraju molekul u stabilnoj konformaciji i sprečavaju naknadne konformacione promene nakon dužeg vremena inkubacije. Desorpcija pri vremenu imobilizacije od 5 h potvrđuje visok udeo kovalentno vezanih molekula na oba nosača. Nakon tretmana sa  $\text{CaCl}_2$ /Triton X-100 zadržava se 83% početne pektinolitičke aktivnosti na Ox-CNC i 79% na GA-amino-CNC, što ukazuje na nešto veći udeo molekula prevedenih iz adsorbovanog u ireverzibilno kovalentno vezano stanje na Ox-CNC.

Postignuti prinosi imobilizacije proteina (65% na oba nosača) i aktivnosti (14% za Ox-CNC i 19% za GA-amino-CNC), pri vremenu imobilizacije od 5 h, uporedivi su sa literaturno opisanim kovalentnim sistemima za imobilizaciju pektinolitičkih preparata, gde se prinosi imobilizacije aktivnosti kreću u širokom opsegu zavisno od metode aktivacije nosača [32, 307, 308]. Posmatrajući zajedno sve ispitivane parametre teško je izdvojiti najadekvatniji nosač između Ox-CNC i GA-amino-CNC: na GA-amino-CNC se ostvaruju nešto viši prinosi imobilizacije proteina i aktivnosti i više vrednosti imobilisane aktivnosti pri nižim početnim koncentracijama proteina, dok Ox-CNC obezbeđuje stabilniju specifičnu aktivnost tokom produžene imobilizacije i nešto viši udeo kovalentno vezanih molekula nakon desorpcije. Ovako bliske vrednosti ključnih parametara ukazuju da oba nosača obezbeđuju katalitički podjednako efikasne sisteme za imobilizaciju preparata Pectinex® Ultra SP-L, pa će konačan izbor biti određen rezultatima stabilnosti prilikom višekratne upotrebe i karakteristikama hidrolize realnih pektinskih supstrata, koji će biti prikazani u poglavlju o primeni imobilisanih enzima.

#### *4.3.2.7 Poređenje adsorpcije i kovalentne imobilizacije preparata Pectinex® Ultra SP-L na nanocelulozi*

Sumirani parametri imobilizacije na CNC, amino-CNC, Ox-CNC i GA-amino-CNC prikazani su u tabeli 4.3.

*Tabela 4.3. Poređenje parametara imobilizacije preparata Pectinex® Ultra SP-L na CNC, amino-CNC, Ox-CNC i GA-amino-CNC pri optimalnim uslovima za svaki nosač (početna koncentracija proteina 100 mg/g nosača; CNC pH 5, 2 h; amino-CNC pH 6, 2 h; Ox-CNC pH 9,5, 5 h; GA-amino-CNC pH 7,5, 5 h).*

| Nosač        | Koncentracija imobilisanih proteina (mg/g nosača) | Prinos imobilizacije proteina (%) | Koncentracija imobilisane aktivnosti (IU/g nosača) | Prinos imobilizacije aktivnosti (%) | Specifična aktivnost (IU/mg proteina) |
|--------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| CNC          | 44                                                | 40                                | 90                                                 | 14                                  | 2,00                                  |
| amino-CNC    | 69                                                | 63                                | 100                                                | 15                                  | 1,45                                  |
| Ox-CNC       | 60                                                | 56                                | 85                                                 | 14                                  | 1,50                                  |
| GA-amino-CNC | 70                                                | 64                                | 112                                                | 19                                  | 1,70                                  |

Specifična aktivnost pektinaza imobilisanih na različitim nosačima kreće se od 1,45 IU/mg proteina na amino-CNC do 2,00 IU/mg proteina na CNC, sa vrednostima 1,50 IU/mg proteina za Ox-CNC i 1,70 IU/mg proteina za GA-amino-CNC, što u odnosu na specifičnu aktivnost slobodnog enzima (6,0 IU/mg proteina) odgovara udelima od 33% na CNC, 24% na amino-CNC, 25% na Ox-CNC i 28% na GA-amino-CNC. Razlike u specifičnim aktivnostima između adsorpcije i kovalentne imobilizacije su znatno manje nego što bi se očekivalo za prečišćene enzime, što je direktna posledica sastava preparata: dok ukupno vezana masa proteina uključuje sve proteinske frakcije, merenoj pektinolitičkoj aktivnosti doprinose samo komponente sa endopoligalakturonaznom aktivnošću prema korišćenom supstratu, pa prikazane specifične aktivnosti predstavljaju potcenjene vrednosti stvarne katalitičke efikasnosti imobilisanih endopoligalakturonaznih molekula. Ovaj efekat „razblaženja aktivnosti“ neaktivnim proteinskim frakcijama karakterističan je za industrijske preparate i mora se uzeti u obzir prilikom poređenja sa literaturnim podacima za prečišćene enzime [219, 299], zbog čega su za poređenje između nosača relevantniji pokazatelji udeo kovalentno vezanog enzima i prinos imobilizacije aktivnosti.

Najpovoljniji kompromis za imobilizaciju preparata Pectinex® Ultra SP-L ostvaren je na GA-amino-CNC: imobilisana aktivnost 112 IU/g nosača (19% prinosa), specifična aktivnost 1,70 IU/mg proteina i 79% kovalentno vezane aktivnosti nakon 5 h. Ox-CNC postiže nešto nižu ukupnu i specifičnu aktivnost (85 IU/g nosača; 1,50 IU/mg proteina), ali viši udeo kovalentno vezanog enzima (83%), pa predstavlja efikasnu alternativu kada je prioritet maksimalna stabilnost. Ovakav obrazac, da glutaraldehidni most pogoduje očuvanju katalitičke aktivnosti, dok direktno kovalentno vezivanje na aldehidne grupe obezbeđuje veći udeo stabilno vezanog enzima, u skladu je sa literaturno opisanim trendovima za kovalentnu imobilizaciju enzima na polisaharidnim nosačima [219, 307].

### 4.3.3 Imobilizacija proteaza na nanocelulozu

Protease (E.C. 3.4) katalizuju hidrolizu peptidnih veza čime omogućavaju formiranje polipeptida, oligopeptida i slobodnih aminokiselina. Zbog visoke katalitičke efikasnosti i selektivnosti čine oko 60% svetskog tržišta industrijskih enzima i široko se primenjuju u prehrambenoj industriji, deterdžentima, farmaceuticima i kožarstvu [309, 310]. Prema poziciji peptidne veze na koju deluju, dele se na egzopeptidaze (aminopeptidaze i karboksipeptidaze) i endopeptidaze, dok se prema mehanizmu delovanja i hemijskoj prirodi aktivnog centra klasifikuju u četiri grupe: serinske, cisteinske, aspartatne proteaze i metaloproteaze [309, 310].

Jedan od ključnih izazova u industrijskoj primeni proteaza jeste autoliza, odnosno hidroliza enzima katalizovana sopstvenom proteolitičkom aktivnošću, koja dovodi do progresivne inaktivacije i pada stabilnosti preparata tokom primene [311]. Imobilizacija proteaza na čvrste nosače pruža efikasan

način za rešavanje ovog problema, budući da kovalentno vezivanje za nosač ograničava pokretljivost molekula enzima i smanjuje verovatnoću međusobnog kontakta neophodnog za autolizu, a istovremeno povećava termičku i operativnu stabilnost uz omogućavanje višestruke upotrebe u uzastopnim reakcionim ciklusima [262, 311].

U ovoj disertaciji ispitana je kovalentna imobilizacija dva komercijalna proteazna preparata, Alcalase® i Flavourzyme®, na nosače Ox-CNC i GA-amino-CNC, sa ciljem dobijanja stabilnih i višekratno upotrebljivih biokatalitičkih sistema za hidrolizu proteinskih frakcija iz nusproizvoda prehrambene industrije, kao što je suncokretova sačma [228, 312]. Preparat Alcalase® sadrži dominantno endoproteaznu aktivnost, dok preparat Flavourzyme® sadrži smešu endo- i egzopeptidaza, pa kombinovana primena ova dva preparata u sekvencijalnoj hidrolizi proteinskih supstrata daje komplementarno dejstvo: Alcalase® razlaže intaktne proteine na peptidne fragmente, a Flavourzyme® te fragmente hidrolizuje do slobodnih aminokiselina i di-tripeptida [312, 313].

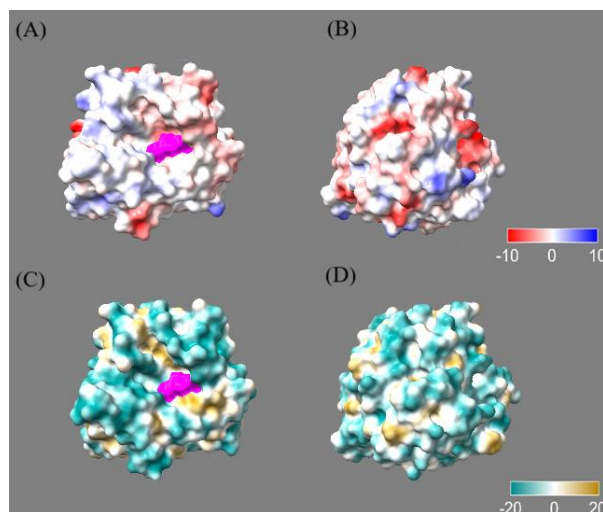
U skladu sa pristupom primenjenim u prethodnim poglavljima za ksilanazu i pektinazu, za oba proteazna preparata inicijalno su ispitane obe strategije imobilizacije: adsorpcija (na CNC i amino-CNC) i kovalentna imobilizacija (na Ox-CNC i GA-amino-CNC). Međutim, preliminarni rezultati pokazali su da se adsorpcijom na nosače ne obezbeđuju zadovoljavajuće karakteristike imobilisanih preparata proteaza, pa su detaljne studije i karakterizacija sprovedene isključivo za kovalentnu imobilizaciju na Ox-CNC i GA-amino-CNC.

#### 4.3.3.1 Imobilizacija enzimskog preparata Alcalase®

Alcalase® je komercijalni proteazni preparat koji se dominantno sastoji od serinske endoproteaze subtilizina Carlsberg (EC 3.4.21.14), izolovane iz soja bakterije *B. licheniformis* [314]. Karakteriše ga visoka proteolitička aktivnost na višim pH vrednostima (optimum pH 7,0–9,0) i temperaturama 50–60 °C [228]. Molekulska masa aktivne forme iznosi oko 27 kDa, a katalitički centar čini klasična serinska trijada (His64, Asp32, Ser221) gde serinski ostatak vrši nukleofilni napad na peptidne veze [315]. Na površini molekula nalazi se šest amino grupa lizina, smeštenih pretežno na strani molekula suprotnoj od aktivnog centra, što je ključno za razumevanje mehanizma kovalentne imobilizacije na nanocelulozne nosače [316]. Izoelektrična tačka preparata Alcalase® iznosi pI ≈ 9,4 pa je na pH 7,5 enzim neto pozitivno naelektrisan i ostvaruje privlačne elektrostatičke interakcije sa negativno naelektrisanim grupama na površini CNC, dok je na pH 9,5 ≈ pI neto naelektrisanje enzima blizu nule, što minimizuje globalne elektrostatičke interakcije sa nosačem. U oba slučaja, deo ε-amino grupa lizinskih ostataka (pKa 10,5) na ovim pH vrednostima deprotonovan je samo u maloj meri (na pH 7,5 svega oko 0,1%), ali je i taj mali udeo dovoljan da postepeno reaguje sa aldehidnim grupama nosača uz formiranje Šifovih baza.

U dosadašnjoj literaturi opisana je uspešna imobilizacija preparata Alcalase® na više tipova nosača: kovalentno na gliksil-agarozu [317, 318] i agarozu modifikovanu glutaraldehidom [316], adsorpcijom i kovalentno na hitozan i natrijum-alginat [319, 320], kao i na Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-hitozan magnetne nanočestice [321] i poliakrilonitrilna nanovlakna [322].

Imobilizacija preparata Alcalase® na nosače značajno zavisi od raspodele površinskih grupa enzima, naročito od položaja lizinskih ostataka (potencijalnih mesta za kovalentno vezivanje) i raspodele naelektrisanja u odnosu na aktivni centar. Pri tome su za kovalentno vezivanje relevantni pre svega lizinski ostaci izloženi na površini molekula, odnosno dostupni reakcionom medijumu, čija je pKa vrednost bliska vrednosti za slobodnu aminokiselinu, dok se kod ostataka smeštenih u unutrašnjosti molekula ta vrednost pomera, najčešće naniže, pa oni u manjoj meri doprinose broju formiranih kovalentnih veza [269]. Da bi se ovi parametri sagledali u kontekstu imobilizacije, izvršena je analiza trodimenzionalne strukture preparata Alcalase® (PDB 1SBC) sa prikazom raspodele elektrostatičkog potencijala i polarnih/nepolarnih regija na površini molekula (Slika 4.40).



*Slika 4.40. Trodimenzionalna struktura molekula endoproteaze iz preparata Alcalase® iz Bacillus licheniformis (PDB kod 1SBC) [217] sa prikazom aktivnog centra i raspodele površinskog naelektrisanja i polarnih/nepolarnih regija.: Prednja strana molekula gde se vidi aktivni centar obojen u magenta, negativno naelektrisanje molekula obojeno u crveno, a pozitivno naelektrisanje u plavo (A); Rotacija molekula za 180° u x-y ravni, negativno naelektrisanje molekula obojeno u crveno, pozitivno u plavo (B); Prednja strana molekula gde se vidi aktivni centar obojen u magenta, polarne regije molekula obojene u svetlo plavo, nepolarne u žuto (C); Rotacija molekula za 180° u x-y ravni, polarne regije molekula obojene u svetlo plavo, nepolarne u žuto (D).*

Raspodela naelektrisanja površine prikazana je kvalitativno, na osnovu standardnih stanja aminokiselinskih ostataka koja odgovaraju neutralnoj pH vrednosti, pa prikaz služi za poređenje relativnog rasporeda pozitivnih i negativnih regiona, a ne za kvantitativnu procenu naelektrisanja pri konkretnoj pH vrednosti. Elektrostatički potencijal površine (Slike 4.40. (A) i (B)) otkriva heterogenu distribuciju naelektrisanja: na prednjoj strani molekula, neposredna okolina aktivnog centra (magenta) pretežno je neutralna do blago negativna (belo/svetlo crveno), dok su pozitivno naelektrisaniegrupe (plavo), koji potiču od ostataka lizina i arginina, pretežno u donjem i bočnom delu iste strane, na većoj udaljenosti od aktivnog centra. Zadnja strana molekula, suprotna aktivnom centru, pokazuje izraženiju zastupljenost negativno naelektrisanih grupa (crveno), koji potiču od karboksilnih ostataka aspartata i glutamata, sa sporadičnim pozitivnim površinama u donjem delu. Analiza hidrofobnosti/hidrofilnosti površine (Slike 4.40. (C) i (D)) pokazuje da je molekul preparata Alcalase® pretežno hidrofilnog karaktera (tirkizno) na oba prikaza, pri čemu su hidrofobni regije (žuto/zlatno) prisutni u ograničenoj meri, nešto izraženije na zadnjoj strani molekula, dok je okolina aktivnog centra izrazito hidrofilna.

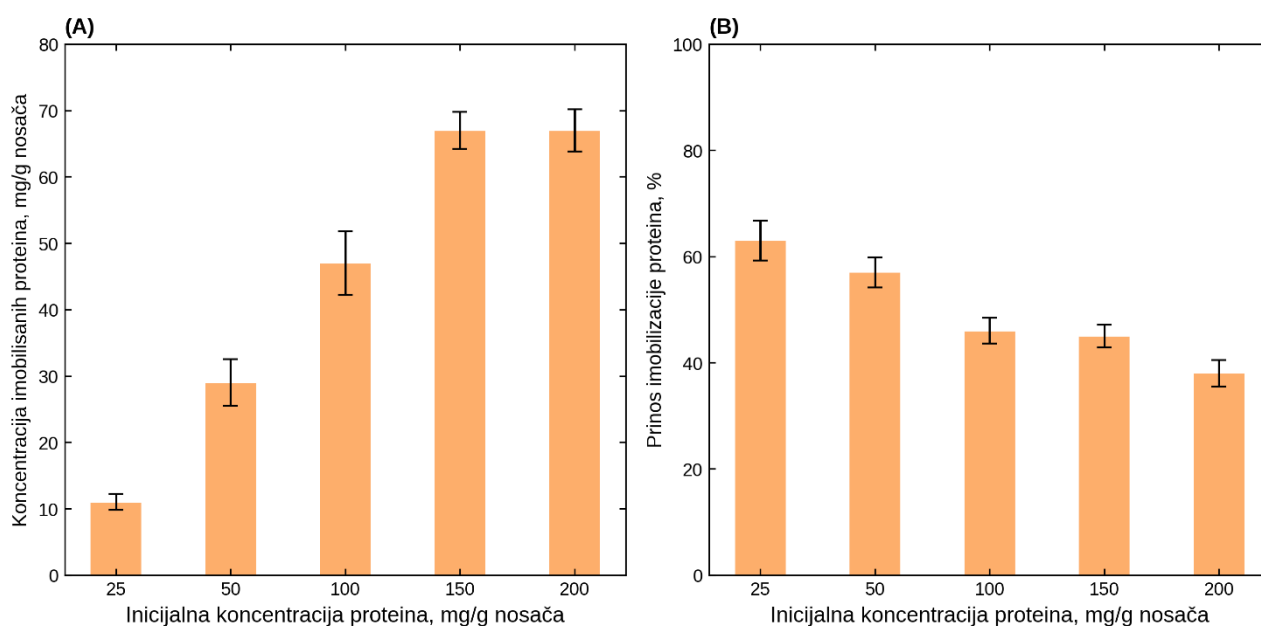
Raspodela naelektrisanja na površini preparata Alcalase® direktno utiče na adsorpciju na CNC i amino-CNC. Zbog visoke izoelektrične tačke (pI 9,4) enzim je u opsegu pH 4–9 pozitivno naelektrisan, a pH optimum preparata nalazi se u blago alkalnoj oblasti, oko pH 8. Na CNC to vodi do vezivanja preko pozitivnih grupa koji se nalaze na istoj strani kao aktivni centar, pa je on često okrenut ka nosaču i slabije dostupan supstratu. Na amino-CNC, iako postoji mogućnost povoljnije orijentacije, pozitivno naelektrisanje dovodi do elektrostatičkog odbijanja sa protonovanim amino grupama nosača, pa je ukupan kapacitet adsorpcije nizak. Zbog toga je dalja karakterizacija imobilizacije preparata Alcalase® usmerena isključivo na kovalentne nosače. Kovalentna imobilizacija se sprovodi na pH vrednostima bližim izoelektričnoj tački preparata (7,5 za GA-amino-CNC i 9,5 za Ox-CNC), pa uz formiranje Šifovih baza preko deprotonovanih amino grupa lizinskih ostataka istovremeno slabi i elektrostatičko odbijanje između enzima i nosača, što stvara povoljnije uslove za orijentaciju vezanih molekula. Za Ox-CNC i GA-amino-CNC optimizovani su uticaj inicijalne koncentracije proteina i kinetika vezivanja, čime je omogućena detaljna karakterizacija kovalentno imobilisanih preparata Alcalase®.

#### 4.3.3.1.1 Kovalentna imobilizacija preparata Alcalase® na oksidovanu nanocelulozu

Kovalentna imobilizacija preparata Alcalase® na Ox-CNC sprovedena je u 0,1 M Na-karbonatnom puferu pH 9,5, po istom mehanizmu opisanom za ksilanazu i pektinazu: aldehidne grupe nastale perjodatnom oksidacijom CNC reaguju sa deprotonovanim amino grupama lizinskih ostataka preparata Alcalase® i formiraju kovalentne (iminske) veze direktno na površini nosača. U narednim potpoglavljima analizirani su uticaj inicijalne koncentracije proteina, kinetika vezivanja i desorpcija adsorbovanog dela enzima, sa ciljem identifikacije uslova pod kojima se imobilizacijom na Ox-CNC obezbeđuje najpovoljniji kompromis između kapaciteta vezivanja, imobilisane aktivnosti i udela kovalentno vezanog enzima.

##### 4.3.3.1.1.1 Efikasnost imobilizacije proteina preparata Alcalase® na Ox-CNC

Ispitivanje uticaja inicijalne koncentracije proteina na efikasnost vezivanja preparata Alcalase® sprovedeno je u opsegu 25–200 mg/g nosača sa konstantnim uslovima pH i temperature, a dobijeni rezultati za koncentraciju imobilisanih proteina i prinos imobilizacije proteina prikazani su na slici 4.41.



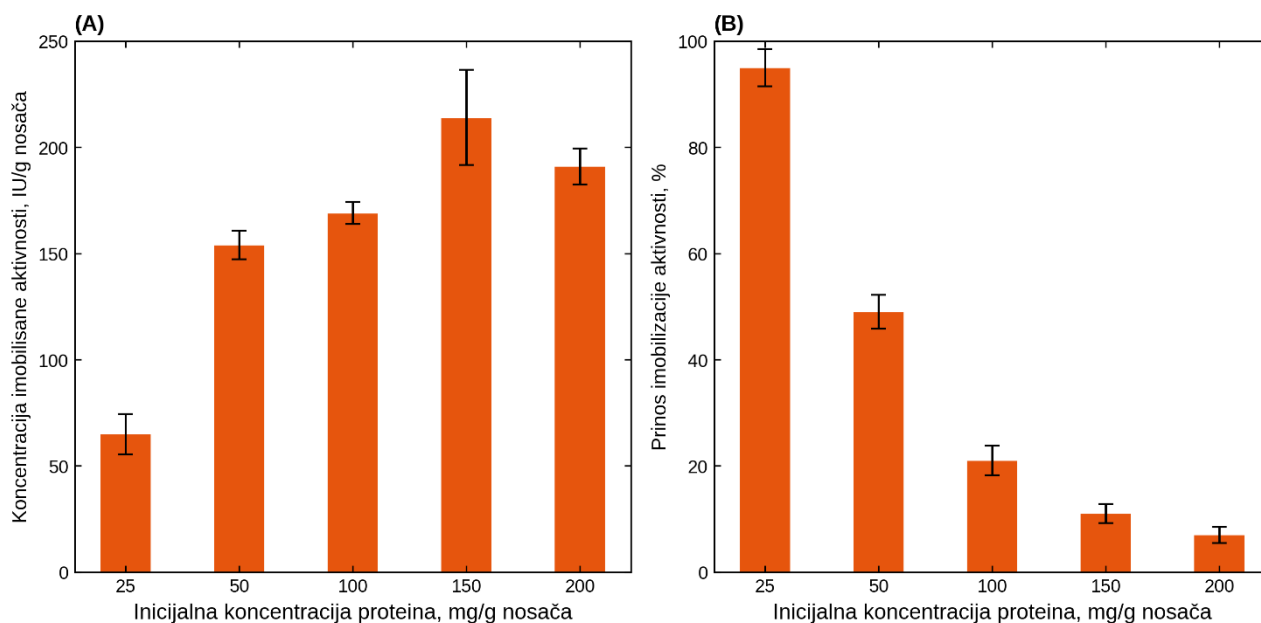
*Slika 4.41. Uticaj inicijalne koncentracije proteina na: koncentraciju imobilisanih proteina (A) i prinos imobilizacije proteina (B) prilikom imobilizacije preparata Alcalase® na Ox-CNC.*

*Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina: 25, 50, 100, 150, 200 mg/g nosača; 0,1 M Na-karbonatni pufer pH 9,5; vreme imobilizacije 18 h.*

Sa porastom inicijalne koncentracije proteina koncentracija imobilisanih proteina na Ox-CNC raste od 10 mg/g nosača pri početnoj koncentraciji proteina od 25 mg/g nosača do 67 mg/g nosača pri početnoj koncentraciji od 150 mg/g nosača, pri čemu sa početnom koncentracijom od 200 mg/g nosača dolazi do jasno izraženog platoa gde vrednost ostaje gotovo nepromenjena (67 mg/g nosača), što ukazuje na zasićenje dostupnih aldehidnih grupa na površini nosača (Slika 4.41. (A)). Prinos imobilizacije proteina pritom opada sa 64% pri inicijalnoj koncentraciji proteina od 25 mg/g nosača do 37% pri početnoj koncentraciji od 200 mg/g nosača, pri čemu je pad najizraženiji u opsegu inicijalnih koncentracija između 25 i 100 mg/g nosača, a potom ulazi u plato kako sve veći udeo dostupnih mesta na nosaču biva popunjen (Slika 4.41. (B)) [299, 323].

#### 4.3.3.1.1.2 Efikasnost imobilizacije aktivnosti preparata Alcalase® na Ox-CNC

Paralelno sa praćenjem vezivanja proteina, određivana je i koncentracija imobilisane proteazne aktivnosti i prinos imobilizacije aktivnosti u istom opsegu inicijalnih koncentracija, kako bi se sagledala katalitička efikasnost dobijenih preparata (Slika 4.42.).



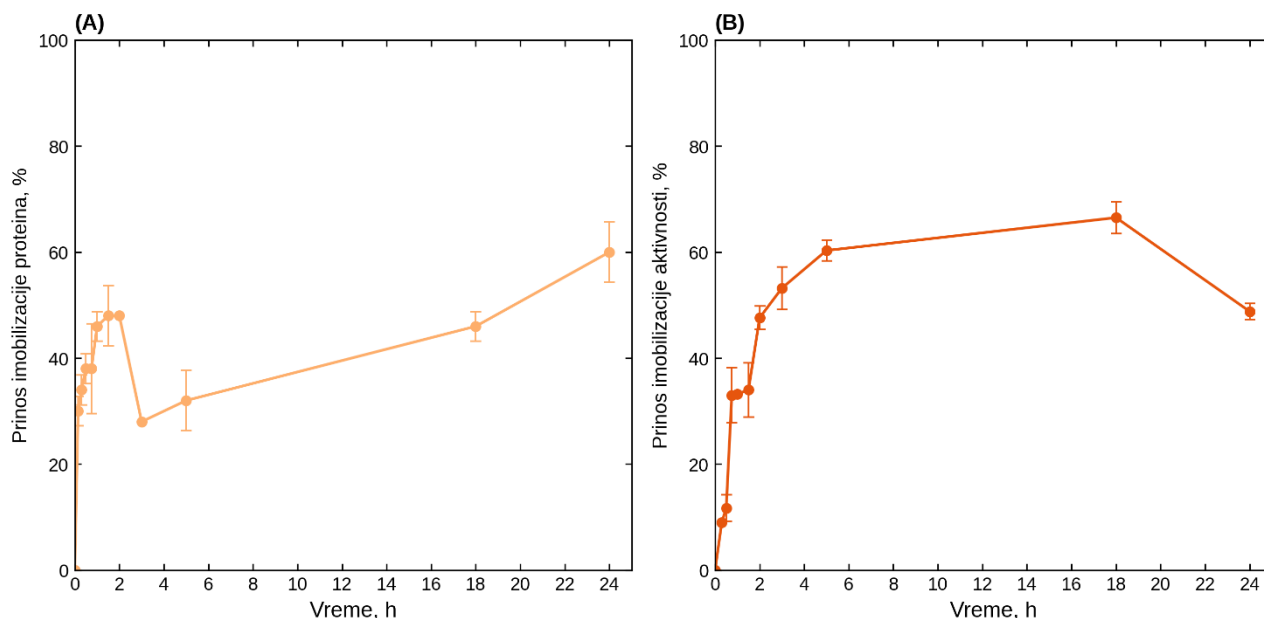
*Slika 4.42. Uticaj inicijalne koncentracije proteina na koncentraciju imobilisane aktivnosti (A) i prinos imobilizacije aktivnosti (B) prilikom kovalentne imobilizacije preparata Alcalase® na Ox-CNC. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina: 25, 50, 100, 150, 200 mg/g nosača; 0,1 M Na-karbonatni pufer pH 9,5; vreme imobilizacije 18 h.*

Koncentracija imobilisane aktivnosti raste od 65 IU/g nosača pri inicijalnoj koncentraciji od 25 mg/g nosača, do maksimuma od 214 IU/g nosača pri inicijalnoj koncentraciji od 150 mg/g nosača, nakon čega pri koncentraciji od 200 mg/g nosača dolazi do pada na 192 IU/g nosača (Slika 4.42. (A)). Najveći deo prirasta ostvaruje se do 150 mg/g nosača, gde imobilisana aktivnost raste sa 65 na 214 IU/g nosača, odnosno više od tri puta, dok dalje povećanje inicijalne koncentracije ne doprinosi u velikoj meri povećanju aktivnosti. Takođe, uočava se i pad imobilisane aktivnosti pri prelasku sa inicijalne koncentracije od 150 do 200 mg/g nosača, iako je količina vezanog proteina u platou, ukazuje na sterne smetnje u situaciji sa visokom gustinom vezanih enzima na površini nosača. Gusto pakovani molekuli međusobno otežavaju pristup supstrata aktivnim centrima susednih molekula, pa katalitički dostupna frakcija enzima opada [301, 303]. Pored toga, može se pretpostaviti da je pri visokim koncentracijama imobilisanih proteina otežan pristup supstrata molekulima koji su vezani u ranom stadijumu imobilizacije, zbog difuzionih ograničenja unutar gustog proteinskog sloja. Prinos imobilizacije aktivnosti opada sa 19% pri inicijalnoj koncentraciji proteina od 25 mg/g nosača do 6% pri početnoj koncentraciji od 200 mg/g nosača, pri čemu je kriva opadanja strma pri početnim koncentracijama između 25 i 100 mg/g, a potom se izravňuje, što je tipično ponašanje za kovalentnu imobilizaciju enzima na nosačima kada se približava zasićenju površine nosača [299, 323] (Slika 4.42. (B)).

Poređenjem zavisnosti prinosa imobilizacije proteina i aktivnosti od inicijalne koncentracije može se zaključiti da inicijalna koncentracija od 50 mg/g nosača predstavlja najpovoljniji kompromis. Na ovoj vrednosti prinos imobilizacije aktivnosti iznosi 12% uz imobilisanu aktivnost od 152 IU/g nosača, dok više inicijalne koncentracije donose blag porast apsolutne aktivnosti ali uz drastičan pad efikasnosti iskorišćavanja dodate količine enzima.

#### 4.3.3.1.1.3 Kinetika kovalentne imobilizacije preparata Alcalase® na Ox-CNC

Radi određivanja minimalnog vremena inkubacije koje obezbeđuje dovoljno visok udeo kovalentno vezanog enzima uz maksimalnu katalitičku aktivnost, praćena je kinetika imobilizacije preparata Alcalase® na Ox-CNC u vremenskom intervalu od 0,3 do 24 h pri inicijalnoj koncentraciji proteina od 50 mg/g nosača i pH 9,5, a rezultati su prikazani na slici 4.43.



Slika 4.43. Uticaj vremena imobilizacije na promenu prinosa imobilizacije proteina (A) i prinosa imobilizacije aktivnosti (B) preparata Alcalase® na Ox-CNC. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 50 mg/g nosača; 0,1 M Na-karbonatni pufer pH 9,5 vreme 0–24 h.

Prinos imobilizacije proteina raste brzo u ranoj fazi i dostiže 47% već nakon 0,75 h, u saglasnosti sa vrednošću dobijenom u koncentracionoj seriji pri istoj početnoj koncentraciji proteina, nakon čega sledi period postepenog opadanja do 28% nakon 3 h (Slika 4.43. (A)). Ovaj dvostepeni profil, koji podrazumeva brzu inicijalnu adsorpciju praćenu delimičnom desorpcijom, u skladu je sa mehanizmom kovalentne imobilizacije na aldehidnim nosačima, gde se u prvom koraku molekuli enzima adsorbuju na površinu nosača nespecifičnim interakcijama, a u drugom, sporijem koraku, povoljno orijentisani molekuli formiraju stabilne kovalentne veze, dok reverzibilno vezani bivaju desorbovani [299, 304]. Između 5 i 24 h prinos proteina nastavlja monotono da raste, dostižući 60% nakon 24 h. Prinos imobilizacije aktivnosti raste postepeno, od oko 2% nakon 0,3 h, preko oko 13% nakon 3 h i oko 15% nakon 5 h, dostižući maksimum od oko 17% nakon 18 h, nakon čega opada na oko 12% nakon 24 h, što ukazuje na postepenu inaktivaciju, koja se može pripisati gubitku konformacione fleksibilnosti enzima usled formiranja višestrukih kovalentnih veza sa površinom nosača [262], kao i potencijalnim sporednim reakcijama aldehidnih grupa sa nukleofilnim ostacima blizu aktivnog centra pri produženim vremenima reakcije [316].

U skladu sa tim, može se pretpostaviti da, dok ukupna količina vezanih proteina prolazi kroz fazu delimične desorpcije slabije vezanih molekula, oni molekuli koji su uspostavili kovalentne veze ostaju ireverzibilno imobilisani i doprinose porastu imobilisane aktivnosti [299, 304]. Na osnovu ovih rezultata, vreme imobilizacije od 3 h izdvaja se kao optimalno za imobilizaciju na Ox-CNC, jer obezbeđuje zadovoljavajući prinos aktivnosti (13%) uz niži udeo imobilisanih proteina što odgovara višoj specifičnoj aktivnosti, a istovremeno obezbeđuje kraće trajanje postupka imobilizacije, čime se umanjuje i rizik od inaktivacije enzima koja se uočava nakon 24 h. Pri izabranom vremenu od 1 h i 3

h u nastavku je izvedena desorpcija, čime je kvantifikovan udeo ireverzibilno kovalentno vezanog enzima u ukupnoj imobilisanoj aktivnosti.

#### 4.3.3.1.1.4 Desorpcija kovalentno vezanog preparata Alcalase® na Ox-CNC

Radi kvantifikacije udela kovalentno vezane preparata Alcalase® naspram reverzibilno adsorbovane, sprovedeni su desorpcioni eksperimenti, istim tretmanom kao kod prethodnih sistema ( $\text{CaCl}_2$ /Triton X-100), na preparatima dobijenim nakon 1 h i 3 h imobilizacije sa optimalnom inicijalnom koncentracijom od 50 mg/g nosača.

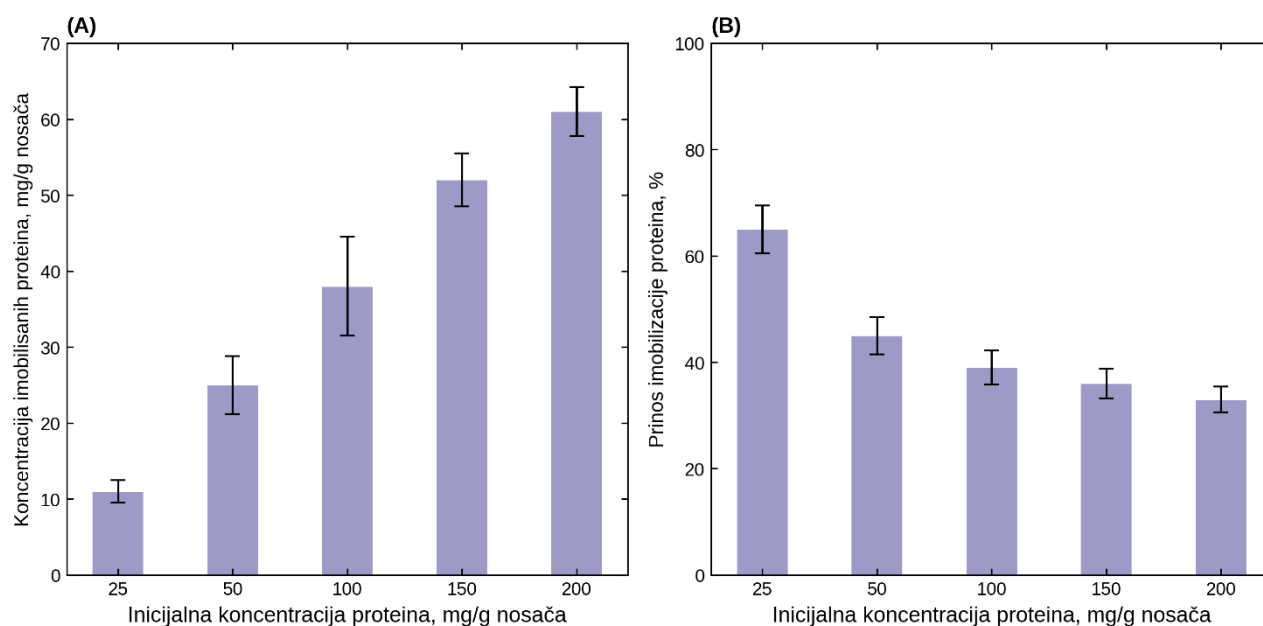
Preostala aktivnost nakon desorpcije na Ox-CNC iznosi 55,33% nakon 1 h i raste na 92,46% nakon 3 h, što potvrđuje da direktne iminske veze između aldehidnih grupa nosača i amino grupa enzima efikasno konvertuju adsorbovane molekule u kovalentno vezane tokom prvih sati inkubacije. Visok udeo kovalentno vezanog enzima već nakon 1 h konzistentan je sa kinetičkim profilom koji pokazuje brzo uspostavljanje stabilnih kovalentnih veza na Ox-CNC, i u skladu je sa dvostepenim mehanizmom imobilizacije na aldehidnim nosačima gde inicijalna adsorpcija brzo prelazi u ireverzibilno kovalentno vezivanje [282].

#### 4.3.3.1.2 Kovalentna imobilizacija preparata Alcalase® na GA-aktiviranu amino-modifikovanu nanocelulozu

Kovalentna imobilizacija preparata Alcalase® na GA-amino-CNC sprovedena je u 0,1 M Na-fosfatnom puferu pH 7,5. GA-amino-CNC se dobija aktivacijom amino-CNC bifunkcionalnim molekulom glutaraldehida, čime se uvode aldehidne grupe, koje potom reaguju sa amino grupama lizinskih ostataka na površini preparata Alcalase®. Za razliku od Ox-CNC, gde se kovalentna veza ostvaruje direktno između aldehidne grupe nosača i amino grupe enzima, na GA-amino-CNC glutaraldehidni most uvodi određenu prostornu distancu između površine nosača i kovalentno vezanog molekula enzima, čime se smanjuje uticaj površine nosača na konformaciju enzima [219]. Niži pH imobilizacije (pH 7,5) neophodan je kako bi se izbeglo neželjeno međusobno umrežavanje čestica amino-CNC glutaraldehidom, ali za posledicu ima smanjenu reaktivnost amino grupa lizinskih ostataka (na pH 7,5 procenjuje se da je oko 0,1% lizinskih ostataka u reaktivnom deprotonovanom obliku), što ima direktne implikacije na kinetiku formiranja kovalentnih veza [284]. U narednim potpoglavljima analizirani su uticaj inicijalne koncentracije proteina, kinetika vezivanja i desorpcioni eksperimenti.

#### 4.3.3.1.2.1 Efikasnost imobilizacije proteina preparata Alcalase® na GA-amino-CNC

Ispitivanje uticaja inicijalne koncentracije proteina na efikasnost imobilizacije proteina iz ovog preparata na GA-amino-CNC sprovedeno je u istom opsegu inicijalnih koncentracija proteina kao za Ox-CNC (25–200 mg/g nosača), a rezultati za koncentraciju imobilisanih proteina i prinos imobilizacije proteina prikazani su na slici 4.44.

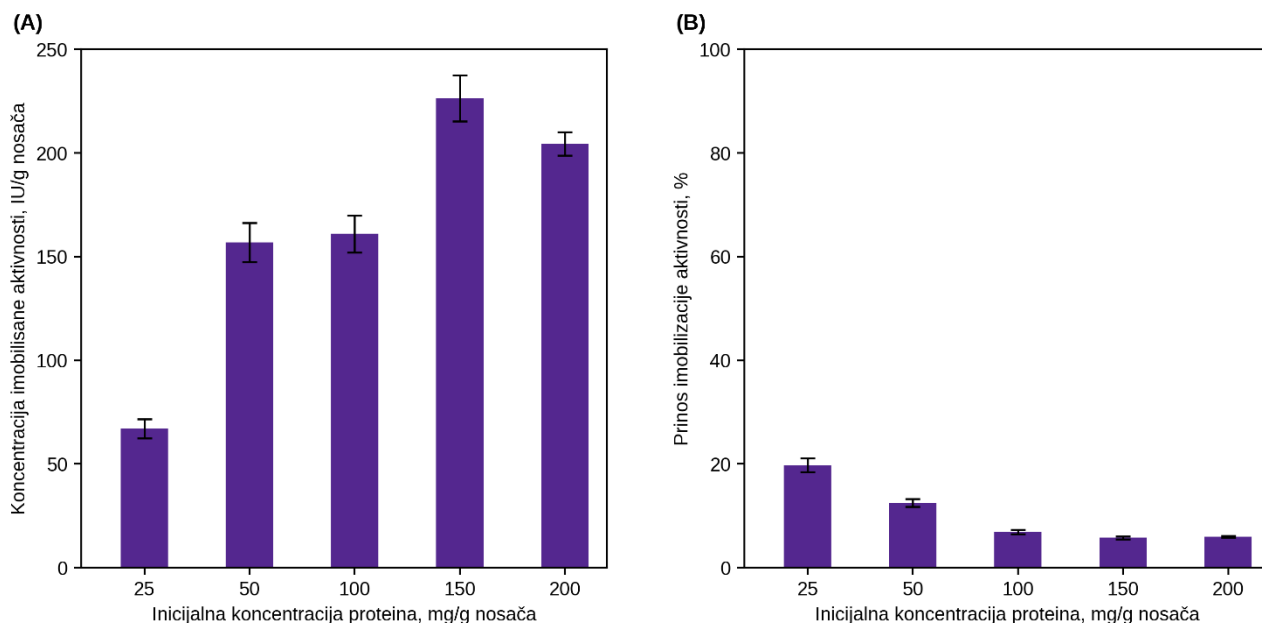


*Slika 4.44. Uticaj inicijalne koncentracije proteina na koncentraciju imobilisanih proteina (A) i prinos imobilizacije proteina (B) prilikom kovalentne imobilizacije Alcalase® na GA-amino-CNC. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina: 25, 50, 100, 150, 200 mg/g nosača; 0,1 M Na-fosfatni pufer pH 7,5; vreme imobilizacije 18 h.*

Sa porastom inicijalne koncentracije proteina koncentracija imobilisanih proteina na GA-amino-CNC raste kontinualno od 10 mg/g nosača pri inicijalnoj koncentraciji proteina od 25 mg/g nosača do 60 mg/g nosača pri inicijalnoj koncentraciji od 200 mg/g nosača, bez jasno izraženog platoa (Slika 4.44. (A)). Prinos imobilizacije proteina opada sa 64% pri inicijalnoj koncentraciji proteina od 25 mg/g nosača do 33% pri početnoj koncentraciji od 200 mg/g nosača (Slika 4.44. (B)). Odsustvo platoa ukazuje da i dalje postoje određena slobodna mesta za vezivanje na najvišoj ispitivanoj inicijalnoj koncentraciji, najverovatnije pošto prostorni razmak koji uvodi glutaraldehidni most između površine nosača i reaktivnih aldehidnih grupa povećava geometrijsku dostupnost mesta za vezivanje [219, 308].

#### 4.3.3.1.2.2 Efikasnost imobilizacije aktivnosti preparata Alcalase® na GA-amino-CNC

Paralelno sa praćenjem vezivanja proteina određivana je i katalitička efikasnost imobilisanih preparata GA-amino-CNC kroz merenje koncentracije imobilisane proteazne aktivnosti i prinosa imobilizacije aktivnosti u istom opsegu inicijalnih koncentracija proteina (Slika 4.45.).



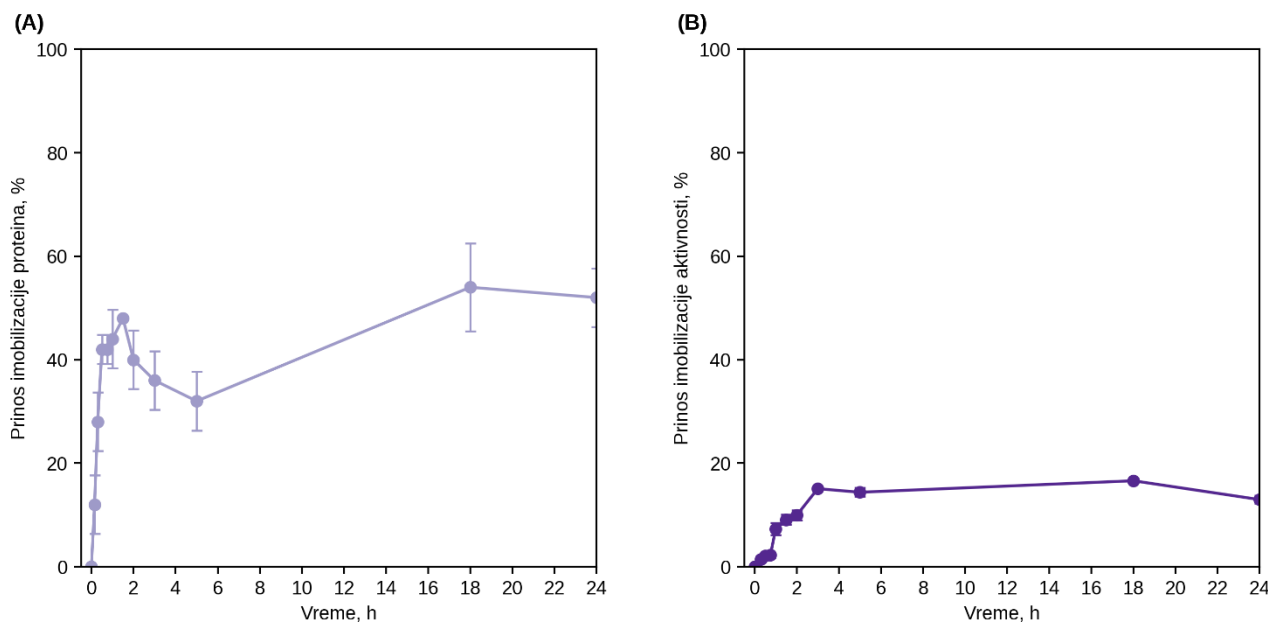
Slika 4.45. Uticaj inicijalne koncentracije proteina na koncentraciju imobilisane aktivnosti (A) i prinos imobilizacije aktivnosti (B) prilikom kovalentne imobilizacije Alcalase® na GA-amino-CNC. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina: 25, 50, 100, 150, 200 mg/g nosača; 0,1 M Na-fosfatni pufer pH 7,5; vreme imobilizacije 18 h.

Koncentracija imobilisane aktivnosti raste sa povećanjem inicijalne koncentracije proteina od 65 IU/g nosača pri inicijalnoj koncentraciji od 25 mg/g nosača do maksimuma od 225 IU/g nosača pri inicijalnoj koncentraciji proteina od 150 mg/g nosača, nakon čega pri početnoj koncentraciji 200 mg/g dolazi do pada na 205 IU/g nosača (Slika 4.45. (A)). Najveći deo prirasta aktivnosti ostvaruje se u opsegu do inicijalne koncentracije od 150 mg/g nosača, gde imobilisana aktivnost raste na 225 IU/g nosača, odnosno više od tri puta u odnosu na aktivnost pri najmanjoj početnoj inicijalnoj koncentraciji proteina. Pri koncentraciji od 200 mg/g nosača sledi blagi pad, što ukazuje na približavanje zasićenju. Zanimljivo je uočiti da je aktivnost pri inicijalnim koncentracijama od 50 i 100 mg/g nosača gotovo identična (158 i 160 IU/g nosača), što sugerise da GA-amino-CNC u ovom opsegu dostiže zasićenje katalitički aktivnim molekulima [323]. Prostorna distanca koja pogoduje aktivnosti na nižim inicijalnim koncentracijama postaje izvor sternih smetnji između susednih enzimskih molekula na višim koncentracijama [319]. Prinos imobilizacije aktivnosti opada od 20% pri inicijalnoj koncentraciji od 25 mg/g nosača do 6% pri koncentraciji od 200 mg/g nosača, pri čemu je kriva opadanja prinosa aktivnosti strmija između inicijalnih koncentracija od 25 i 50 mg/g nosača nakon čega se vrednosti postepeno stabilizuju, formirajući plato, kako se i očekuje prilikom imobilizacije enzima na čvrste nosače (Slika 4.45. (A)) [219, 285, 323].

Uzimajući u obzir istovremeno koncentraciju imobilisane aktivnosti i efikasnost iskorišćavanja dodate količine enzima, inicijalna koncentracija od 50 mg/g nosača izdvaja se kao najpovoljnija. Na ovoj vrednosti prinos imobilizacije aktivnosti iznosi 13% uz imobilisanu aktivnost od 158 IU/g nosača, dok više inicijalne koncentracije donose porast apsolutne aktivnosti ali uz drastičan pad prinosa.

#### 4.3.3.1.2.3 Kinetika imobilizacije preparata Alcalase® na GA-amino-CNC

Radi određivanja optimalnog vremena inkubacije, praćena je kinetika imobilizacije preparata Alcalase® na GA-amino-CNC u vremenskom intervalu od 0 do 24 h korišćenjem inicijalne koncentracije proteina od 50 mg/g nosača i pH 7,5, a rezultati su prikazani na slici 4.46.



*Slika 4.46. Uticaj vremena imobilizacije na promenu prinosa imobilizacije proteina (A) i prinosa imobilizacije aktivnosti (B) Alcalase® na GA-amino-CNC u funkciji vremena inkubacije. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 50 mg/g nosača; 0,1 M Na-fosfatni pufer pH 7,5; vreme imobilizacije 0–24 h.*

Prinos imobilizacije proteina na GA-amino-CNC raste do maksimuma od oko 48% nakon 1,5 h, što odgovara vrednosti iz koncentracione serije pri istoj početnoj koncentraciji proteina, nakon čega postepeno opada do minimuma od oko 32% nakon 5 h, da bi potom ponovo porastao do oko 54% nakon 18 h i ostao na oko 52% nakon 24 h (Slika 4.46. (A)). Ovakav profil sugerise dužu i manje direktnu konverziju adsorbovanih molekula u kovalentno vezano stanje: reakcija aldehydnih grupa na kraju glutaraldehydnog mosta zahteva specifičnu geometrijsku orijentaciju prema lizinskim ostacima enzima, što produžava period u kome adsorpcija i desorpcija dominiraju pre uspostavljanja stabilnih kovalentnih veza, što je konzistentno sa heterofunkcionalnim mehanizmom imobilizacije opisanim za nosače sa glutaraldehydom [219]. Prinos imobilizacije aktivnosti ostaje nizak do 1 h, a potom naglo raste na 7% nakon 1 h, 9% nakon 1,5 h, dostižući 15% nakon 3 h i maksimum od 17% nakon 18 h pre nego što opadne na 13% nakon 24 h, što je u skladu sa delimičnom inaktivacijom enzima korišćenjem dužeg vremena reakcije (Slika 4.46. (B)).

Na osnovu kinetičkih profila, vreme inkubacije od 18 h izdvaja se kao optimalno za GA-amino-CNC, jer se nakon tog vremena postiže maksimalni prinos imobilizacije aktivnosti (17%) i najviša koncentracija imobilisane aktivnosti, pre nastupanja inaktivacije koja se javlja nakon 24 h. Za razliku od Ox-CNC, gde se zbog brze kinetike direktnih kovalentnih veza maksimalna aktivnost postiže već nakon 3 h, sporija konverzija adsorbovanih molekula u kovalentno vezano stanje posredovana glutaraldehydnim mostom zahteva produženo vreme inkubacije za dostizanje ravnotežnog stanja.

#### 4.3.3.1.2.4 Desorpcija kovalentno vezanog preparata Alcalase® na GA-amino-CNC

Radi kvantifikacije udela kovalentno vezane preparata Alcalase® na GA-amino-CNC, sprovedeni su desorpcioni eksperimenti, istim tretmanom (CaCl<sub>2</sub>/Triton X-100), na sistemima dobijenim nakon 1 h, 3 h i 18 h imobilizacije sa inicijalnom koncentracijom proteina od 50 mg/g nosača.

Preostala aktivnost nakon desorpcije iznosi 17,6% nakon 1 h, što potvrđuje da je u ranoj fazi imobilizacije dominantna adsorpcija, dok kovalentno vezivanje posredovano glutaraldehydnim

mostom postaje dominantno tek pri produženim vremenima inkubacije. Nakon desorpcije posle imobilizacije od 3 h udeo preostale aktivnosti iznosi 80,2%, što ukazuje da se već u ranijoj fazi imobilizacije postiže visok udeo kovalentno vezanih molekula preparata Alcalase® posredstvom glutaraldehidnih mostova. Produženjem vremena imobilizacije na 18 h, udeo kovalentno vezane aktivnosti raste na 94,2%, što potvrđuje da je za potpunu konverziju adsorbovanih molekula u kovalentno vezano stanje potrebno produženo vreme inkubacije, u skladu sa heterofunkcionalnim dvostepenim mehanizmom imobilizacije na glutaraldehidnim nosačima [219, 304]. Detaljno poređenje sa Ox-CNC i izbor optimalnog vremena imobilizacije prikazani su u nastavku.

Na osnovu kinetičkih i desorpcionih rezultata, vreme inkubacije od 18 h odabrano je kao optimalno za imobilizaciju preparata Alcalase® na GA-amino-CNC, jer obezbeđuje preko 90% kovalentno vezane aktivnosti uz zadovoljavajuće vrednosti imobilisane aktivnosti.

#### 4.3.3.1.3 Uporedna analiza kovalentne imobilizacije preparata Alcalase® na Ox-CNC i GA-amino-CNC

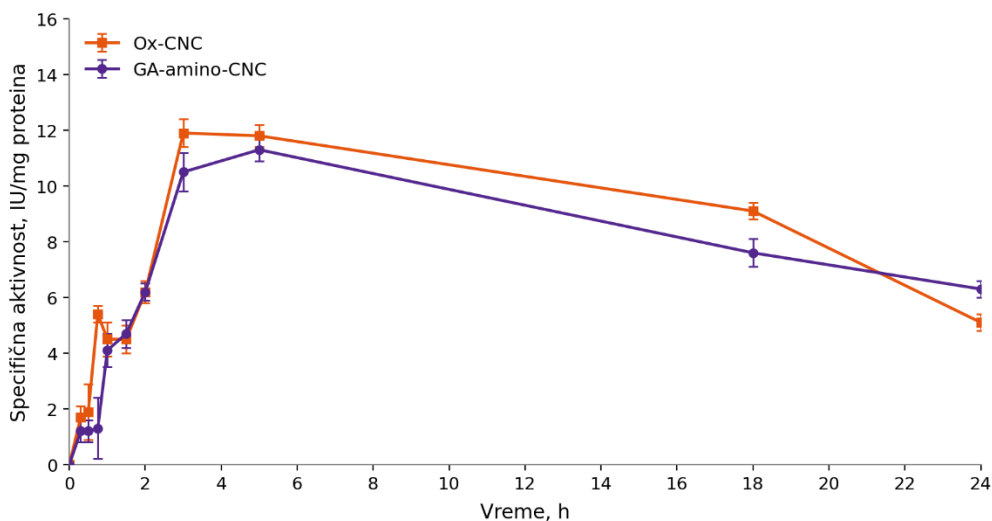
Sumirani parametri kovalentne imobilizacije preparata Alcalase® na Ox-CNC i GA-amino-CNC sa optimalnim uslovima prikazani su u tabeli 4.4. Za oba nosača kao optimalna inicijalna koncentracija proteina odabrana je 50 mg/g nosača, dok se optimalna vremena imobilizacije razlikuju: 3 h za Ox-CNC i 18 h za GA-amino-CNC. Razlika u optimalnim vremenima imobilizacije odražava različitu kinetiku formiranja kovalentnih veza na dva nosača. Na Ox-CNC se direktne kovalentne veze između aldehidnih grupa nosača i amino grupa lizinskih ostataka enzima formiraju brzo i sistem dostiže maksimalnu katalitičku efikasnost već pri 3 h, dok na GA-amino-CNC glutaraldehidni most zahteva produženo vreme inkubacije da bi se ostvarila optimalna geometrijska orijentacija reaktivnih grupa enzima i nosača.

*Tabela 4.4. Poređenje parametara kovalentne imobilizacije Alcalase® na Ox-CNC i GA-amino-CNC pri optimalnim uslovima i nakon desorpcionog tretmana (početna koncentracija proteina 50 mg/g nosača; Ox-CNC pH 9,5, 3 h; GA-amino-CNC pH 7,5, 18 h).*

| Nosač        | Koncentracija imobilisanih proteina (mg/g nosača) | Prinos imobilizacije proteina (%) | Koncentracija imobilisane aktivnosti (IU/g nosača) | Prinos imobilizacije aktivnosti (%) | Specifična aktivnost (IU/mg proteina) |
|--------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| Ox-CNC       | 14                                                | 28                                | 167                                                | 13                                  | 11,9                                  |
| GA-amino-CNC | 27                                                | 54                                | 205                                                | 16                                  | 7,6                                   |

Imobilizacijom pod optimalnim uslovima, enzim imobilisan na GA-amino-CNC ostvaruje viši prinos imobilizacije proteina (54% naspram 28% za enzim imobilisan na Ox-CNC) i veću koncentraciju imobilisane aktivnosti (205 naspram 167 IU/g nosača), uz znatno viši udeo kovalentno vezanog enzima nakon desorpcionog tretmana CaCl<sub>2</sub>/Triton X-100 (94% nakon 18 h imobilizacije na GA-amino-CNC naspram 70% nakon 3 h imobilizacije na Ox-CNC). Specifične aktivnosti imobilisanih preparata razlikuju se između dva nosača (11,9 IU/mg proteina za enzim imobilisan na Ox-CNC i 7,6 IU/mg proteina za preparat Alcalase® imobilisan na GA-amino-CNC), što odgovara zadržavanju oko 52% i 33% specifične aktivnosti slobodnog preparata Alcalase® (23 IU/mg proteina). Ove vrednosti su u rang sa literaturno opisanim vrednostima kao što je imobilizacija preparata Alcalase® kovalentnim vezivanjem preko glutaraldehida na magnetne nanočestice koja je zadržala 75–80% početne aktivnosti [324].

Pored razlike u specifičnim aktivnostima pri optimalnim vremenima, i dinamika njihovog uspostavljanja bitno se razlikuje između dva nosača. Praćenje promene specifične aktivnosti tokom celog ispitivanog intervala (0–24 h) prikazano je na slici 4.47.



Slika 4.47. Promena specifične aktivnosti kovalentno imobilisanog preparata Alcalase® na Ox-CNC i GA-amino-CNC u zavisnosti od vremena imobilizacije. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 50 mg/g nosača; Ox-CNC – 0,1 M Na-karbonatni pufer pH 9,5; GA-amino-CNC – 0,1 M Na-fosfatni pufer pH 7,5; vreme imobilizacije 0–24 h.

Na Ox-CNC specifična aktivnost pokazuje rani skok na 5,5 IU/mg proteina već nakon 0,75 h, potom osciluje između 5 i 7 IU/mg proteina do 2 h, a zatim naglo raste do maksimuma od 11,9 IU/mg proteina nakon 3 h i ostaje praktično konstantna nakon 5 h (11,8 IU/mg proteina). Produženjem vremena na 18 h dolazi do izraženog pada specifične aktivnosti na 9,1 IU/mg proteina, odnosno 5,1 nakon 24 h, što ukazuje na inaktivaciju enzima usled produženog kontakta sa nosačem i potencijalno višestrukih sporednih reakcija između aldehidnih grupa nosača i nukleofilnih ostataka enzima prilikom korišćenja dugih vremena reakcije [228]. Na GA-amino-CNC specifična aktivnost ostaje niska u ranoj fazi (1,2–1,3 IU/mg proteina do 0,75 h), a zatim raste do maksimuma od oko 11,3 IU/mg nakon 5 h, nakon čega opada na oko 7,6 IU/mg nakon 18 h i oko 6,3 IU/mg nakon 24 h.

Različita dinamika promene specifične aktivnosti odražava različite hemijske mehanizme vezivanja: rani skok specifične aktivnosti enzima na Ox-CNC nakon 0,75 h konzistentan je sa bržom kinetikom formiranja direktnih kovalentnih veza, gde već u ranoj fazi deo katalitički povoljno orijentisanih molekula biva kovalentno fiksiran, dok sporija konverzija na GA-amino-CNC odražava potrebu da glutaraldehidni most pronađe odgovarajuću geometrijsku poziciju u odnosu na lizinske ostatke enzima pre uspostavljanja stabilne kovalentne veze. Posledica ovih razlika je da se na Ox-CNC maksimalna specifična aktivnost preparata Alcalase® postiže znatno brže (3 h), ali je enzim istovremeno podložniji inaktivaciji pri produženim vremenima, dok je imobilizaciji na GA-amino-CNC potrebno duže vreme imobilizacije, uz blaži pad specifične aktivnosti nakon 18 h, koji se pre svega pripisuje padu imobilisanih proteina a ne padu ukupne koncentracije imobilisane aktivnosti.

Posmatrajući zajedno sve ispitivane parametre, GA-amino-CNC izdvaja se kao povoljniji nosač za kovalentnu imobilizaciju Alcalase®, pre svega zbog znatno višeg udela kovalentno vezanog enzima i veće apsolutne količine imobilisane aktivnosti, uz podjednaku specifičnu aktivnost kao na Ox-CNC. Ovakav obrazac, u kojem glutaraldehidni most pogoduje očuvanju katalitičke aktivnosti uz visok udeo stabilno vezanog enzima, u skladu je sa rezultatima dobijenim za pektinazu (Tabela 4.3.), gde je GA-amino-CNC takođe pokazao nešto bolju efikasnost imobilizacije u odnosu na Ox-CNC po više parametara imobilizacije.

#### 4.3.3.2 Imobilizacija enzimskog preparata Flavourzyme®

Flavourzyme® je komercijalni višekomponentni preparat dobijen submerznom fermentacijom soja *A. oryzae* (ATCC 42149/RIB 40), koji sadrži smešu endo- i egzopeptidaza [313]. Preparat čini osam

enzimskih komponenti: leucin aminopeptidaza A (LAPA, 32,5 kDa, EC 3.4.11.), leucin aminopeptidaza II (LAP2, 51,9 kDa, EC 3.4.11.), dipeptidil proteaza IV (DPP4, 85,1 kDa, EC 3.4.14.5), dipeptidil proteaza V (DPP5, 78,6 kDa, EC 3.4.14.), neutralna proteaza I (NP1, 42,4 kDa, EC 3.4.24.), neutralna proteaza II (NP2, 19,0 kDa, EC 3.4.24.39), alkalna proteaza I (ALP1, 29,0 kDa, EC 3.4.21.63) i  $\alpha$ -amilaza tipa 3 (AMY3, 52,5 kDa, EC 3.2.1.1) [313]. Optimalna aktivnost preparata postiže se u opsegu pH 5,0–7,0 i temperaturama 45–55 °C, sa dominantnom egzopeptidaznom aktivnošću uz prisustvo endoproteazne komponente [313].

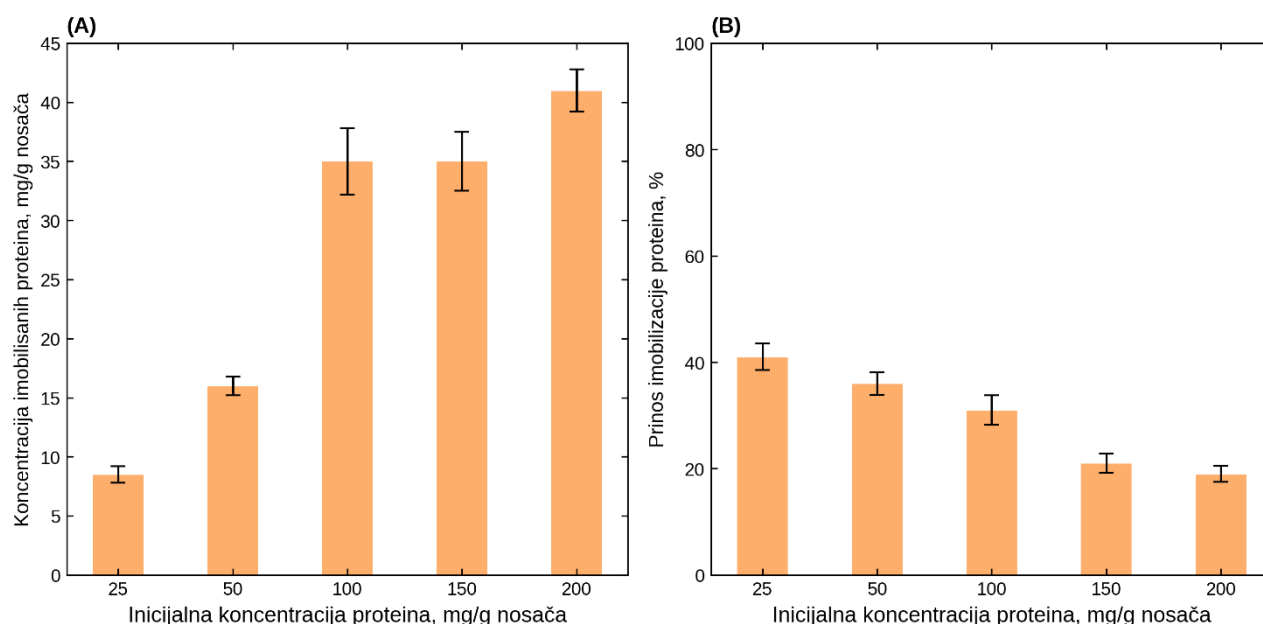
Za razliku od preparata Alcalase<sup>®</sup>, koja je jednokomponentni preparat sa isključivo endopeptidaznom aktivnošću, višekomponentna priroda Flavourzyme<sup>®</sup> predstavlja poseban izazov u optimizaciji imobilizacije: pojedinačne proteinske komponente preparata razlikuju se u molekulskoj masi, naelektrisanju i prostornoj organizaciji aktivnih centara, pa se njihovo vezivanje na nosač odvija selektivno i ne može se razmatrati na isti način kao kod jednokomponentnih enzima. Zbog toga je praćenje isključivo ukupnih proteina i jedne aktivnosti nedovoljno. U ovim eksperimentima praćene su zasebno proteolitička aktivnost prema azokazeinu (IU/g nosača), koja dominantno odražava endopeptidaznu komponentu preparata, i egzopeptidazna (leucin aminopeptidazna) aktivnost prema L-leucin-*p*-nitroanilidu (L-*p*NAU/g nosača).

#### 4.3.3.2.1 Kovalentna imobilizacija preparata Flavourzyme<sup>®</sup> na oksidovanu nanocelulozu

Kovalentna imobilizacija preparata na Ox-CNC sprovedena je u 0,1 M Na-karbonatnom puferu pH 9,5, korišćenjem istih uslova i po istom mehanizmu kao za preparat Alcalase<sup>®</sup> (formiranje Šifovih baza između aldehidnih grupa nosača i deprotonovanih amino grupa lizinskih ostataka). Za razliku od preparata Alcalase<sup>®</sup>, gde je vezivanje jednoznačno definisano jednom proteazom, kod preparata Flavourzyme<sup>®</sup> se kovalentno vezuju komponente sa različitim naelektrisanjima, molekulskim masama i prostornim rasporedom lizinskih ostataka, što rezultuje selektivnim vezivanjem onih komponenti čiji su lizinski ostaci geometrijski dostupni za reakciju sa aldehidnim grupama Ox-CNC. U narednim potpoglavljima prikazani su uticaj inicijalne koncentracije proteina, kinetika vezivanja i rezultati desorpcije adsorbovanih molekula enzima.

##### 4.3.3.2.1.1 Efikasnost imobilizacije proteina preparata Flavourzyme<sup>®</sup> na Ox-CNC

Ispitivanje uticaja inicijalne koncentracije proteina na efikasnost vezivanja proteina ovog preparata sprovedeno je u opsegu 25–200 mg/g nosača na pH 9,5, a rezultati za koncentraciju imobilisanih proteina i prinos imobilizacije proteina prikazani su na slici 4.48.

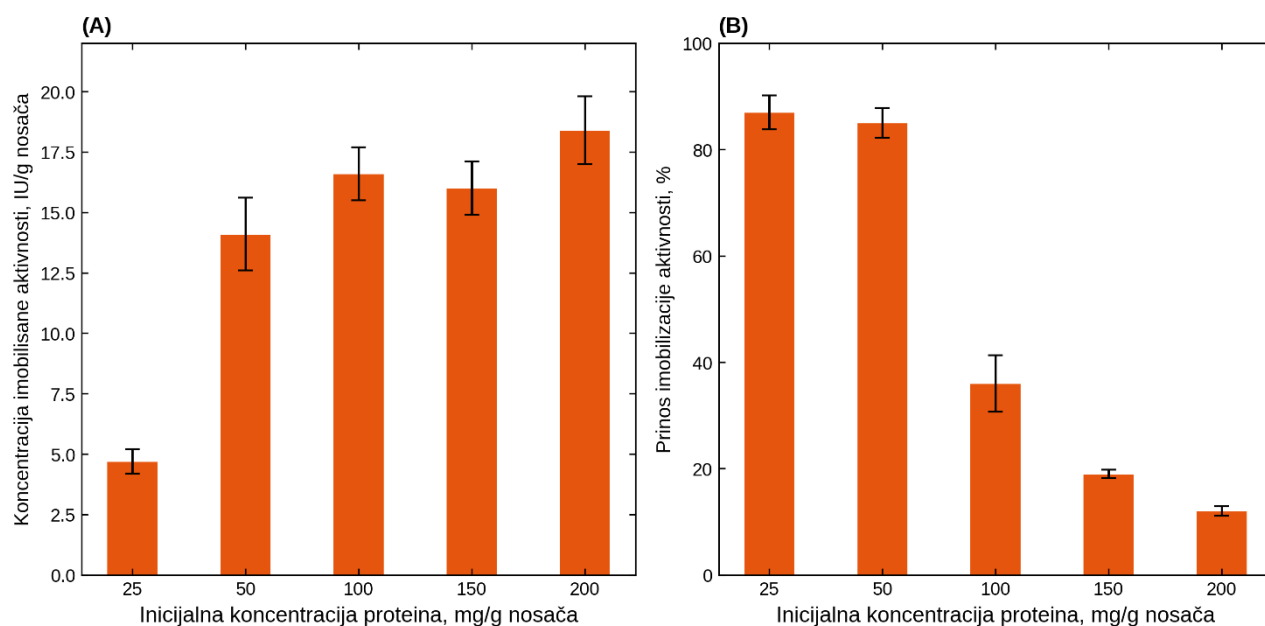


*Slika 4.48. Uticaj inicijalne koncentracije proteina na (A) koncentraciju imobilisanih proteina i (B) prinos imobilizacije proteina prilikom kovalentne imobilizacije Flavourzyme<sup>®</sup> preparata na Ox-CNC. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina: 25, 50, 100, 150, 200 mg/g nosača; 0,1 M Na-karbonatni pufer pH 9,5, vreme imobilizacije 18 h.*

Sa porastom inicijalne koncentracije proteina od 25 do 200 mg/g nosača, koncentracija imobilisanih proteina na Ox-CNC raste kontinualno od 8 mg/g nosača do 41 mg/g nosača (Slika 4.48. (A)). Karakteristično je da u opsegu inicijalnih koncentracija od 100 do 150 mg/g nosača dolazi do privremenog platoa gde su vrednosti skoro identične (koncentracija imobilisanih proteina iznosi 35 mg/g nosača za obe koncentracije) što ukazuje na privremeno zasićenje direktno dostupnih aldehidnih reaktivnih mesta na površini nosača, nakon čega pri inicijalnoj koncentraciji proteina od 200 mg/g nosača dolazi do daljeg porasta koncentracije imobilisanih proteina na 41 mg/g nosača, najverovatnije usled doprinosa nespecifične fizičke adsorpcije uz kovalentno vezivanje [304]. Prinos imobilizacije proteina opada sa 41% pri inicijalnoj koncentraciji proteina od 25 mg/g nosača do 19% pri početnoj koncentraciji od 200 mg/g nosača, pri čemu je pad najstrmiji između inicijalnih koncentracija od 25 do 100 mg/g nosača a potom se prinos postepeno stabilizuje, budući da se raspoloživa površinska reaktivna mesta postepeno popunjavaju (Slika 4.48. (B)) [299].

#### 4.3.3.2.1.2 Efikasnost imobilizacije proteolitičke aktivnosti preparata Flavourzyme<sup>®</sup> na Ox-CNC

Paralelno sa praćenjem vezivanja proteina određivana je proteolitička aktivnost imobilisanih preparata prema azokazeinu u istom opsegu inicijalnih koncentracija, koja dominantno odražava katalitičku efikasnost komponenti preparata koje imaju endopeptidaznu aktivnost (Slika 4.49).

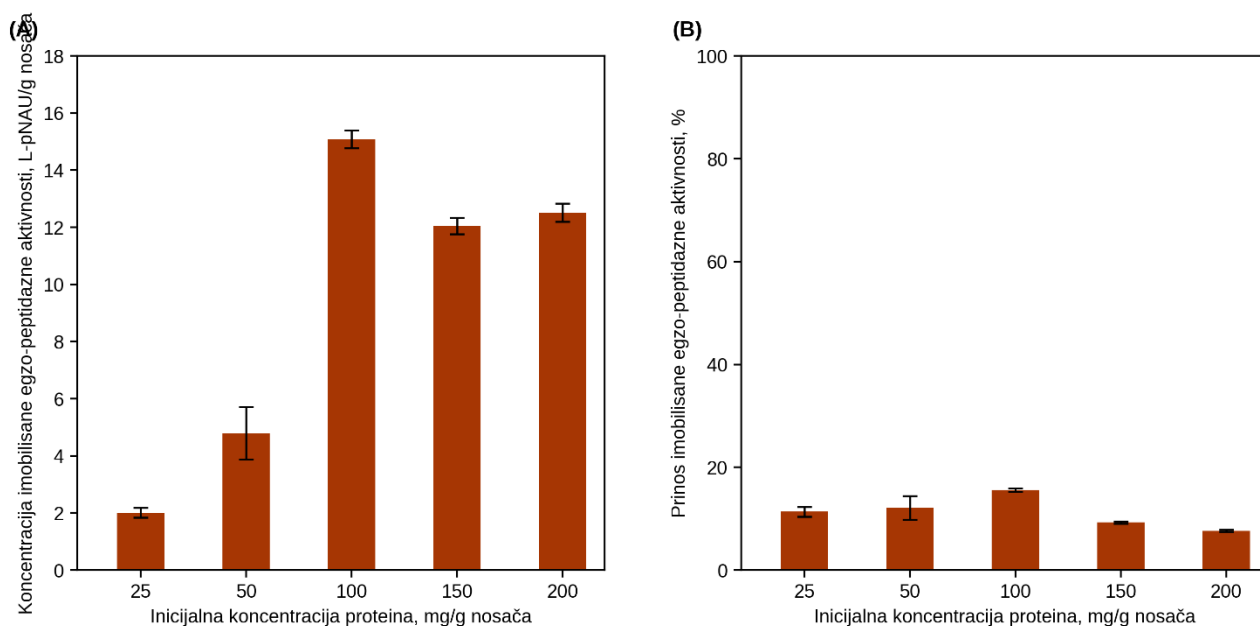


Slika 4.49. Uticaj inicijalne koncentracije proteina na (A) koncentraciju imobilisane aktivnosti i (B) prinos imobilizacije aktivnosti prilikom kovalentne imobilizacije Flavourzyme® preparata na Ox-CNC. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina: 25, 50, 100, 150, 200 mg/g nosača; 0,1 M Na-karbonatni pufer pH 9,5, vreme imobilizacije 18 h.

Koncentracija imobilisane proteolitičke aktivnosti raste sa 5 IU/g nosača pri inicijalnoj koncentraciji od 25 mg/g nosača na 16,5 IU/g nosača pri koncentraciji od 100 mg/g nosača, nakon čega pri inicijalnoj koncentraciji od 150 mg/g nosača opada na 15,5 IU/g nosača, da bi pri koncentraciji od 200 mg/g nosača ponovo porasla na 18 IU/g nosača (Slika 4.49. (A)). Najveći deo prirasta ostvaruje se do 100 mg/g nosača, gde imobilisana proteolitička aktivnost raste sa 5 na 16,5 IU/g nosača, odnosno više od tri puta; dalje udvostručenje inicijalne koncentracije (sa 100 na 200 mg/g nosača) donosi prirast od svega oko 1,5 IU/g nosača, što pokazuje da dodatno vezani molekuli sve manje doprinose ukupnoj imobilisanoj aktivnosti i da se sistem približava zasićenju. Pad aktivnosti pri inicijalnim koncentracijama između 100 i 150 mg/g nosača, uprkos kontinuiranom porastu broja vezanih proteinskih molekula, ukazuje na pojavu sternih smetnji pri visokim površinskim gustinama enzima: gusto pakovani molekuli ometaju pristup supstrata aktivnim centrima susednih komponenti, a istovremeno mogu otežati pristup molekulima koji su vezani u ranijoj fazi imobilizacije zbog difuzionih ograničenja unutar zbijenog proteinskog sloja [285, 301]. Ponovni porast aktivnosti pri inicijalnoj koncentraciji proteina od 200 mg/g nosača može se pripisati kombinovanom doprinosu kovalentno vezanih i fizički adsorbovanih, ali katalitički aktivnih komponenti preparata na gusto popunjenoj površini nosača [304]. Prinos imobilizacije proteolitičke aktivnosti opada sa 22% pri 25 mg/g na 8% pri inicijalnoj koncentraciji od 200 mg/g nosača, pri čemu se maksimalna vrednost od 28% dostiže pri inicijalnoj koncentraciji od 50 mg/g nosača, nakon čega sledi pad na 15% pri 100 mg/g nosača, nakon čega se postižu približno konstantne vrednosti, što može biti karakteristično za kovalentnu imobilizaciju višekomponentnih proteolitičkih preparata kakav je Flavourzyme®, koji sadrži najmanje osam različitih enzima sa različitim katalitičkim dejstvom [313], gde je broj reaktivnih mesta na nosaču ograničen u odnosu na rastuću količinu ponuđenog enzima [299].

#### 4.3.3.2.1.3 Efikasnost imobilizacije egzopeptidazne aktivnosti preparata Flavourzyme® na Ox-CNC

Egzopeptidazna aktivnost imobilisanih preparata praćena je zasebno u istom opsegu inicijalnih koncentracija, jer se egzopeptidazne komponente preparata strukturno razlikuju od endopeptidaznih i mogu pokazivati drugačiji odgovor na uslove imobilizacije (Slika 4.50).



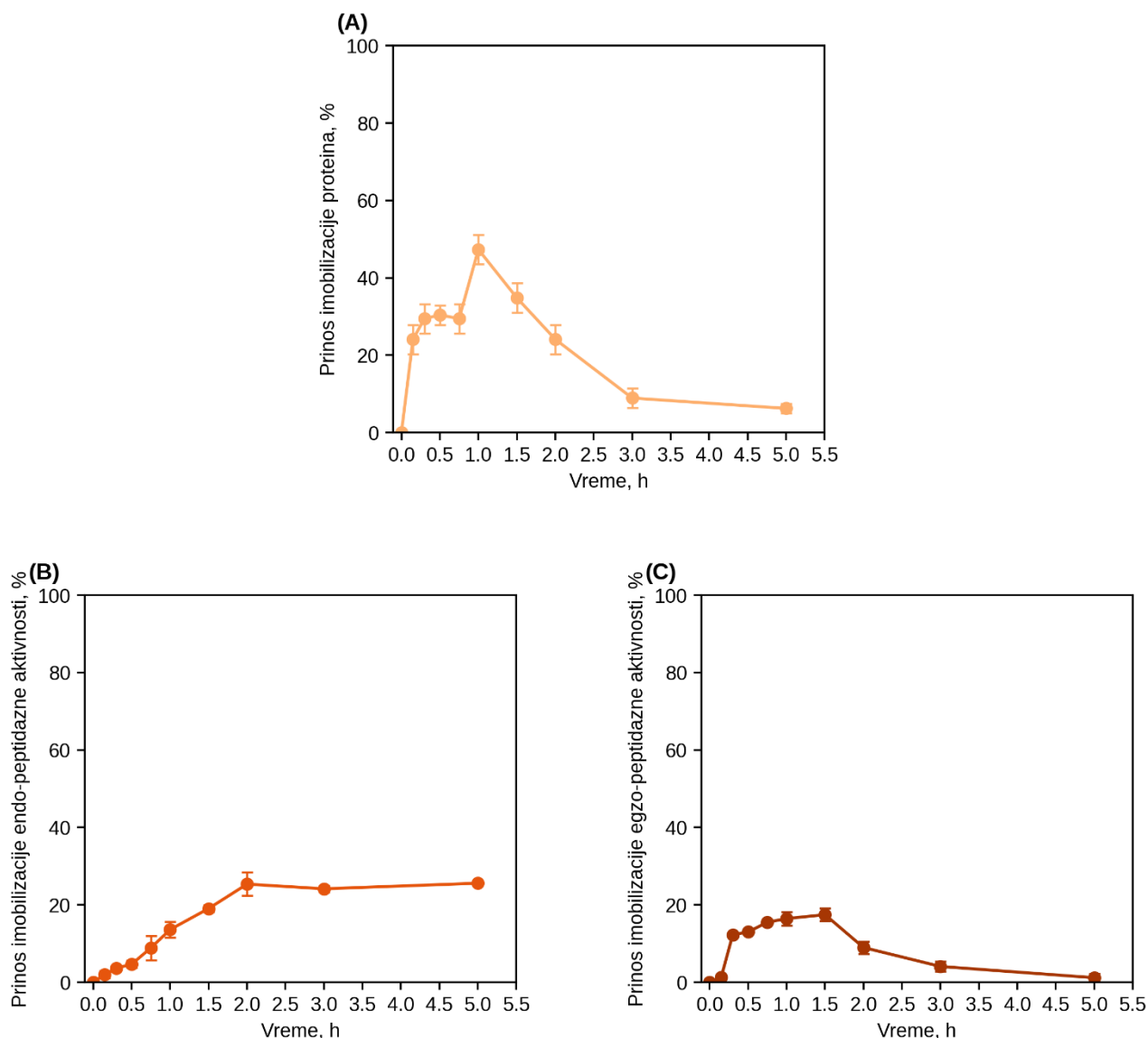
Slika 4.50. Uticaj inicijalne koncentracije proteina na (A) koncentraciju imobilisane egzo-peptidazne aktivnosti i (B) prinos imobilizacije egzo-peptidazne aktivnosti prilikom kovalentne imobilizacije Flavourzyme<sup>®</sup> preparata na Ox-CNC. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina: 25, 50, 100, 150, 200 mg/g nosača; 0,1 M Na-karbonatni pufer pH 9,5, vreme imobilizacije 18 h.

Koncentracija imobilisane egzo-peptidazne aktivnosti na Ox-CNC raste sa 2 L-pNAU/g nosača pri inicijalnoj koncentraciji proteina od 25 mg/g nosača do maksimuma od 15 L-pNAU/g nosača pri početnoj koncentraciji od 100 mg/g nosača, nakon čega pri početnoj koncentraciji od 150 mg/g nosača pada na 12 L-pNAU/g nosača i ostaje na sličnom nivou pri inicijalnoj koncentraciji od 200 mg/g nosača (12,5 L-pNAU/g nosača) (Slika 4.50. (A)). Najveći porast aktivnosti ostvaruje se u opsegu inicijalnih koncentracija od 25 mg/g nosača do 100 mg/g nosača, gde egzo-peptidazna aktivnost raste sa 2 na 15 L-pNAU/g nosača, odnosno oko sedam i po puta, nakon čega sledi pad koji ukazuje da iznad ove koncentracije dodatni molekuli enzima više ne doprinose povećanju egzo-peptidazne aktivnosti. Ranije dostizanje maksimuma i pad egzo-peptidazne aktivnosti sa povećanjem inicijalne koncentracije proteina iznad 100 mg/g nosača u poređenju sa aktivnošću koja je postignuta u reakciji sa azokazeinom, a koja nastavlja da raste do početne koncentracije od 200 mg/g nosača, ukazuje da su egzo-peptidazne komponente osetljivije na sterne smetnje pri visokim gustinama enzima na površini nosača. Različita osetljivost na nagomilavanje molekula enzima može se objasniti razlikama u geometriji vezivanja supstrata: egzo-peptidaze deluju isključivo na slobodne krajeve polipeptidnog lanca i zahtevaju specifično prepoznavanje N- ili C-terminusa supstrata u uskim katalitičkim kanalima, što ih čini geometrijski osetljivijim na prisustvo susednih molekula u poređenju sa endopeptidazama koje deluju na unutrašnje peptidne veze i imaju otvoreniji aktivni centar [285, 313]. Prinos imobilizacije egzo-peptidazne aktivnosti dostiže maksimum od 16% pri inicijalnoj koncentraciji proteina od 100 mg/g nosača, a zatim opada na 8% pri početnoj koncentraciji od 200 mg/g nosača, pri čemu je pad izraženiji nego kod proteolitičke aktivnosti prema azokazeinu, što potvrđuje hipotezu da je veća osetljivost egzo-peptidaznih komponenti pri višim gustinama enzima (Slika 4.50. (B)).

Pri određivanju optimalne početne koncentracije mora se uzeti u obzir i ukupna i egzo-peptidazna aktivnost. Proteolitička aktivnost prema azokazeinu je najefikasnija na inicijalnoj koncentraciji proteina od 50 mg/g nosača, dok egzo-peptidazna dostiže maksimum na početnoj koncentraciji od 100 mg/g nosača. Pošto je egzo-peptidazna aktivnost ključna za ciljnu primenu (oslobađanje slobodnih aminokiselina i peptida male molekulske mase), 100 mg/g nosača je odabrano kao kompromis.

#### 4.3.3.2.1.4 Kinetika kovalentne imobilizacije preparata Flavourzyme® na Ox-CNC

Radi određivanja optimalnog vremena inkubacije koje obezbeđuje zadovoljavajući udeo kovalentno vezanih komponenti uz maksimalnu katalitičku aktivnost, praćena je kinetika imobilizacije preparata Flavourzyme® na Ox-CNC u vremenskom intervalu od 0 do 5 h korišćenjem prethodno određene optimalne inicijalne koncentracije proteina od 100 mg/g nosača i pH 9,5, a rezultati su prikazani na slici 4.51.



Slika 4.51. Uticaj vremena imobilizacije na promenu prinosa imobilizacije proteina (A), prinosa imobilizacije proteolitičke aktivnosti prema azokazeinu (B) i prinosa imobilizacije egzo-peptidazne aktivnosti (C) Flavourzyme® preparata na Ox-CNC nosaču. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 100 mg/g nosača; 0,1 M Na-karbonatni pufer pH 9,5; vreme imobilizacije 0–5 h.

Prinos imobilizacije proteina na Ox-CNC pokazuje specifičan profil. Raste od 25% nakon 0,15 h do maksimuma od oko 47% nakon približno 1 h, nakon čega sledi nagli i kontinualni pad do oko 6% nakon 5 h (Slika 4.51. (A)). Ovako drastičan pad prinosa proteina pri produženim vremenima

inkubacije, koji nije uočen ni za preparat Alcalase® ni za pektinazu na istom nosaču, ukazuje na masivnu desorpciju proteinskih komponenti preparata, verovatno onih koje su u ranoj fazi adsorbovane ali nisu formirale kovalentne veze zbog nepovoljne geometrijske orijentacije lizinskih ostataka u odnosu na aldehidne grupe nosača. Ovakva selektivna desorpcija karakteristična je za višekomponentne enzimске preparate na aldehidnim nosačima, gde se nespecifično adsorbovane komponente postepeno eliminišu pri produženim vremenima inkubacije, dok one koje su formirale stabilne kovalentne veze ostaju trajno fiksirane [299, 304].

Prinos imobilizacije proteolitičke aktivnosti prema azokazeinu pokazuje suprotan trend. Aktivnost raste skoro linearno od 2% nakon 0,15 h, preko 5% nakon 0,5 h i 14% nakon 1 h, do platoa od oko 24–26% između 2 i 5 h, bez naknadnog pada (Slika 4.51. (B)). Kontrast između pada prinosa proteina i istovremenog rasta prinosa proteolitičke aktivnosti u skladu je sa selektivnim kovalentnim vezivanjem endopeptidaznih komponenti preparata: dok se veliki udeo reverzibilno vezanih proteinskih molekula desorpcijom uklanja, proteaze koje su formirale stabilne kovalentne veze ostaju trajno vezane i kumulativno doprinose porastu aktivnosti [304].

S druge strane, prinos egzozeptidazne aktivnosti pokazuje vremenski pomen profil. Egzozeptidazna aktivnost raste od 1% nakon 0,15 h do 12% nakon 0,3 h i maksimuma od 17% nakon 1,5 h, a zatim strmo opada do 9% nakon 2 h, 4% nakon 3 h i 1% nakon 5 h, paralelno sa padom prinosa proteina (Slika 4.51. (C)). Ovaj profil ukazuje da egzozeptidazne komponente pretežno ostaju u reverzibilno adsorbovanom stanju i desorbuju se prilikom produžavanja vremena inkubacije, bez efikasnog formiranja stabilnih kovalentnih veza, najverovatnije usled drugačije prostorne raspodele lizinskih ostataka u odnosu na endopeptidazne komponente preparata [271]. Ovakav obrazac, gde različite komponente višekomponentnog preparata pokazuju različitu sklonost ka kovalentnom vezivanju, konzistentan je sa kinetičkim profilima uočenim prilikom imobilizacije preparata Pectinex® Ultra SP-L na Ox-CNC, što potvrđuje da se radi o opštem mehanizmu karakterističnom za multikomponentne enzimске preparate na aldehidnim nosačima.

Na osnovu ovih kinetičkih profila, vreme inkubacije od 1,5 h izdvaja se kao optimalno za imobilizaciju preparata Flavourzyme® na Ox-CNC. Na tom vremenu egzozeptidazna aktivnost dostiže svoj maksimum od 17%, dok je prinos proteolitičke aktivnosti 19% i još uvek u porastu. Produženje vremena inkubacije iznad 1,5 h povoljno utiče isključivo na prinos proteolitičke aktivnosti prema azokazeinu, ali po cenu drastičnog gubitka egzozeptidazne aktivnosti, koja je za planiranu primenu od primarnog značaja. Vreme od 1,5 h stoga predstavlja najpovoljniji kompromis između istovremenog zadržavanja obe katalitičke aktivnosti.

#### 4.3.3.2.1.5 Desorpcija preparata Flavourzyme® imobilisanog na Ox-CNC

Radi kvantifikacije udela kovalentno imobilisanih komponenti preparata na Ox-CNC, sprovedena je desorpcija istim tretmanom (CaCl<sub>2</sub>/Triton X-100) na preparatima dobijenim nakon 1 h i 1,5 h imobilizacije sa inicijalnom koncentracijom proteina od 100 mg/g nosača.

Preostala proteolitička aktivnost prema azokazeinu nakon desorpcije iznosi 30% nakon 1 h i raste na 70% nakon 1,5 h, što ukazuje na intenzivno formiranje kovalentnih veza u vremenskom intervalu između 1 h i 1,5 h. Ovakav profil u skladu je sa već opisanim dvostepenim mehanizmom imobilizacije na aldehidnim nosačima, u kome brzu reverzibilnu adsorpciju prati sporije formiranje stabilnih kovalentnih veza [299, 304].

Preostala egzozeptidazna aktivnost nakon desorpcije iznosi 18% nakon 1 h i raste na 59% nakon 1,5 h. Ovaj nagli porast udela kovalentno vezane egzozeptidazne aktivnosti u relativno kratkom vremenskom intervalu ukazuje da se kovalentne Šifove baze sa lizinskim ostacima egzozeptidaznih komponenti preparata postepeno formiraju tokom inkubacije, i da je za njihovo efikasno fiksiranje neophodno produženo vreme imobilizacije iznad 1 h. Niska vrednost nakon 1 h (18%) ukazuje da egzozeptidazne komponente u toj fazi pretežno ostaju u reverzibilno adsorbovanom stanju, što je u

skladu sa dvostepenim mehanizmom kovalentne imobilizacije višekomponentnih preparata na aldehidnim nosačima [299, 304].

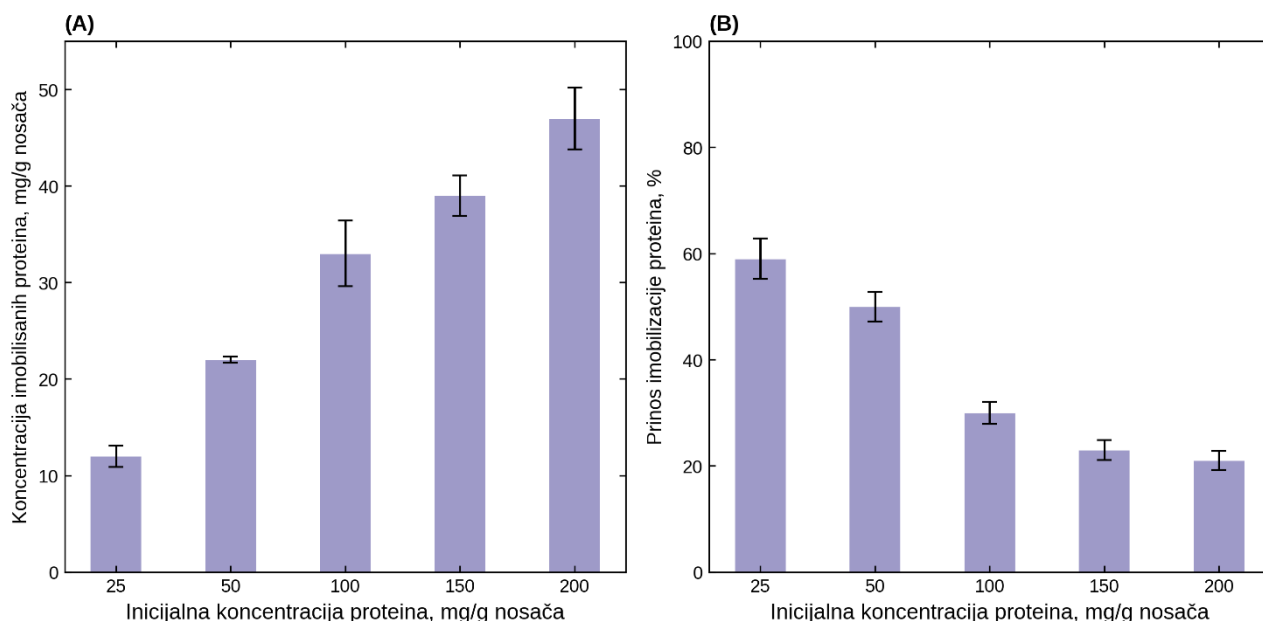
Na osnovu kinetičkih i desorpcionih rezultata, vreme inkubacije od 1,5 h odabrano je kao optimalno za imobilizaciju preparata Flavourzyme® na Ox-CNC. Pri ovom vremenu egzopeptidazna aktivnost dostiže svoj maksimum (17% prinosa imobilizacije aktivnosti) uz znatno povećan udeo kovalentno vezane aktivnosti (59% naspram 18% nakon 1 h), pre nego što nastupi nagli pad egzopeptidazne aktivnosti zbog desorpcije pri produženim vremenima inkubacije.

#### 4.3.3.2.2 Kovalentna imobilizacija preparata Flavourzyme® na GA-aktiviranu amino-modifikovanu nanocelulozu

Kovalentna imobilizacija preparata na GA-amino-CNC sprovedena je u 0,1 M Na-fosfatnom puferu pH 7,5, primenom istih uslova i po istom mehanizmu kao za preparat Alcalase® (formiranje Šifovih baza između aldehidnih grupa na distalnom kraju glutaraldehidnih mostova i deprotonovanih amino grupa lizinskih ostataka). U poređenju sa Ox-CNC, glutaraldehidni most uvodi prostornu distancu između površine nosača i kovalentno vezanog molekula enzima, što može povoljno uticati na orijentaciju prostorno zahtevnijih komponenti višekomponentnog proteolitičkog preparata Flavourzyme®, koji uključuje osam različitih enzima sa molekulskim masama od 27 do 90 kDa [219, 313].

##### 4.3.3.2.2.1 Efikasnost imobilizacije proteina preparata Flavourzyme® na GA-amino-CNC

Ispitivanje uticaja inicijalne koncentracije proteina na efikasnost vezivanja proteina ovog preparata na GA-amino-CNC sprovedeno je u opsegu inicijalnih koncentracija od 25–200 mg/g nosača na pH 7,5, a rezultati za koncentraciju imobilisanih proteina i prinos imobilizacije proteina prikazani su na slici 4.52.



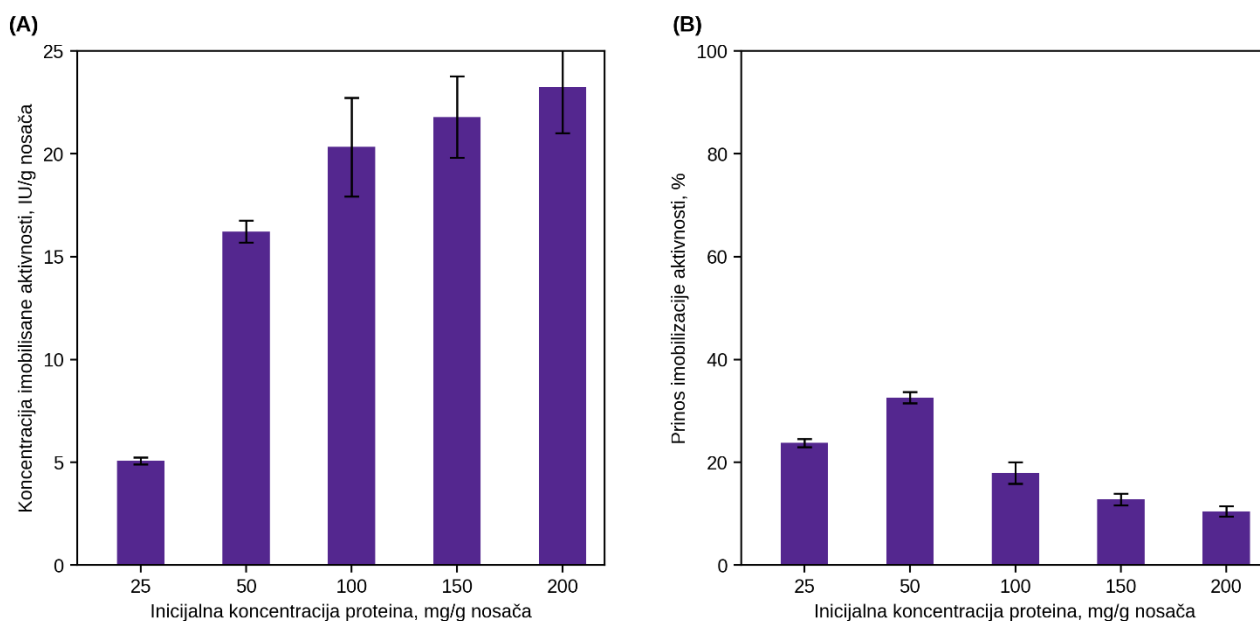
Slika 4.52. Uticaj inicijalne koncentracije proteina na (A) koncentraciju imobilisanih proteina i (B) prinos imobilizacije proteina prilikom kovalentne imobilizacije Flavourzyme® preparata na GA-amino-CNC. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina: 25, 50, 100, 150, 200 mg/g nosača; 0,1 M Na-fosfatni pufer pH 7,5, vreme imobilizacije 18 h.

Sa porastom inicijalne koncentracije proteina od 25 do 200 mg/g nosača, koncentracija imobilisanih proteina na GA-amino-CNC raste kontinualno od 12 mg/g nosača do 47 mg/g nosača, bez jasno

izraženog platoa u celom ispitivanom opsegu, što ukazuje da kapacitet vezivanja nosača nije iscrpljen na najvišoj ispitivanoj inicijalnoj koncentraciji (Slika 4.52. (A)). Odsustvo platoa ukazuje da glutaraldehidni most povećava geometrijsku dostupnost aldehidnih vezivnih mesta i smanjuje sterno ometanje između susednih proteinskih molekula pri visokim stepenima popunjenosti površine [219, 308]. Prinos imobilizacije proteina opada sa 59% pri inicijalnoj koncentraciji proteina od 25 mg/g nosača do 21% pri početnoj koncentraciji od 200 mg/g nosača, sa najstrmijim padom između koncentracija od 25 do 100 mg/g nosača, a potom ulazi u plato, što ukazuje na zasićenje konačnog broja reaktivnih grupa na površini nosača (Slika 4.52. (B)).

#### 4.3.3.2.2 Efikasnost imobilizacije endopeptidazne aktivnosti preparata Flavourzyme® na GA-amino-CNC

Paralelno sa praćenjem vezivanja proteina određivana je proteolitička aktivnost imobilisanih preparata prema azokazeinu u istom opsegu inicijalnih koncentracija, koja u preparatu dominantno odražava katalitičku efikasnost endopeptidaznih komponenti (Slika 4.53).



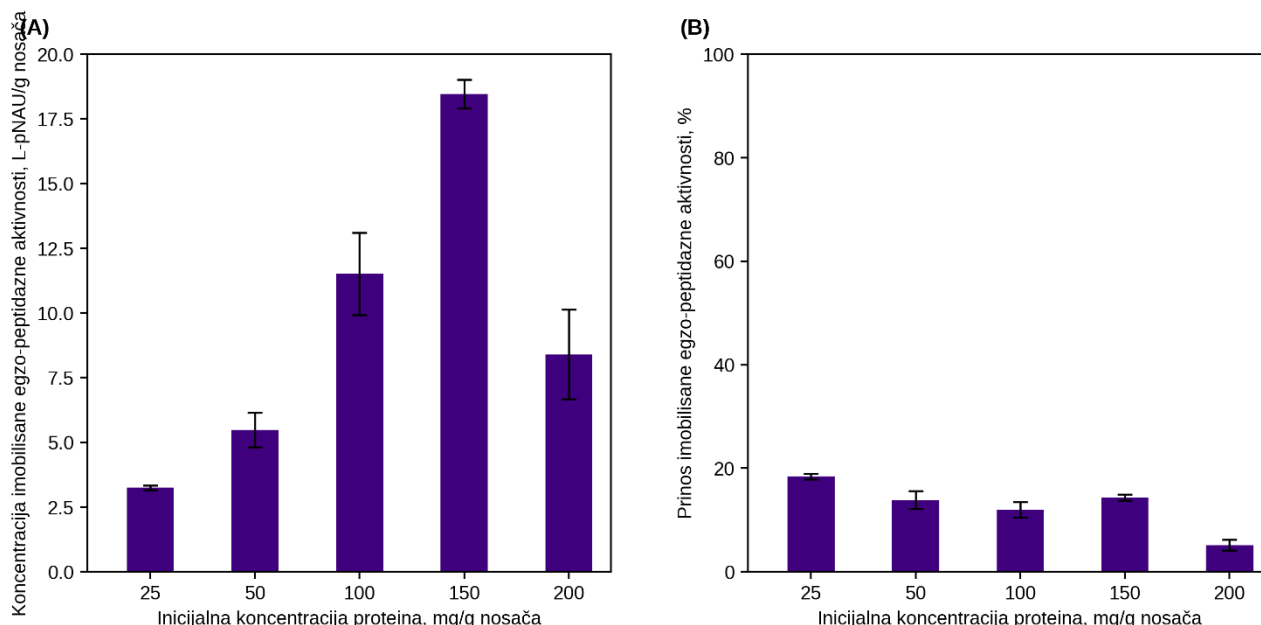
*Slika 4.53. Uticaj inicijalne koncentracije proteina na (A) koncentraciju imobilisane proteolitičke aktivnosti i (B) prinos imobilizacije proteolitičke aktivnosti prilikom kovalentne imobilizacije Flavourzyme® preparata na GA-amino-CNC nosače. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina: 25, 50, 100, 150, 200 mg/g nosača; 0,1 M Na-fosfatni pufer pH 7,5, vreme imobilizacije 18 h.*

Koncentracija imobilisane proteolitičke aktivnosti prema azokazeinu raste sa 5,2 IU/g nosača pri početnoj koncentraciji proteina od 25 mg/g nosača kontinuirano do 23 IU/g nosača pri početnoj koncentraciji od 200 mg/g nosača, bez pada koji bi ukazivao na sterno ometanje u ispitivanom opsegu (Slika 4.53. (A)). U slučaju ovog nosača, GA-amino-CNC imobilisana proteolitička aktivnost raste kontinuirano kroz ceo opseg, sa 5,2 na 23 IU/g nosača, odnosno oko četiri puta, bez nekog izraženijeg pada, ali sa ulaskom u plato pri inicijalnim koncentracijama višim od 100 mg/g nosača. Odsustvo pada aktivnosti pri višim inicijalnim koncentracijama konzistentno je sa mehanizmom vezivanja u kome prostorna distanca koju uvodi glutaraldehidni most smanjuje sterno ometanje između susednih molekula enzima i obezbeđuje dostupnost aktivnih centara supstratu čak i pri visokim površinskim gustinama enzima na nosaču [219, 308]. Prinos imobilizacije proteolitičke aktivnosti opada sa 24% pri inicijalnoj koncentraciji proteina od 25 mg/g nosača na 11% pri početnoj koncentraciji od 200 mg/g nosača, pri čemu se maksimalna vrednost od 33% dostiže pri inicijalnoj koncentraciji od 50 mg/g nosača, nakon čega sledi pad na 18% pri 100 mg/g nosača, nakon čega se profil postepeno

izravnava, što je karakteristično za kovalentnu imobilizaciju višekomponentnih proteolitičkih preparata [313] (Slika 4.53. (A)).

#### 4.3.3.2.2.3 Efikasnost imobilizacije egzo-peptidazne aktivnosti preparata Flavourzyme® na GA-amino-CNC

Egzo-peptidazna aktivnost imobilisanih preparata na GA-amino-CNC praćena je zasebno u istom opsegu inicijalnih koncentracija (Slika 4.54.).



*Slika 4.54. Uticaj inicijalne koncentracije proteina na (A) koncentraciju imobilisane egzo-peptidazne aktivnosti i (B) prinos imobilizacije egzo-peptidazne aktivnosti prilikom kovalentne imobilizacije Flavourzyme® preparata na GA-amino-CNC nosače. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina: 25, 50, 100, 150, 200 mg/g nosača 0,1 M Na-fosfatni pufer pH 7,5, vreme imobilizacije 18 h.*

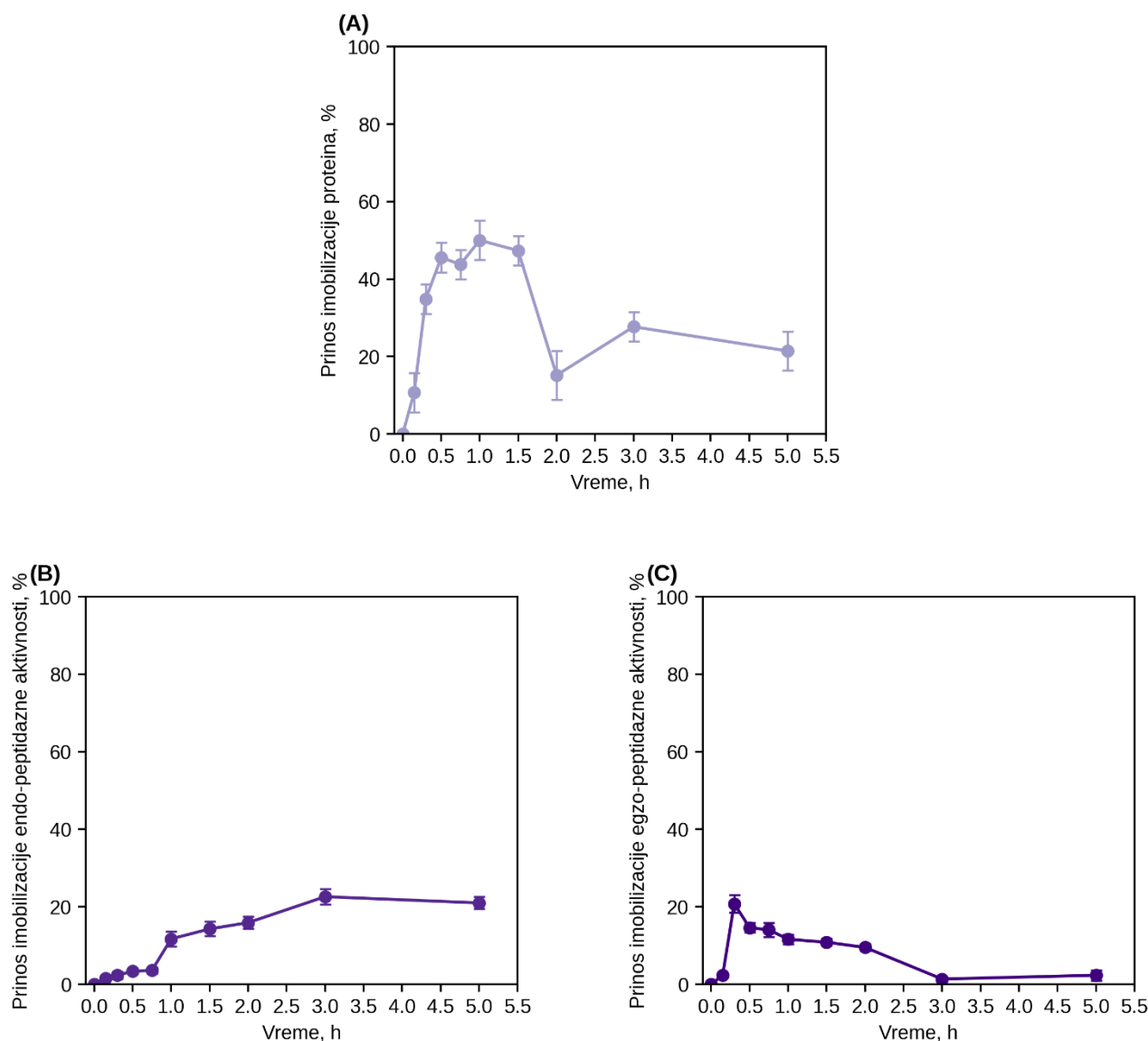
Koncentracija imobilisane egzo-peptidazne aktivnosti raste sa 3,3 L-pNAU/g nosača pri početnoj koncentraciji proteina od 25 mg/g nosača do maksimuma od 18,5 L-pNAU/g nosača pri inicijalnoj koncentraciji od 150 mg/g nosača, nakon čega pri početnoj koncentraciji od 200 mg/g nosača naglo opada na 8,5 L-pNAU/g nosača (Slika 4.54. (A)). Porast imobilisane aktivnosti je izražen u opsegu inicijalnih koncentracija proteina do 150 mg/g nosača, gde egzo-peptidazna aktivnost raste sa 3,3 na 18,5 L-pNAU/g nosača, odnosno oko šest puta, nakon čega pri inicijalnoj koncentraciji od 200 mg/g nosača naglo opada na 8,5 L-pNAU/g nosača, dakle za oko 10 L-pNAU/g nosača. Ovako izražen pad pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji proteina sugerise da pri visokim površinskim gustinama enzima na GA-amino-CNC dolazi do izraženijeg sternog ometanja egzo-peptidaznih komponenti: prostorna distanca koju uvodi glutaraldehidni most, koja pogoduje endopeptidazama, može istovremeno uvesti geometrijsku složenost koja postaje ograničavajuća za prostorno zahtevnije egzo-peptidaze pri visokim stepenima popunjenosti površine [219, 285, 313]. Prinos imobilizacije egzo-peptidazne aktivnosti opada sa 18% pri početnoj koncentraciji od 25 mg/g nosača na 5% pri koncentraciji od 200 mg/g nosača, sa najizraženijim padom u opsegu između početnih koncentracija od 25 do 100 mg/g nosača, nakon čega ulazi u plato, do ponovnog strmog pada pri najvišoj početnoj koncentraciji (Slika 4.54. (B)).

Kombinacijom oba ispitivana parametra katalitičke efikasnosti, izbor optimalne inicijalne koncentracije proteina na GA-amino-CNC zahteva kompromis između proteolitičke aktivnosti prema

azokazeinu i egzo-peptidazne aktivnosti. Prinos imobilizacije proteolitičke aktivnosti najpovoljniji je pri inicijalnoj koncentraciji proteina od 50 mg/g nosača (33%), dok egzo-peptidazna aktivnost dostiže maksimum pri inicijalnoj koncentraciji od 150 mg/g nosača (18,5 L-pNAU/g nosača), a pri početnoj koncentraciji od 100 mg/g nosača iznosi 11,5 L-pNAU/g nosača uz prinos od 12%. S obzirom na to da je egzo-peptidazna aktivnost od primarnog značaja za planiranu primenu, a vrednosti pri inicijalnoj koncentraciji od 100 mg/g nosača predstavljaju prihvatljiv kompromis između egzo-peptidazne aktivnosti i prinosa proteolitičke aktivnosti (18%), inicijalna koncentracija proteina od 100 mg/g nosača odabrana je kao optimalna za dalja ispitivanja na GA-amino-CNC.

#### 4.3.3.2.2.4 Kinetika imobilizacije preparata Flavourzyme® na GA-amino-CNC

Kinetika imobilizacije na GA-amino-CNC praćena je u vremenskom intervalu od 0 do 5 h pri inicijalnoj koncentraciji proteina od 100 mg/g nosača i pH 7,5, a rezultati su prikazani na slici 4.55.



Slika 4.55. Uticaj vremena imobilizacije na promenu prinosa imobilizacije proteina (A), prinosa imobilizacije endopeptidazne aktivnosti (B) i prinosa imobilizacije egzo-peptidazne aktivnosti (C) Flavourzyme® preparata na GA-amino-CNC nosaču. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 100 mg/g nosača; 0,1 M Na-fosfatni pufer pH 7,5; vreme imobilizacije 0–5 h.

Prinos imobilizacije proteina na GA-amino-CNC raste brzo sa oko 10% nakon 0,15 h do platoa od oko 44–50% između 0,5 i 1,5 h, nakon čega sledi nagli pad na oko 15% nakon 2 h, zatim delimičan

oporavak na oko 28% nakon 3 h i oko 22% nakon 5 h (Slika 4.55. (A)). Ovakav profil sa brzim platoon, naglim padom i delimičnim rastom odražava složenu dinamiku adsorpcije i kovalentnog vezivanja višekomponentnog proteolitičkog preparata: početna brza adsorpcija formira gust proteinski sloj, koji se nakon 2 h delimično reorganizuje desorpcijom slabije vezanih komponenti, dok sporije kovalentno vezivanje preko glutaraldehidnih mostova postepeno stabilizuje deo preostalih molekula [219, 304].

Prinos imobilizacije proteolitičke aktivnosti prema azokazeinu pokazuje kasni ali intenzivan porast. Prinos aktivnosti ostaje nizak (2–4%) do 0,75 h, a potom naglo raste na 12% nakon 1 h i kontinuirano do 23% nakon 3 h, uz blagi pad na 21% nakon 5 h (Slika 4.55. (B)). Nagli skok između 0,75 i 1 h konzistentan je sa dvostepenim mehanizmom imobilizacije na nosačima aktiviranim glutaraldehidom, u kojem endopeptidazne komponente najpre adsorpcijom zauzimaju povoljne pozicije, a zatim intenzivno formiraju kovalentne veze [304].

Nasuprot tome, prinos egzopeptidazne aktivnosti pokazuje izrazito drugačiji profil. Egzopeptidazna aktivnost dostiže nagli maksimum od 21% već nakon 0,3 h, a potom kontinuirano opada do 15% nakon 0,5 h, 12% nakon 1 h i drastično pada do 2% nakon 5 h (Slika 4.55. (C)). Ovakav profil sa ranim maksimumom i kasnijim padom na vrednosti bliske nuli ukazuje da se egzopeptidazne komponente brzo i efikasno adsorbuju u katalitički povoljnim orijentacijama, ali su izrazito podložne desorpciji, pri čemu efikasno formiranje kovalentnih veza izostaje, kao što je primećeno i kod imobilizacije na Ox-CNC. Jedan od mogućih razloga je nepovoljna pozicija lizinskih ostataka u odnosu na aktivni centar egzopeptidaznih komponenti, tako da eventualno kovalentno vezivanje preko ovih ostataka može ometati katalitičku aktivnost, dok adsorbovani molekuli u povoljnoj orijentaciji ne prelaze u kovalentno vezane molekule.

#### 4.3.3.2.2.5 Desorpcija preparata Flavourzyme® imobilisanog na GA-amino-CNC

Radi kvantifikacije udela kovalentno vezanih komponenti preparata na GA-amino-CNC, sprovedeni su eksperimenti desorpcije istim tretmanom ( $\text{CaCl}_2$ /Triton X-100) na nanobiokatalitičkim sistemima dobijenim nakon 30 min i 1 h imobilizacije sa inicijalnom koncentracijom proteina od 100 mg/g nosača.

Preostala proteolitička aktivnost prema azokazeinu nakon desorpcije iznosi 15,55% nakon 30 min i izraženo raste na 75,77% nakon 1 h, što ukazuje na intenzivno formiranje kovalentnih veza u vremenskom intervalu između 30 min i 1 h. Ovakav profil odgovara istom dvostepenom mehanizmu, pri čemu kovalentno vezivanje posredovano glutaraldehidnim mostom zahteva nešto duže vreme reakcije kako bi se uspostavile kovalentne veze prema lizinskim ostacima enzima [219, 304].

Preostala egzopeptidazna aktivnost nakon desorpcije iznosi 10,70% nakon 30 min i raste na 52,90% nakon 1 h. Niži udeo kovalentno vezane egzopeptidazne aktivnosti u poređenju sa proteolitičkom aktivnošću prema azokazeinu (52,90% naspram 75,77% nakon 1 h) konzistentan je sa kinetičkim profilom koji pokazuje da egzopeptidazne komponente na GA-amino-CNC pretežno ostaju u reverzibilno adsorbovanom stanju i podložne su desorpciji pri produženim vremenima inkubacije. Jedan od mogućih razloga je nepovoljna pozicija lizinskih ostataka u odnosu na aktivni centar egzopeptidaznih komponenti. Kovalentno vezivanje preko ovih ostataka može ometati katalitičku aktivnost, dok molekuli u povoljnoj orijentaciji ostaju adsorbovani [271, 313].

Na osnovu svih dobijenih rezultata, vreme inkubacije od 1 h odabrano je kao optimalno za imobilizaciju Flavourzyme® preparata na GA-amino-CNC, jer obezbeđuje visok udeo kovalentno vezane proteolitičke aktivnosti prema azokazeinu (76%) uz prihvatljiv udeo kovalentno vezane egzopeptidazne aktivnosti (53%).

#### 4.3.3.2.3 Usporedna analiza kovalentne imobilizacije preparata Flavourzyme® na Ox-CNC i GA-amino-CNC

Sumirani parametri kovalentne imobilizacije preparata Flavourzyme® na Ox-CNC i GA-amino-CNC dobijeni korišćenjem optimalnih uslova imobilizacije prikazani su u tabeli 4.5. Za oba nosača kao optimalna inicijalna koncentracija proteina odabrana je 100 mg/g nosača, pH 9,5 za Ox-CNC i pH 7,5 za GA-amino-CNC, dok se optimalna vremena imobilizacije razlikuju: 1,5 h za Ox-CNC i 1 h za GA-amino-CNC.

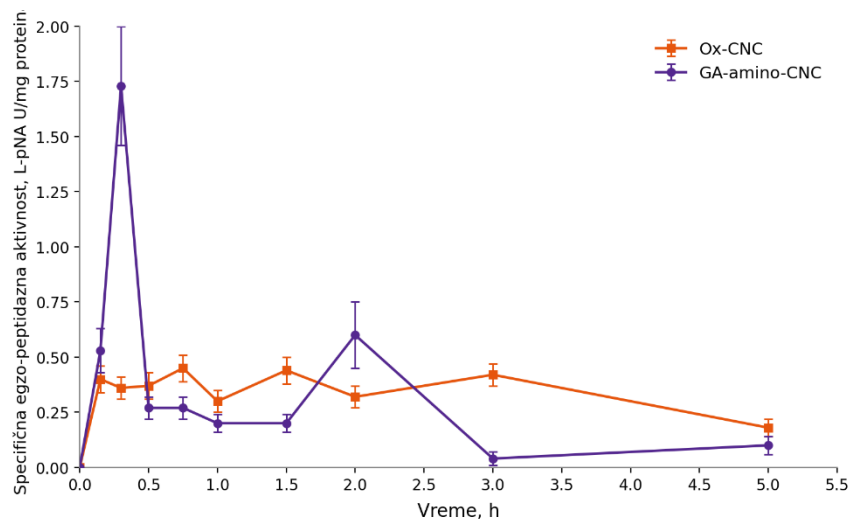
*Tabela 4.5. Poređenje parametara kovalentne imobilizacije preparata Flavourzyme® na Ox-CNC i GA-amino-CNC pri optimalnim uslovima i nakon desorpcionog tretmana (početna koncentracija proteina 100 mg/g nosača; Ox-CNC pH 9,5, 1,5 h; GA-amino-CNC pH 7,5, 1 h).*

| Nosač        | Koncentracija imobilisanih proteina (mg/g nosača) | Prinos imobilizacije proteina (%) | Koncentracija imobilisane proteolitičke aktivnosti (IU/g nosača) | Prinos imobilizacije proteolitičke aktivnosti (%) | Specifična proteolitička aktivnost (IU/mg proteina) | Koncentracija imobilisane egzopeptidazne aktivnosti (L-pNAU/g) | Prinos imobilizacije egzopeptidazne aktivnosti (%) | Specifična egzopeptidazna aktivnost (L-pNAU/mg proteina) |
|--------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Ox-CNC       | 37                                                | 35                                | 16,5                                                             | 15                                                | 0,47                                                | 17                                                             | 17                                                 | 0,44                                                     |
| GA-amino-CNC | 56                                                | 50                                | 20,3                                                             | 18                                                | 0,62                                                | 11                                                             | 12                                                 | 0,20                                                     |

Pri optimalnim uslovima na dva nosača uočava se različita raspodela vezanih proteolitičkih komponenti preparata između endopeptidazne i egzopeptidazne aktivnosti. Preparat imobilisan na GA-amino-CNC dostiže višu koncentraciju aktivnosti i specifičnu proteolitičku aktivnost prema azokazeinu (0,62 naspram 0,47 IU/mg proteina), što ukazuje da prisustvo glutaraldehidnog mosta pogoduje kovalentnom vezivanju endopeptidaznih komponenti, dok je preparat imobilisan na Ox-CNC ispoljio višu egzopeptidaznu aktivnost, kao i višu specifičnu egzopeptidaznu aktivnost (0,44 naspram 0,20 L-pNAU/mg proteina).

Posmatrajući odnose prinosa imobilizacije endo- i egzopeptidaznih komponenti, vidi se različita selektivnost dva nosača: na Ox-CNC prinos egzopeptidazne aktivnosti (17%) je viši od prinosa proteolitičke aktivnosti prema azokazeinu (15%), dok je na GA-amino-CNC obrazac obrnut. Naime, prinos proteolitičke aktivnosti (18%) je viši od prinosa egzopeptidazne (12%). Ovaj rezultat ukazuje da Ox-CNC favorizuje vezivanje egzopeptidaznih, a GA-amino-CNC endopeptidaznih komponenti preparata, verovatno usled različite prostorne dostupnosti lizinskih ostataka za reakciju sa aldehidnim grupama u zavisnosti od geometrije nosača (kratke C=N veze na Ox-CNC naspram glutaraldehidnih mostova na GA-amino-CNC).

Iako razlike u apsolutnim vrednostima imobilisane aktivnosti pokazuju izvesnu selektivnost svakog nosača, praćenje specifične egzopeptidazne aktivnosti tokom vremena imobilizacije razdvaja doprinos količine vezanog proteina od katalitičke efikasnosti pojedinačnih molekula (Slika 4.56).



*Slika 4.56. Promena specifične egzo-peptidazne aktivnosti kovalentno imobilisanog Flavourzyme® preparata na Ox-CNC i GA-amino-CNC u zavisnosti od vremena imobilizacije. Eksperimentalni uslovi imobilizacije: inicijalna koncentracija proteina 100 mg/g nosača; Ox-CNC – 0,1 M Na-karbonatni pufer pH 9,5; GA-amino-CNC – 0,1 M Na-fosfatni pufer pH 7,5; vreme imobilizacije 0–5 h.*

Na GA-amino-CNC specifična egzo-peptidazna aktivnost dostiže visoku vrednost od 1,73 L-pNAU/mg proteina već nakon 0,15 h, nakon čega naglo opada na 0,52 L-pNAU/mg proteina nakon 0,3 h i nastavlja postepeno da opada do vrednosti bliskih nuli nakon 3–5 h. Ovaj profil ukazuje da egzo-peptidazne komponente u ranoj fazi adsorpcije zauzimaju izrazito povoljne orijentacije, ali se sa vremenom progresivno deaktiviraju, verovatno usled konformacionih promena tokom postepenog kovalentnog vezivanja preko lizinskih ostataka u blizini aktivnog centra. Na Ox-CNC specifična egzo-peptidazna aktivnost pokazuje stabilniji profil sa vrednostima u opsegu 0,30–0,46 L-pNAU/mg proteina kroz ceo ispitivani interval, sa blagim padom na 0,18 L-pNAU/mg proteina nakon 5 h.

Uzimajući zajedno sve ispitivane parametre, oba nosača pokazuju karakteristične i komplementarne prednosti pri kovalentnoj imobilizaciji preparata Flavourzyme®: Ox-CNC obezbeđuje višu i stabilniju egzo-peptidaznu aktivnost po jedinici mase vezanog proteina, dok se na GA-amino-CNC ostvaruje viša proteolitička aktivnost prema azokazeinu i bolje očuvanje endopeptidaznih komponenti. Konačan izbor između ova dva nosača zavisi od konkretnog biokatalitičkog konteksta, posebno pri kombinovanoj primeni sa drugim proteolitičkim enzimima u sekvencijalnoj hidrolizi proteinskih supstrata.

#### *4.3.3.3 Poređenje kovalentne imobilizacije preparata Alcalase® i Flavourzyme® na oksidovanoj i GA-aktiviranoj amino-modifikovanoj nanocelulozi*

Kovalentna imobilizacija dva proteolitička preparata na Ox-CNC i GA-amino-CNC odvija se po istom dvostepenom mehanizmu. Inicijalna adsorpcija praćena je postepenim formiranjem stabilnih Šifovih baza između aldehidnih grupa nosača i amino grupa lizinskih ostataka enzima, ali sa suštinskim razlikama koje proizilaze iz jednodokomponentne naspram višekomponentne prirode dva preparata.

Alcalase®, kao jednodokomponentni preparat, pokazuje pravilnije kinetičke profile na oba nosača, ali sa različitim optimalnim vremenima imobilizacije (3 h za Ox-CNC i 18 h za GA-amino-CNC), što odražava bržu kinetiku formiranja direktnih C=N veza na Ox-CNC naspram sporijeg, geometrijski zahtevnijeg vezivanja posredovanog glutaraldehidnim mostom na GA-amino-CNC. Kako je detaljno prikazano u prethodnom poglavlju, sa optimalnim uslovima GA-amino-CNC nosač se pokazao povoljnijim po više parametara (viši kapacitet vezivanja, veća apsolutna imobilisana aktivnost i znatno viši udeo kovalentno vezanog enzima), uz praktično ekvivalentne specifične aktivnosti na oba

nosača. Slične specifične aktivnosti potvrđuju da ni jedan ni drugi način vezivanja ne narušava konformaciju aktivnog centra preparata Alcalase®, što je u skladu sa rasporedom lizinskih ostataka pretežno na strani molekula suprotnoj od aktivnog centra.

Flavourzyme®, kao višekomponentni preparat sa osam enzima različitih molekulskih masa, naelektrisanja i položaja aktivnih centara, ispoljava znatno kompleksnije ponašanje tokom imobilizacije. Njegove endopeptidazne i egzopeptidazne komponente vezuju se selektivno i sa različitim kinetikom, pa se odnos endo- i egzopeptidazne aktivnosti menja u zavisnosti od nosača: Ox-CNC favorizuje stabilizaciju egzopeptidaznih, a GA-amino-CNC endopeptidaznih komponenti preparata. Ova selektivnost imobilizacije, koja nije prisutna kod preparata Alcalase®, predstavlja specifičan izazov pri imobilizaciji višekomponentnih preparata, ali i potencijalnu prednost, jer omogućava podešavanje proteolitičkog profila imobilisanog preparata kroz izbor nosača.

Zanimljiv obrazac koji se uočava poređenjem ovih preparata jeste obrnut redosled brzine kovalentnog vezivanja na dva nosača u zavisnosti od kompleksnosti preparata: dok kod preparata Alcalase® imobilisane na Ox-CNC maksimalna specifična aktivnost se dostiže znatno brže nego na GA-amino-CNC (3 h naspram 18 h), kod složenijeg Flavourzyme® preparata optimalna vremena su skoro identična, sa blagom prednošću GA-amino-CNC (1 h naspram 1,5 h za Ox-CNC). Ovakav obrazac može se objasniti različitim geometrijskim zahtevima za kovalentno vezivanje na dva nosača: kod jednokomponentnog preparata, gde su svi molekuli enzima identični i sa istim rasporedom lizinskih ostataka, direktne i kratke C=N veze na Ox-CNC formiraju se brzo jer je geometrijska kompatibilnost nosača i enzima jednoznačno definisana, dok glutaraldehidni most na GA-amino-CNC zahteva duže vreme za formiranje stabilne veze i povoljne orijentacije molekula enzima. Nasuprot tome, kod višekomponentnog preparata, gde se na nosač vezuje više različitih proteinskih komponenti sa različitim prostornim rasporedom reaktivnih amino grupa, prostorna distanca koju uvodi glutaraldehidni most omogućava bržu reakciju sa različitim enzimskim molekulima, dok kratke direktne veze na Ox-CNC zahtevaju strože geometrijsko poklapanje za svaku pojedinačnu komponentu, što usporava ukupnu kinetiku vezivanja.

Uzimajući u obzir komplementarno delovanje ova dva preparata u sekvencijalnoj hidrolizi proteinskih supstrata gde Alcalase® inicijalno razlaže intaktne proteine endoproteaznom aktivnošću na peptidne fragmente, dok Flavourzyme® te fragmente dalje hidrolizuje kombinovanom endo- i egzopeptidaznom aktivnošću do slobodnih aminokiselina i di-tripeptida, kao najpogodnija strategija za biokatalitičku primenu u preradi proteinskih frakcija nusproizvoda prehrambene industrije nameće se kovalentna imobilizacija oba enzima na GA-amino-CNC. Ovaj izbor opravdan je time što GA-amino-CNC za preparat Alcalase® daje povoljnije karakteristike imobilisanog preparata po više parametara, a za Flavourzyme® viši prinos endopeptidazne (proteolitičke) aktivnosti, što kod višekomponentnog preparata znači efikasnije početno cepanje peptidnih veza; eventualni gubitak egzopeptidazne aktivnosti može se kompenzovati podešavanjem odnosa imobilisanih preparata u sekvencijalnoj hidrolizi. Dodatno, primena istog nosača za oba enzima pojednostavljuje pripremu biokatalitičkog sistema i omogućava njegovo direktno upoređivanje u uslovima realnih supstrata, što će biti detaljnije prikazano u poglavlju o sekvencijalnoj proteolitičkoj hidrolizi.

#### 4.4 PRIMENA IMOBILISANIH ENZIMA

Nakon detaljnog ispitivanja uticaja uslova imobilizacije na različite nosače adsorpcijom i kovalentnom imobilizacijom odabrani su optimalni uslovi imobilizacije korišćenih enzima. Dalje su dobijeni nanobiokatalizatori, ispitani u enzimskoj obradi sirovina značajnih za prehrambenu industriju i dobijanje proizvoda sa dodatom vrednošću (oligosaharida i peptida). Kriterijum za odabir preparata za primenu bio je kombinacija visokog prinosa imobilizacije aktivnosti, zadovoljavajuće specifične aktivnosti i visokog udela kovalentno vezanog enzima, budući da mogućnost višekratne primene i odsustvo kontaminacije proizvoda slobodnim enzimom predstavljaju ključne zahteve za industrijsku primenu.

Ispitana su tri enzimska sistema i tri klase supstrata:

- imobilisana ksilanaza iz preparata Rohalase® SEP-Visco primenjena je u hidrolizi ksilanske frakcije suncokretove sačme radi dobijanja XOS sa potencijalnim prebiotskim dejstvom;
- imobilisana endopoligalakturonaza iz preparata Pectinex® Ultra SP-L primenjena je u hidrolizi pektinskih frakcija sačme uljane repice i pogače crne ribizle radi dobijanja POS;
- imobilisane proteaze iz preparata Alcalase® i Flavourzyme® primenjeni su sekvencijalno u hidrolizi proteinske frakcije suncokretove sačme radi dobijanja proteinskih hidrolizata.

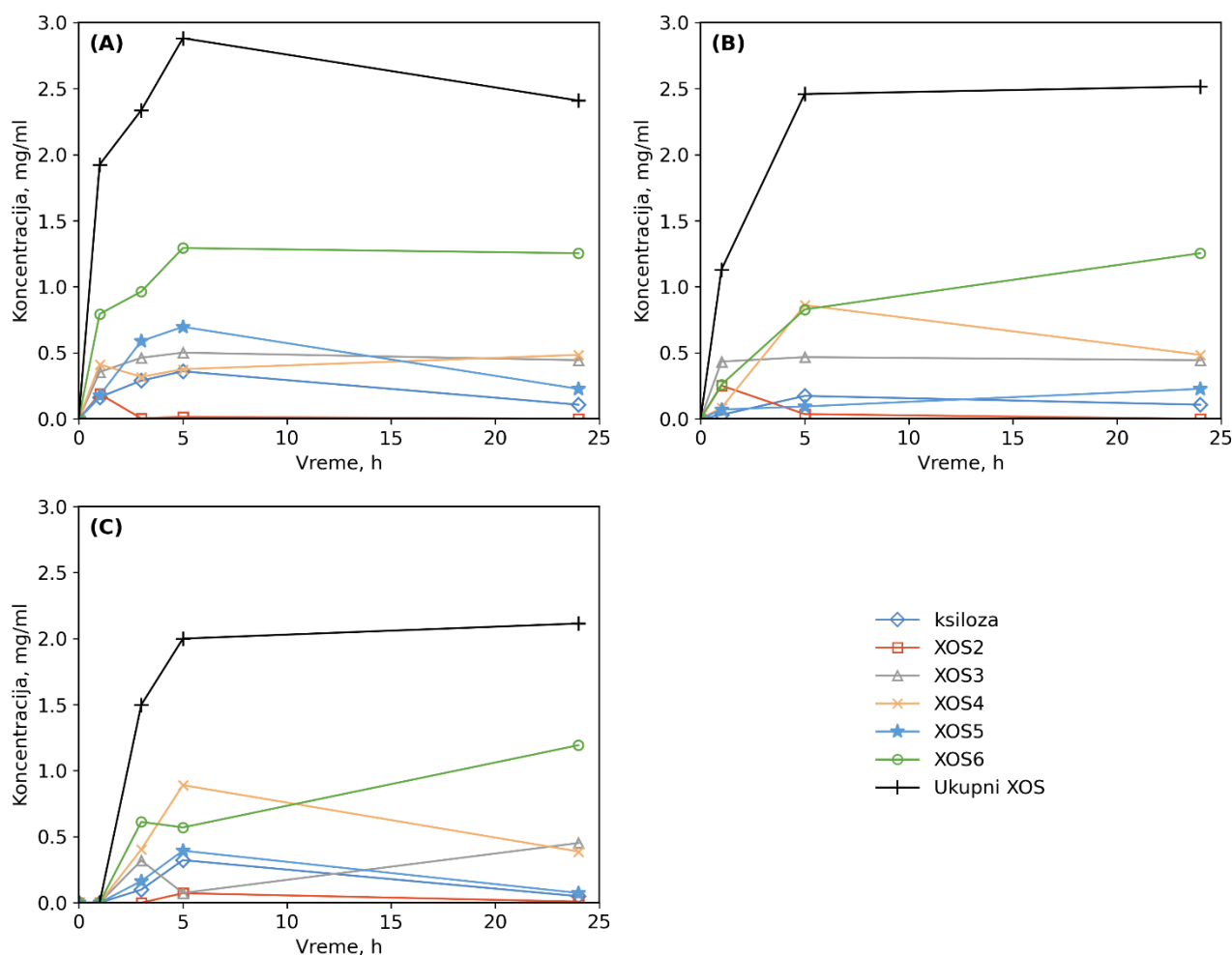
Za svaki enzimski sistem praćen je profil i prinos ciljnih proizvoda hidrolize, stabilnost imobilisanog preparata kroz višekratnu primenu, kao i prebiotski potencijal dobijenih oligosaharida gde je to primenljivo. Ovakav pristup omogućava direktnu procenu biokatalitičkog potencijala dobijenih imobilisanih bionanokatalitičkih sistema u uslovima bliskim industrijskoj primeni, i pruža osnovu za poređenje performansi imobilisanih preparata sa slobodnim enzimima korišćenjem istih reakcionih uslova.

#### **4.4.1 Primena imobilisanog preparata Rohalase® SEP Visco u hidrolizi ksilanske frakcije suncokretove sačme**

Za primenu u hidrolizi ksilanske frakcije suncokretove sačme odabran je enzim ksilanaza iz preparata Rohalase® SEP-Visco imobilisan na Ox-CNC i GA-amino-CNC, koji su u prethodnom poglavlju pokazali povoljne prinose imobilizacije aktivnosti, specifične aktivnosti i udele kovalentno vezanog enzima. Supstrat za hidrolizu je dobijen alkalnom ekstrakcijom prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.5.1. Cilj eksperimenta bio je dobijanje XOS stepena polimerizacije 2–6, za koje se smatra da ispoljavaju prebiotsko dejstvo, i poređenje efikasnosti slobodnog i imobilisanog preparata sa identičnom početnom enzimskom aktivnošću. U svim eksperimentima praćeni su prinos i profil XOS (HPLC analizom), kao i preostala aktivnost nakon ponovljenih ciklusa hidrolize. Nakon definisanja optimalnih uslova hidrolize, ispitan je i prebiotski potencijal dobijenih hidrolizata.

##### *4.4.1.1 Analiza aktivnosti i stabilnosti imobilisanog enzima*

Radi sagledavanja uticaja imobilizacije na efikasnost hidrolize i profil nastalih XOS, ksilanska frakcija suncokretove sačme hidrolizovana je sa tri enzimska sistema: ksilanazom imobilisanom na Ox-CNC i GA-amino-CNC i slobodnim enzimskim preparatom, sa jednakom unetom aktivnošću od 12 IU u sva tri eksperimenta pri identičnim reakcionim uslovima. Praćena je promena koncentracije ukupnih XOS i pojedinačnih frakcija (XOS2–XOS6), kao i koncentracija slobodne ksiloze. Tok hidrolize i profil nastalih XOS prikazani su na slici 4.57.



Slika 4.57. Tok hidrolize ksilana i profil XOS (2–6 jedinica) enzimom ksilanaze (Rohalase® SEP-Visco) imobilisanom na Ox-CNC (A), GA-amino-CNC (B) i slobodnim enzimom (C).

Eksperimentalni uslovi: ksilanska frakcija suncokretove sačme (1 % (m/v)), 100 mM Na-fosfatni pufer pH 6,0, temperatura 60 °C, enzimska aktivnost 12 IU, agitacija 150 rpm, ukupna zapremina 20 mL.

U sva tri ispitivana sistema ukupna koncentracija XOS brzo raste tokom početne faze hidrolize dostižući maksimalnu vrednost nakon 5 h reakcije, nakon čega blago opada ili ostaje praktično nepromenjena do kraja eksperimenta. Ovakva kinetika karakteristična je za endo-ksilanaze koje deluju na unutrašnje  $\beta$ -1,4-glikozidne veze ksilana i dovode do brze inicijalne depolimerizacije supstrata, dok je dalja hidroliza nastalih kraćih oligosaharida znatno sporija zbog nižeg afiniteta enzima prema kratkim lancima [325].

Najveća ukupna koncentracija XOS postignuta je primenom ksilanaze imobilisane na Ox-CNC (2,9 mg/mL nakon 5 h, slika 4.57. (A)), dok imobilisana ksilanaza na GA-amino-CNC (slika 4.57. (B)) i slobodna ksilanaza (slika 4.57. (C)) u istoj vremenskoj tački ostvaruju niže vrednosti, od oko 2,5 i 2,0 mg/mL. Viši prinos XOS prilikom primene imobilisanih preparata konzistentan je sa literaturnim podacima koji pokazuju da imobilizacija može povoljno uticati na distribuciju i prinos oligosaharida [326, 327]. Niske koncentracije ksiloze u svim sistemima tokom čitavog ispitivanog intervala (<0,4 mg/mL) potvrđuju da preparat Rohalase® SEP-Visco ispoljava zanemarljivu  $\beta$ -ksilozidaznu aktivnost prema korišćenom supstratu pri odabranim uslovima [12].

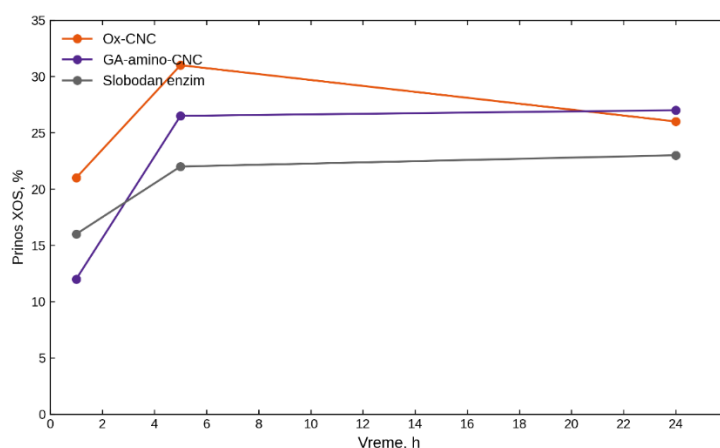
Dominantna frakcija na kraju reakcije u svim sistemima je XOS6, ali se redosled frakcija menja tokom vremena: nakon 5 h XOS6 je najzastupljenija samo u sistemu sa ksilanazom imobilisanom na Ox-CNC (1,3 mg/mL), dok je u preostala dva sistema u toj tački najzastupljenija frakcija XOS4.

Koncentracija XOS6 raste tokom prvih 5 h reakcije, nakon čega kod ksilanaze imobilisane na Ox-CNC ostaje praktično nepromenjena do kraja praćenog intervala, dok u preostala dva sistema nastavlja da raste do 24 h, i to znatno: sa 0,8 na 1,3 mg/mL kod GA-amino-CNC i sa 0,6 na 1,2 mg/mL kod slobodnog enzima. U prikazanim eksperimentima u početnim vremenima je znatno veća koncentracija XOS6 tokom hidrolize imobilisanim enzimima. Dominacija frakcija višeg stepena polimerizacije (XOS5–XOS6) u imobilisanim sistemima može se objasniti ograničenjima difuzije i orijentacije supstrata u blizini imobilisanih molekula enzima, što sprečava sukcesivnu hidrolizu dugih frakcija u kratke produkte.

Frakcije XOS3, XOS4 i XOS5 dostižu maksimalne vrednosti u intervalu od 3 do 5 h, nakon čega se njihovo dalje ponašanje razlikuje između sistema. Kod ksilanaze imobilisane na Ox-CNC opada samo XOS5 (sa 0,7 na 0,2 mg/mL), dok se koncentracije XOS3 i XOS4 zadržavaju ili blago rastu do 24 h. Kod ksilanaze imobilisane na GA-amino-CNC opada XOS4 (sa 0,9 na 0,5 mg/mL), dok XOS3 i XOS5 ostaju praktično nepromenjeni. Kod slobodnog enzima opadaju XOS4 (sa 0,9 na 0,4 mg/mL) i XOS5 (sa 0,4 na 0,1 mg/mL), dok koncentracija XOS3 raste do 24 h. Razlike u raspodeli XOS frakcija između slobodnog i imobilisanih preparata ukazuju na to da imobilizacija utiče na dalju transformaciju nastalih oligosaharida. Ovakvo ponašanje može biti posledica promena u mikrokruženju aktivnog centra enzima i njegove konformacije, što je i ranije opisano za imobilisane hidrolitičke enzime [326]. Stepenn polimerizacije dominantnih frakcija XOS dobijenih u ovom radu (XOS3–XOS6) odgovara frakcijama sa dokumentovanim prebiotskim efektom selektivnom fermentacijom od strane bifidobakterija i laktobacila [196, 328].

Treba napomenuti da korišćena HPLC metoda kvantifikuje isključivo frakcije do XOS6, pa eventualno nastajanje oligosaharida višeg stepena polimerizacije nije moguće isključiti. Za potpuno razjašnjenje dinamike redistribucije frakcija bila bi potrebna dopunska analiza reakcionih smeša metodama koje pokrivaju širi opseg stepena polimerizacije.

Na osnovu vrednosti ukupne koncentracije XOS prikazane na slici 4.57. imajući u vidu početnu koncentraciju korišćene ksilanske frakcije kao i njenu čistoću (oko 8% nečistoće), preračunati su i ukupni prinosi XOS dobijeni u toku reakcije hidrolize. Ovi rezultati su prikazani na slici 4.58.



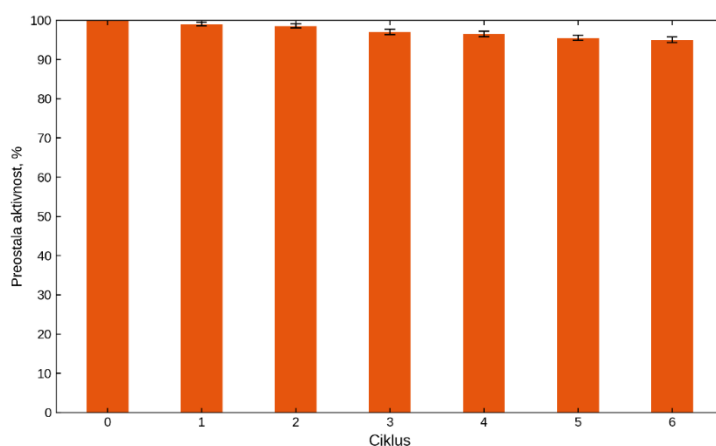
*Slika 4.58. Ukupan prinos XOS nakon hidrolize ksilana korišćenjem ksilanaze: slobodnog enzima i enzima imobilisanog na Ox-CNC i GA-amino-CNC. Eksperimentalni uslovi: ksilanska frakcija suncokretove sačme 1% (m/v), 100 mM Na-fosfatni pufer pH 6,0, temperatura 60 °C, enzimska aktivnost 12 IU, mešanje 150 rpm, ukupna zapremina 20 mL.*

Najviši prinos XOS u celom ispitivanom intervalu ostvaruje se primenom Ox-CNC-ksilanaze, već nakon 1 h reakcije (21%). Nakon toga, prinos nastavlja da raste do maksimuma od 31% nakon 5 h, a zatim opada na 26% nakon 24 h. Pad prinosa nakon dužeg vremena reakcije nije praćen porastom koncentracije ksiloze, već preraspodelom unutar XOS frakcija: smanjenje udela XOS5 (sa 0,7 na 0,2 mg/mL) praćeno je porastom XOS4 i XOS3, što je u skladu sa endo-mehanizmom delovanja

ksilanaze, kod koga se duži oligosaharidi cepaju na kraće, bez oslobađanja ksiloze. GA-amino-CNC-ksilanaza nakon 1 h pokazuje najniži prinos od sva tri sistema (12%), ali raste kontinualno do 27% nakon 5 h gde ostaje u platou do 24 h. Slobodni enzim ispoljava najstabilniji tok prinosa, raste od 16% nakon 3 h do 22% nakon 5 h i ostaje praktično nepromenjen do 24 h, ali pri svim ispitivanim vremenima ostvaruje niže vrednosti od oba imobilisana preparata. Na osnovu toka prinosa XOS, vreme reakcije od 5 h usvojeno je kao optimalno za hidrolizu ksilana do XOS primenom Ox-CNC-ksilanaze, dok je prinos XOS dobijen ksilanazom imobilisanom na GA-amino-CNC jednak nakon 5 h kao i nakon 24 h, što omogućava fleksibilnost primene ovog sistema u izboru trajanja procesa bez značajnog gubitka prinosa. Za ispitivanje prebiotske aktivnosti, prikazano u nastavku, za sva tri sistema korišćeni su hidrolizati uzorkovani nakon 5 h reakcije.

Postignuti prinos XOS od 31% se smatra izuzetno dobrim prinosom, posebno kada se uzme u obzir da se koristi otpadna biomasa kao sirovina, što doprinosi cirkularnoj ekonomiji i proširenju primene potencijalnih prebiotika u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. U poređenju sa literaturnim podacima za hidrolizu ksilana poreklom iz različitih biomasa, dobijeni prinosi bili su uporedivi sa vrednostima prijavljenim za slobodne enzime. Naime, prinosi od 28,6%, 33,2%, 31,8% i 34,2% ostvareni su pri hidrolizi ksilana iz kukuruznog klipa [325], slame šećerne trske [329], otpada šećerne trske [328] i smeše žitarica i pirinčanih ljuštura [330], redom. Prinos postignut u ovom radu je dakle na nivou najboljih vrednosti opisanih za slobodne enzime, uz prednost moguće višekratne upotrebe imobilisanog preparata. Pored toga, postignuti prinos je viši u odnosu na vrednosti opisane za imobilizaciju ksilanaza na alternativnim nanomaterijalima: prinos XOS od 23% je postignut korišćenjem  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}@\text{MOF}$ -ksilanaze [327], 22% ksilanazom imobilisanom na funkcionalizovanim ugljeničnim nanocevima [280] i 23% za gliksal-agaroz-ksilanazu [326], što potvrđuje komparativnu prednost nosača korišćenih u ovom radu, u pogledu prinosa XOS.

Budući da je ksilanaza imobilisana na Ox-CNC ostvarila najviši prinos XOS, a u prethodnom poglavlju i najveći udeo kovalentno vezanog enzima nakon desorpcije, ovaj nanobiokatalitički sistem odabran je za ispitivanje stabilnosti u višekratnoj primeni. Svaki ciklus hidrolize trajao je 3 h na temperaturi od 60 °C u 0,1 M Na-fosfatnom puferu pH 6, nakon čega je imobilisani preparat odvojen centrifugiranjem, ispran dva puta istim puferom i primenjen u sledećem ciklusu. Preostala aktivnost izražena je relativno u odnosu na aktivnost u nultom ciklusu i prikazana je na slici 4.59.



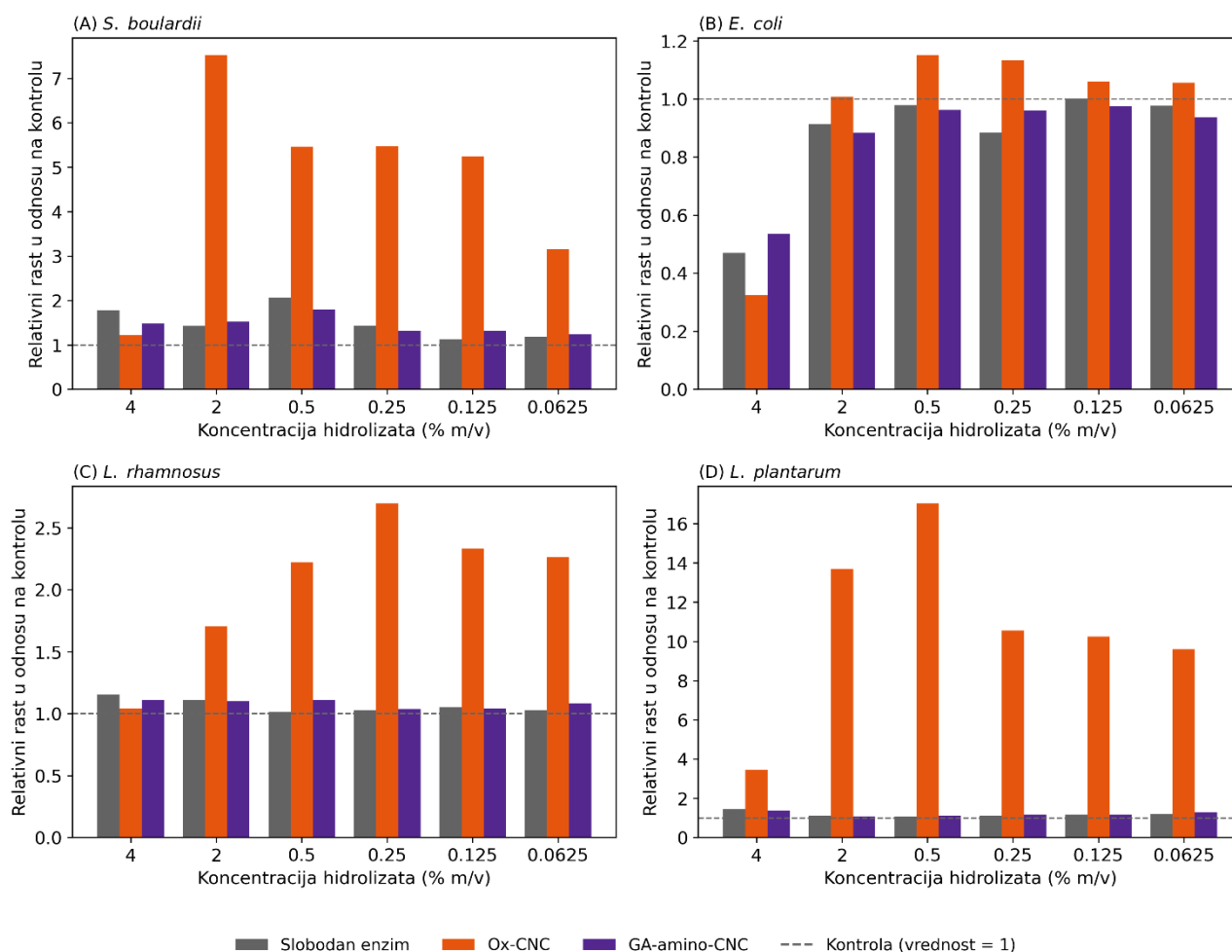
*Slika 4.59. Ciklusi višekratne upotrebe enzima ksilanaze imobilisanog na Ox-CNC (rezidualna aktivnost nakon svakog ciklusa). Eksperimentalni uslovi: ksilanska frakcija suncokretove sačme (1 % (m/v)), 100 mM Na-fosfatni pufer pH 6,0, temperatura 60 °C, enzimska aktivnost 12 IU, ukupna zapremina 10 mL, mešanje 150 rpm; nakon svakog ciklusa nosač je odvojen centrifugiranjem, ispran puferom i ponovo korišćen sa svežim supstratom.*

Rezidualna aktivnost opada sa 100% u nultom ciklusu na oko 95% nakon šestog ciklusa, što predstavlja gubitak od svega 5% ukupne aktivnosti tokom višekratne primene. Ovako visoko zadržavanje aktivnosti ksilanaze posledica je kovalentnog vezivanja enzima za nosač preko Šifovih

baza koje se formiraju između aldehidnih grupa Ox-CNC i amino grupa lizinskih ostataka na površini ksilanaze. Kovalentno vezivanje smanjuje konformacionu pokretljivost enzima u okolini tačke prijanjanja i ograničava lokalne strukturne promene koje mogu voditi ka denaturaciji, što doprinosi očuvanju aktivnosti tokom uzastopnih ciklusa [262, 281]. Pored toga, kovalentno vezivanje za nosač sprečava međumolekulsku agregaciju enzimskih molekula tokom ponovljenih reakcionih ciklusa, koja predstavlja jedan od uzroka gubitka aktivnosti slobodnih enzima prilikom višekratne primene [273]. Odsustvo značajne desorpcije objašnjava zašto nema naglog pada aktivnosti čak ni nakon prvog ciklusa, kada su slabo vezane frakcije enzima obično podložne najintenzivnijem ispiranju sa nosača. Postignuta stabilnost za višekratnu primenu je povoljna u poređenju sa literaturnim podacima za imobilisanu ksilanazu na alternativnim nosačima. Na primer, ksilanaza imobilisana na hitozanske magnetne nanočestice se može upotrebiti u tri ciklusa [331], dok ksilanaza imobilisana na magnetnim kompozitima (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PDA@MOF) zadržava 60% aktivnosti nakon deset ciklusa [327]. Zadržavanje preko 90% aktivnosti enzima imobilisanog na Ox-CNC nakon šest ciklusa stoga predstavlja zapaženu vrednost za imobilizaciju ksilanaze, što se može povezati sa visokim udelom kovalentno vezanog enzima. Ovo je značajan rezultat i u poređenju sa literaturnim podacima gde je imobilisana ksilanaza na hitinskim nosačima zadržala 70–80% aktivnosti nakon sedam ciklusa upotrebe [332].

#### 4.4.1.2 Analiza prebiotske aktivnosti proizvoda hidrolize

Pošto su svi ispitivani preparati ksilanaze dali hidrolizate sa XOS dominantnog stepena polimerizacije 3–6 sa minimalnim sadržajem ksiloze, a razlike u profilu frakcija dobijenih hidrolizom enzimima imobilisanim na Ox-CNC i GA-amino-CNC sugerišu da tip nosača menja sastav hidrolizata, ispitano je da li se ove razlike odražavaju i na prebiotski potencijal dobijenih XOS. Prebiotski potencijal XOS dobijenih hidrolizom ksilanske frakcije suncokretove sačme slobodnom i imobilisanom ksilanazom pod optimalnim uslovima ispitan je praćenjem rasta četiri mikroorganizma: probiotske kulture kvasca *S. boulardii*, indikatorskog soja patogene bakterije *E. coli* i probiotskih bakterijskih kultura, *L. rhamnosus* i *L. plantarum*, u opsegu koncentracija hidrolizata od 0,0625 do 4% (Slika 4.60.). Prebiotska aktivnost predstavlja selektivnu stimulaciju rasta korisnih crevnih mikroorganizama (u ovom slučaju laktobacili, *S. boulardii*) u odnosu na rast indikatorske patogene vrste *E. coli* [196]. Rezultati su za svaki sistem prikazani kao relativna promena rasta u odnosu na sopstvenu kontrolu, a ne kao apsolutne vrednosti, jer se na taj način efekat XOS lakše prati i jednostavnije se porede rezultati između različitih sistema. Sa ovakvim prikazom kontrola ima vrednost 1, pa vrednosti veće od 1 ukazuju na stimulaciju, a vrednosti manje od 1 na inhibiciju rasta.

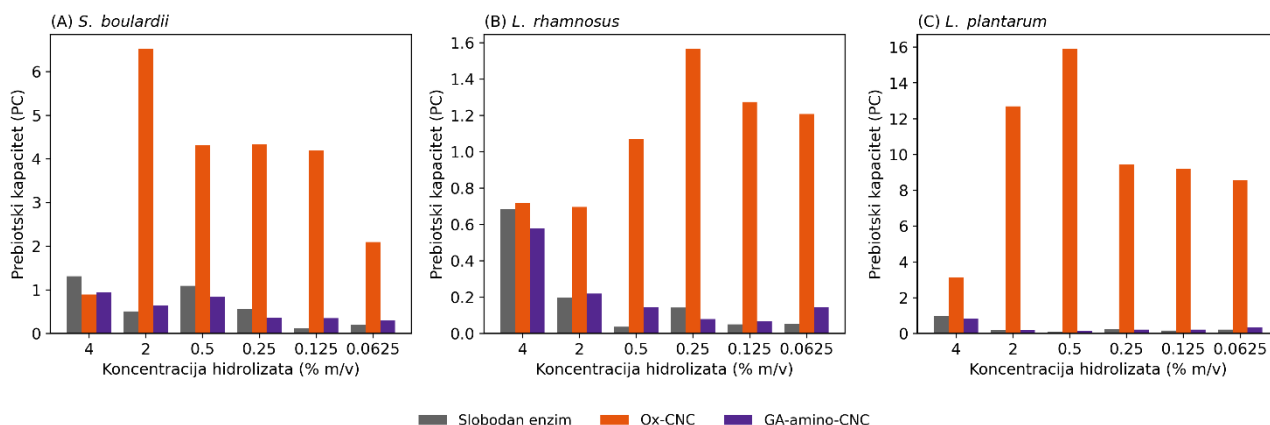


Slika 4.60. Uticaj različitih koncentracija XOS (dobijenih hidrolizom ksilana suncokretove sačme ksilanazom Rohalase® SEP-Visco) na rast testiranih mikroorganizama: (A) *S. boulardii*; (B) *E. coli*; (C) *L. rhamnosus*; (D) *L. plantarum*.

Hidrolizati dobijeni primenom sva tri ispitivana sistema u određenom stepenu stimulišu rast *S. boulardii*, *L. rhamnosus* i *L. plantarum* u odnosu na sopstvenu kontrolu u ispitivanom opsegu koncentracija. Sa druge strane, kod *E. coli* je primećena blaga inhibicija rasta za hidrolizate dobijene dejstvom slobodnog enzima i enzima imobilisanog na GA-amino-CNC, kao i blaga stimulacija u slučaju imobilisane ksilanaze na Ox-CNC. Zabeležena inhibicija u skladu je sa antimikrobnim dejstvom koje se ksiloooligosaharidima pripisuje u literaturi [205]: *E. coli* ne poseduje enzimski sistem za razgradnju XOS, pa ih ne može koristiti kao izvor ugljenika, a oligosaharidi strukturno slični glikanima crevnog epitela mogu i kompetitivno da ometaju adheziju patogenih sojeva. Ovi rezultati ukazuju na to da prebiotski efekat dobijenog hidrolizata bogatog XOS nije strogo selektivan: XOS dobijeni hidrolizom ksilana suncokretove sačme prvenstveno podstiču rast korisnih mikroorganizama, dok je stimulacija rasta *E. coli* izražena samo u sistemu sa ksilanazom imobilisanom na Ox-CNC. Uočeno je i da hidrolizat dobijen primenom ksilanaze imobilisane na Ox-CNC ostvaruje više vrednosti relativne stimulacije korisnih mikroorganizama u odnosu na hidrolizate dobijene slobodnim enzimom i GA-amino-CNC sistemom, što se može povezati sa profilom XOS: hidrolizom pomoću ksilanaze imobilisane na Ox-CNC dobija se veći udeo frakcija višeg stepena polimerizacije (XOS5 i XOS6), dok se hidrolizom slobodnim enzimom i enzimom imobilisanim na GA-amino-CNC dobija veći udeo frakcija nižeg stepena polimerizacije (XOS2–XOS4). Sve navedeno je u skladu sa literaturno prijavljenim prebiotskim potencijalom ksiloooligosaharida [200,

208]. Uočeno je da ksilanaza imobilisana na Ox-CNC stvara proizvode hidrolize ksilana koji ostvaruju više vrednosti relativne stimulacije korisnih mikroorganizama u poređenju sa proizvodima dobijenim hidrolizom slobodnim enzimom i GA-amino-CNC biokatalitičkim sistemom, i to za sve ispitivane mikroorganizme. Ovaj obrazac je primećen kroz ceo opseg ispitivanih koncentracija. Međutim, neobično je da hidrolizat dobijen ksilanazom imobilisanom na Ox-CNC istovremeno blago stimuliše i rast *E. coli*. Iako su kratke XOS frakcije generalno opisane kao preferentni supstrat za većinu probiotičkih mikroorganizama [333], prisustvo monomerne ksiloze u smeši smanjuje selektivnost prema probiotičkim sojevima jer je ksiloza dostupna i nepoželjnim mikroorganizmima poput *E. coli* [334]. Pored toga, duže XOS frakcije se sporije fermentišu, što može obezbediti produženu stimulaciju probiotičkih mikroorganizama. Ovi rezultati ukazuju da imobilizacija ksilanaze na Ox-CNC, pored poboljšanja katalitičke efikasnosti i mogućnosti primene u više ciklusa bez gubitka aktivnosti, pozitivno utiče i na biološku aktivnost nastalih XOS.

Pouzdaniji način procene prebiotske aktivnosti proizvoda jeste određivanje njegovog prebiotskog kapaciteta, odnosno razlike relativnog rasta probiotičke i patogene vrste, koji je prikazan na slici 4.61. Vrednost  $PC > 0$  ukazuje na selektivnu stimulaciju probiotika (prebiotski efekat), vrednost  $PC < 0$  na favorizovanje *E. coli*, dok  $PC = 0$  označava izostanak selektivnog dejstva. Za svaki probiotički soj prebiotski kapacitet određen je pri svim ispitivanim koncentracijama hidrolizata, kako bi se utvrdila koncentracija pri kojoj se ostvaruje optimalan uticaj na ispitivane mikroorganizme.



Slika 4.61. Prebiotski kapacitet (PC) ksiloooligosaharida (XOS) dobijenih hidrolizom ksilana suncokretove sačme slobodnom i imobilisanom ksilanazom (Ox-CNC i GA-amino-CNC), određen pri svim ispitivanim koncentracijama hidrolizata za (A) *S. boulardii*, (B) *L. rhamnosus* i (C) *L. plantarum*. Isprekidana linija označava vrednost  $PC = 0$ .

Prebiotski kapacitet (PC) ksiloooligosaharida dobijenih dejstvom slobodne i imobilisane ksilanaze (Ox-CNC i GA-amino-CNC) određen je za tri probiotička soja pri svim ispitivanim koncentracijama hidrolizata. Za sva tri soja i sva tri hidrolizata dobijene su pozitivne vrednosti PC, što ukazuje na prebiotski potencijal dobijenih XOS. Za hidrolizate dobijene slobodnom ksilanazom i ksilanazom imobilisanom na GA-amino-CNC najviši PC postignut je pri koncentraciji hidrolizata od 4%, dok je za hidrolizat dobijen ksilanazom imobilisanom na Ox-CNC optimalna koncentracija niža i zavisna od soja: 2% za *S. boulardii*, 0,25% za *L. rhamnosus* i 0,5% za *L. plantarum*. Za hidrolizat dobijen ksilanazom imobilisanom na Ox-CNC zabeležene su najviše vrednosti PC za sva tri probiotička soja. Budući da je prebiotski kapacitet izračunat na osnovu relativnog rasta normalizovanog u odnosu na sopstvenu kontrolu svakog hidrolizata, dobijene vrednosti su međusobno uporedive, pri čemu se za svaki hidrolizat uočava i koncentracija pri kojoj je uticaj na ispitivane mikroorganizme optimalan. Ukoliko se traži jedna koncentracija pri kojoj su vrednosti PC istovremeno povoljne za sva tri probiotička soja, to je za hidrolizat dobijen ksilanazom imobilisanom na Ox-CNC koncentracija od

0,25%, pri kojoj najniža zabeležena vrednost PC iznosi 1,57, a za hidrolizate dobijene slobodnim enzimom i enzimom imobilisanim na GA-amino-CNC koncentracija od 4%.

#### 4.4.2 Primena imobilisanog preparata Pectinex® Ultra SP L u hidrolizi pektina

Za primenu u hidrolizi pektinskih frakcija odabrani su imobilisani preparati Pectinex® Ultra SP-L na Ox-CNC i GA-amino-CNC nosačima, budući da kovalentna imobilizacija na hemijski modifikovanim nosačima u odnosu na adsorpciju na nemodifikovanim CNC obezbeđuje veći udeo ireverzibilno kovalentno vezanog enzima. Primena je ispitana na tri pektinska supstrata različitog porekla i strukture, dva različito dobijena pektina sačme uljane repice i pektin crne ribizle, koji se razlikuju prema stepenu esterifikacije, sadržaju neutralnih šećera i linearnosti galakturonanske osnove. Eksperiment je izveden tako da se sva tri supstrata hidrolizuju korišćenjem jednakih početnih pektinolitičkih aktivnosti od 0,5 IU, što omogućava direktno poređenje efikasnosti hidrolize u zavisnosti od strukturnih karakteristika supstrata. Praćeni su prinos redukujućih šećera tokom hidrolize, rezidualna aktivnost imobilisanog preparata u višekratnoj primeni i prebiotska aktivnost dobijenih hidrolizata.

##### 4.4.2.1 Primena imobilisanog Pectinex® Ultra SP-L u hidrolizi pektina sačme uljane repice

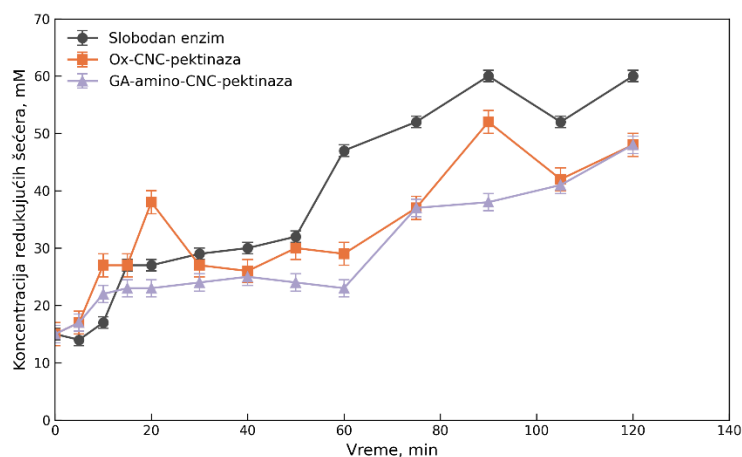
Pektin sačme uljane repice sadrži razgranatu strukturu sa homogalakturonanskom osnovom i izraženim udelom razgranatih neutralnih šećernih bočnih lanaca tipa razgranatih arabinana i arabinogalaktana tipa II [335]. Strukturno se razlikuje od komercijalnih pektina iz citrusa i jabuka, u kojima se industrijskom ekstrakcijom u kiselim uslovima dodatno povećava udeo linearnih homogalakturonanskih domena zbog hidrolize bočnih lanaca u toku ekstrakcije [336-338].

Hidroliza je sprovedena na temperaturi 50 °C u 0,1 M Na-acetatnom puferu pH 4,5, uz dodatak enzima (slobodnog ili imobilisanog) sa ekvivalentnim početnim hidrolitičkim aktivnostima od 0,5 IU, prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.6.2.

##### 4.4.2.1.1 Analiza efikasnosti u hidrolizi pektina iz sačme uljane repice

Pektinska frakcija izolovana iz sačme uljane repice kiselinskom hidrolizom limunskom kiselinom odlikuje se slobodnim, neumreženim regijama homogalakturonana sastavljenim od  $\alpha$ -1,4-povezanih ostataka D-galakturonske kiseline [335]. Iako pektin uljane repice sadrži značajan udeo razgranatih neutralnih bočnih lanaca tipa arabinana i arabinogalaktana tipa II, neesterifikovane regije homogalakturonanske osnove u LK-frakciji ostaju geometrijski dostupne endopoligalakturonaznoj aktivnosti, jer enzim katalizuje hidrolizu  $\alpha$ -1,4 glikozidne veze između susednih ostataka galakturonske kiseline [339, 340]. U Ca-pektinu, sa druge strane, iste neesterifikovane oblasti homogalakturonana učestvuju u „egg-box“ umrežavanju sa  $\text{Ca}^{2+}$  jonima i formiraju gel koji ograničava difuziju enzima do glavnog lanca [341]. Ova kompaktna i rigidna trodimenziona mreža koja sterno otežava pristup endopoligalakturonaze unutrašnjim galakturonanskim lancima, jer su oni stabilizovani unutar kalcijumom-koordinisane strukture [342]. Iz tog razloga proizilazi pretpostavka da je LK-pektin strukturno pristupačniji supstrat za endopoligalakturonazno delovanje.

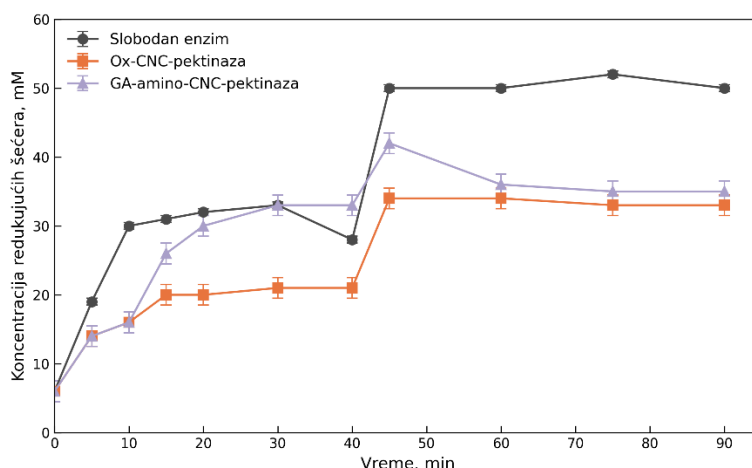
Prvo je praćen profil oslobađanja redukujućih šećera tokom hidrolize LK-pektina, sa slobodnim enzimom i imobilisanim preparatima na Ox-CNC i GA-amino-CNC nosačima sa jednakim aktivnostima, a rezultati su prikazani na slici 4.62.



*Slika 4.62. Tok hidrolize LK-pektina iz uljane repice pomoću Pectinex® Ultra SP-L: slobodnog enzima i imobilisanog na Ox-CNC i GA-amino-CNC. Eksperimentalni uslovi: koncentracija pektina 0,5% (m/v), 0,1 M Na-acetatni pufer pH 4,5, temperatura 50 °C, enzimska aktivnost 0,5 IU, ukupna zapremina 2 mL, mešanje 150 rpm, inaktivacija 100 °C/5 min, analiza redukujućih šećera DNS metodom.*

Sve tri forme enzima pokazuju karakterističan kinetički profil hidrolize pektina. Dobijeni profil može se podeliti u tri faze: brz inicijalni porast tokom prvih 10–20 min, blagi pad, odnosno zastoj u intervalu 30–60 min i drugi porast nakon 60 min koji vodi ka finalnom platou u vremenskom opsegu 90–120 min. Ox-CNC-pektinaza kao i slobodan enzim efikasno katalizuju hidrolizu pektina u početnim vremenima, dostižući vrednosti oko 30 mM ekvivalenata glukoze, dok GA-amino-CNC-pektinaza pokazuje nešto sporiji početak reakcije, dostižući oko 23 mM ekvivalenata glukoze nakon 20 min. Zatim, u periodu od 30–60 min koncentracije redukujućih šećera u hidrolizatima dobijenim u sva tri sistema (slobodni enzim, Ox-CNC-pektinaza i GA-amino-CNC-pektinaza) se ujednačavaju (23–32 mM). Ova faza odražava prelazni stadijum hidrolize u kojem endopoligalakturonaza postepeno razlaže strukturu LK-pektina, čime se unutrašnji galakturonanski lanci čine pristupačnijim za dalju enzimsku razgradnju. Nakon 60 min dolazi do ponovnog intenziviranja hidrolize, što se manifestuje drugim porastom koncentracije redukujućih šećera. Slobodan enzim najbrže reaguje na promene u strukturi supstrata, dostižući 60 mM nakon 90 min i održavajući tu vrednost do kraja eksperimenta. Imobilisani enzimi prate sličan trend sa određenim vremenskim pomakom. Ox-CNC-pektinaza dostiže maksimalnu koncentraciju redukujućih šećera od 52 mM nakon 90 min, uz blage oscilacije i konačnu vrednost od 49 mM, dok GA-amino-CNC-pektinaza postepeno dostiže blisku finalnu koncentraciju (47 mM) nakon 120 min. Slične finalne koncentracije redukujućih šećera u hidrolizatima oba imobilisana sistema ukazuju da priroda nosača ne utiče značajno na ukupni stepen hidrolize pektina, već pre svega na kinetiku procesa.

Radi ispitivanja uticaja strukturne složenosti supstrata na efikasnost hidrolize, u nastavku je primenjen Ca-pektin izolovan iz iste sirovine. Tok hidrolize Ca-pektina prikazan je na slici 4.63.



Slika 4.63. Tok hidrolize Ca-pektina iz uljane repice pomoću Pectinex® Ultra SP-L: slobodnog enzima i imobilisanog na Ox-CNC i GA-amino-CNC. Eksperimentalni uslovi: koncentracija pektina 0,5% (m/v), 0,1 M Na-acetatni pufer pH 4,5, temperatura 50 °C, enzimska aktivnost 0,5 IU, ukupna zapremina 2 mL, mešanje 150 rpm, inaktivacija 100 °C/5 min, analiza redukujućih šećera DNS metodom.

I u ovom slučaju, sve tri forme enzima pokazuju izrazito karakterističan dvostepeni profil oslobađanja redukujućih šećera koji se može razdeliti na tri faze: inicijalni porast tokom prvih 10–20 min, stagnaciju u intervalu 20–40 min i nagli skok koncentracije redukujućih šećera između 40 i 45 min koji vodi ka finalnom platou u vremenskom intervalu od 45–90 min. U inicijalnoj fazi (0–10 min) slobodan enzim pokazuje najbržu reakciju hidrolize koja se ogleda u rastu koncentracije redukujućih šećera, dostižući oko 30 mM nakon 10 min. GA-amino-CNC sistem prati ovaj tok sa nešto sporijim porastom (oko 13 mM nakon 5 min, 20 mM nakon 10 min), dok pektinaza imobilisana na Ox-CNC pokazuje najsporiji početak hidrolize i dostiže koncentraciju redukujućih šećera od svega 20 mM nakon 15 min. Već u inicijalnoj fazi uočljiva je razlika u redosledu efikasnosti hidrolize u odnosu na LK-pektin, gde su imobilisani preparati pokazivali podjednaku početnu brzinu kao slobodan enzim. Kompaktna struktura Ca-pektina očito otežava pristup pektinaze imobilisane na čvrste nosače, pri čemu je efekat izraženiji za Ox-CNC sa kratkim, direktnim vezama između nosača i enzima nego za GA-amino-CNC gde je enzim odaljen od nosača preko glutaraldehidnog mosta. U fazi od 15.–40. min hidrolizati dobijeni slobodnim preparatom i preparatom imobilisanim na GA-amino-CNC zadržavaju približno konstantne vrednosti koncentracije redukujućih šećera od oko 30–33 mM, dok hidrolizat dobijen Ox-CNC sistemom zadržava nižu vrednost koncentracije redukujućih šećera od oko 20 mM. Ovaj produženi plato, izraženiji nego kod LK-pektina, ukazuje da endopoligalakturonaza inicijalno razgrađuje pretežno površinske i dostupnije galakturonanske lance, dok unutrašnji lanci ostaju zaštićeni i nedostupni za enzimsku hidrolizu. Najupečatljivija karakteristika kinetičkog profila je nagli skok koncentracije redukujućih šećera između 40 i 45 min, koji se simultano javlja na sve tri krive: vrednosti koncentracija redukujućih šećera postignute korišćenjem slobodnog enzima skaču sa 28 na 50 mM, korišćenjem GA-amino-CNC-imobilizata sa 33 na 42 mM, a upotrebom Ox-CNC-imobilizata sa 21 na 34 mM. Ovakav diskontinuitet u kinetici hidrolize može se objasniti specifičnošću „egg-box“ strukture Ca-pektina: postepena hidroliza površinskih lanaca tokom prvih 40 min destabilizuje koordinacione veze između susednih galakturonanskih lanaca i postepeno oslobađa kalcijumove jone iz strukture, što u određenom trenutku dovodi do kolapsa rigidne mreže i naglog otkrivanja velikog broja prethodno nedostupnih  $\alpha$ -1,4 glikozidnih veza za enzimsku hidrolizu [342]. Nakon ovog skoka uspostavlja se finalni plato sa praktično konstantnim vrednostima koncentracija od 50 mM za hidrolizat dobijen slobodnim enzimom, 34 mM za hidrolizat dobijen enzimom imobilisanim na Ox-CNC i 33 mM za hidrolizat dobijen enzimom imobilisanim na GA-amino-CNC. Finalne vrednosti redukujućih šećera dobijenih hidrolizom sa oba imobilisana preparata su praktično identične, što ukazuje da i u ovom slučaju različita struktura hemijske veze između

nosača i enzima ne utiče bitno na ukupan stepen hidrolize Ca-pektina, već samo na dinamiku procesa, dok difuziona ograničenja heterogenih biokatalitičkih sistema u poređenju sa slobodnim enzimom postaju izraženija kod ovog strukturno složenijeg supstrata.

Vrednosti početne brzine hidrolize i finalne koncentracije redukujućih šećera za oba pektinska supstrata iz sačme uljane repice prikazane su u tabeli 4.6.

*Tabela 4.6. Početna brzina hidrolize i finalna koncentracija redukujućih šećera prilikom hidrolize LK-pektina i Ca-pektina izolovanih iz sačme uljane repice slobodnim preparatom Pectinex® Ultra SP-L i imobilisanim preparatima na Ox-CNC i GA-amino-CNC. Uslovi hidrolize: 0,5% (m/v) pektin u 0,1 M Na-acetatnom puferu pH 4,5, 50 °C, aktivnost enzima 0,5 IU. Početna brzina hidrolize određena je kao nagib linearnog dela krive u intervalu 0–10 min, u odnosu na koncentraciju redukujućih šećera izmerenu u nultom trenutku, koja potiče od redukujućih grupa prisutnih u samom pektinskom preparatu.*

| Supstrat                   | Slobodan enzim                    |                                               | Ox-CNC-pektinaza                  |                                               | GA-amino-CNC-pektinaza            |                                               |
|----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------|
|                            | Početna brzina hidrolize (mM/min) | Finalna koncentracija redukujućih šećera (mM) | Početna brzina hidrolize (mM/min) | Finalna koncentracija redukujućih šećera (mM) | Početna brzina hidrolize (mM/min) | Finalna koncentracija redukujućih šećera (mM) |
| LK-pektin iz uljane repice | 1,42                              | 60                                            | 1,34                              | 49                                            | 0,85                              | 47                                            |
| Ca-pektin iz uljane repice | 2,44                              | 50                                            | 1,00                              | 33                                            | 1,35                              | 35                                            |

Prilikom hidrolize LK-pektina iz sačme uljane repice, Ox-CNC-pektinaza ostvaruje početnu brzinu praktično jednaku brzini slobodnog enzima (1,34 naspram 1,42 mM/min), dok je kod GA-amino-CNC-pektinaze ona znatno niža (0,85 mM/min). Očuvanje početne brzine na nivou slobodnog enzima kod preparata imobilisanog na Ox-CNC može se objasniti povoljnom orijentacijom endopoligalakturonaze fiksirane neposredno uz površinu nosača, u konformaciji u kojoj aktivni centar ostaje dostupan linearnim galakturonanskim lancima LK-pektina, što je u skladu sa opisanim efektom da kovalentna imobilizacija na aldehidnim nosačima može stabilizovati katalitički povoljnu konformaciju enzima [273, 282]. Uprkos očuvanoj početnoj brzini reakcije korišćenjem Ox-CNC-pektinaze, finalna koncentracija redukujućih šećera ostaje praktično jednaka za oba hidrolizata dobijena imobilisanim preparatima (49 mM za Ox-CNC i 47 mM za GA-amino-CNC) i nešto niža od onog dobijenog slobodnim enzimom (60 mM), što ukazuje da difuziona ograničenja usporavaju hidrolizu u kasnijoj fazi reakcije, dok fizički razmak između enzima i nosača ne utiče na ukupnu efikasnost hidrolize ovog supstrata [274, 308].

S druge strane, prilikom hidrolize Ca-pektina slobodan enzim ostvaruje znatno višu početnu brzinu (2,44 mM/min) od oba imobilisana preparata, pri čemu GA-amino-CNC-pektinaza (1,35 mM/min) ima veću brzinu u odnosu na Ox-CNC-pektinazu (1,00 mM/min). Finalne koncentracije redukujućih šećera prate isti trend: slobodan enzim dostiže 50 mM, dok oba imobilisana preparata postižu slične vrednosti od 33–35 mM, bez izražene razlike između nosača. Kompaktna i rigidna „egg-box“ struktura Ca-pektina sterno otežava pristup endopoligalakturonazi vezanoj neposredno uz površinu nosača na Ox-CNC, gde kratke kovalentne veze fiksiraju enzim blizu nosača [308, 343]. Prostorna distanca koju glutaraldehidni most uvodi na GA-amino-CNC nosaču ublažava ovaj efekat i

omogućava bolji pristup enzima unutrašnjim galakturonanskim lancima, što rezultuje višom početnom brzinom hidrolize u poređenju sa hidrolizom enzima imobilisanog na Ox-CNC [308]. Ipak, veća udaljenost enzima u odnosu na nosač GA-amino-CNC nije dovoljna da nadoknadi mobilnost slobodnog enzima u rastvoru, što je u skladu sa opisanim ograničenjima kovalentnih sistema tokom hidrolize strukturno kompleksnih supstrata [219].

Ovi rezultati ukazuju da efikasnost imobilisanih pektinaza značajno zavisi od strukturnih karakteristika ciljnog supstrata, pri čemu se izbor optimalnog nosača može prilagoditi dominantnom tipu pektina u sirovini. Ox-CNC nosač obezbeđuje povoljniju orijentaciju imobilisanog enzima za hidrolizu linearnog LK-pektina, dok GA-amino-CNC posredstvom prostorne distance glutaraldehidnog mosta obezbeđuje optimalniju strukturu biokatalitičkog sistema potrebnu za efikasnu hidrolizu strukturno kompleksnijeg Ca-pektina.

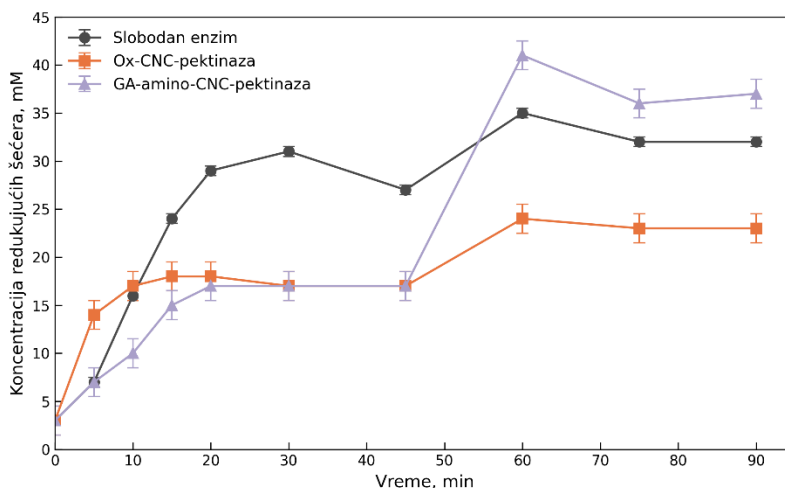
#### 4.4.2.2 Primena imobilisanog Pectinex® Ultra SP-L u hidrolizi pektina crne ribizle

Pektin izolovan iz pogače crne ribizle strukturno se razlikuje od pektina sačme uljane repice po visokom sadržaju bočnih lanaca ramnogalakturonana I (RGI) bogatih arabinozom i galaktozom, koji okružuju homogalakturonanski lanac [14, 336, 344]. Step en metilesterifikacije (DM) pektina crne ribizle, od oko 50% [14], klasifikuje ovaj pektin na granicu između nisko- i visokoesterifikovanog pektina. Ovakav udeo esterifikovanih galakturonanskih ostataka može uticati na endopoligalakturonaznu aktivnost, kao i strukturna složenost bočnih lanaca koja uvodi difuzione i sterne smetnje. Ispitivanje ovog supstrata stoga pruža uvid u primenjivost razvijenih imobilisanih nanobiokatalizatora na strukturno složeniji pektinski materijal i omogućava direktno poređenje sa rezultatima dobijenim za pektine uljane repice.

Za hidrolizu pektina crne ribizle korišćeni su isti imobilisani preparati pektinaze na Ox-CNC i GA-amino-CNC kao i u prethodnim eksperimentima, sa jednakom početnom pektinoličkom aktivnosti od 0,5 IU, uz slobodan enzim kao kontrolu, prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.6.2.

##### 4.4.2.2.1 Analiza aktivnosti u hidrolizi pektina crne ribizle

Tok hidrolize za sva tri ispitivana enzimska sistema prikazan je na slici 4.64.



*Slika 4.64. Tok hidrolize pektina iz pogače crne ribizle pomoću Pectinex® Ultra SP-L: slobodnog enzima i imobilisanog na Ox-CNC i GA-amino-CNC. Eksperimentalni uslovi: koncentracija pektina 0,5% (m/v), 0,1 M Na-acetatni pufer pH 4,5, temperatura 50 °C, enzimska aktivnost 0,5 IU, mešanje 150 rpm; ukupna zapremina 2 mL, inaktivacija 100 °C/5 min, analiza redukujućih šećera DNS metodom.*

Hidrolizat dobijen primenom slobodnog enzima pokazuje brz porast koncentracije redukujućih šećera u prvih 30 min, dostižući 31 mM, nakon čega blago osciluje oko te vrednosti i na kraju hidrolize

dostiže 32 mM. Hidroliza pomoću Ox-CNC sistema postiže niže vrednosti tokom čitavog trajanja reakcije, sa postepenim rastom koncentracije redukujućih šećera do ulaska u plato pri vrednostima od 17–18 mM u intervalu 15–45 min, nakon čega sledi skok na 24 mM nakon 60 min i blagi pad do finalne vrednosti od 23 mM na kraju hidrolize. Niža ukupna aktivnost na ovom supstratu potvrđuje da strukturna složenost pektina crne ribizle posebno nepovoljno utiče na enzim vezan direktnim Šifovim bazama uz samu površinu nosača, gde neutralni šećerni bočni lanci pektina sterno otežavaju pristup endopoligalakturonaze galakturonanskom lancu. Hidrolizat dobijen korišćenjem GA-amino-CNC-pektinaze pokazuje najupečatljiviji kinetički profil. Koncentracija redukujućih šećera raste sporo u prvih 45 min, dostižući 17 mM, a zatim naglo skače na maksimum od 41 mM nakon 60 min, što je najviša vrednost od sva tri ispitivana sistema. Ovaj nagli porast između 45 i 60 min sugerise da je progresijom hidrolize omogućen bolji pristup enzima preostalom, galakturonanskim segmentima smeštenim dublje u strukturi supstrata gde postepeno otvaranje strukture supstrata omogućava ubranu hidrolizu u drugoj fazi reakcije. Nakon 60 min koncentracija redukujućih šećera blago opada i stabilizuje se na 37 mM nakon 90 min, što je i dalje više od slobodnog enzima i znatno više od vrednosti postignutih hidrolizom sa Ox-CNC-pektinazom.

Vrednosti početne brzine hidrolize i finalne koncentracije redukujućih šećera za pektin crne ribizle prikazane su u tabeli 4.7.

*Tabela 4.7. Početna brzina hidrolize i finalna koncentracija redukujućih šećera prilikom hidrolize pektina iz pogače crne ribizle slobodnim preparatom Pectinex® Ultra SP-L i imobilisanim preparatima na Ox-CNC i GA-amino-CNC. Uslovi hidrolize: 0,5% (m/v) pektin u 0,1 M Na-acetatnom puferu pH 4,5, 50 °C, aktivnost enzima 0,5 IU. Početna brzina hidrolize određena je kao nagib linearnog dela krive u intervalu 0–10 min, u odnosu na koncentraciju redukujućih šećera izmerenu u nultom trenutku, koja potiče od redukujućih grupa prisutnih u samom pektinskom preparatu.*

| Supstrat               | Slobodan enzim                    |                                               | Ox-CNC-pektinaza                  |                                               | GA-amino-CNC-pektinaza            |                                               |
|------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------|
|                        | Početna brzina hidrolize (mM/min) | Finalna koncentracija redukujućih šećera (mM) | Početna brzina hidrolize (mM/min) | Finalna koncentracija redukujućih šećera (mM) | Početna brzina hidrolize (mM/min) | Finalna koncentracija redukujućih šećera (mM) |
| Pektin iz crne ribizle | 1,11                              | 32                                            | 0,90                              | 23                                            | 0,57                              | 37                                            |

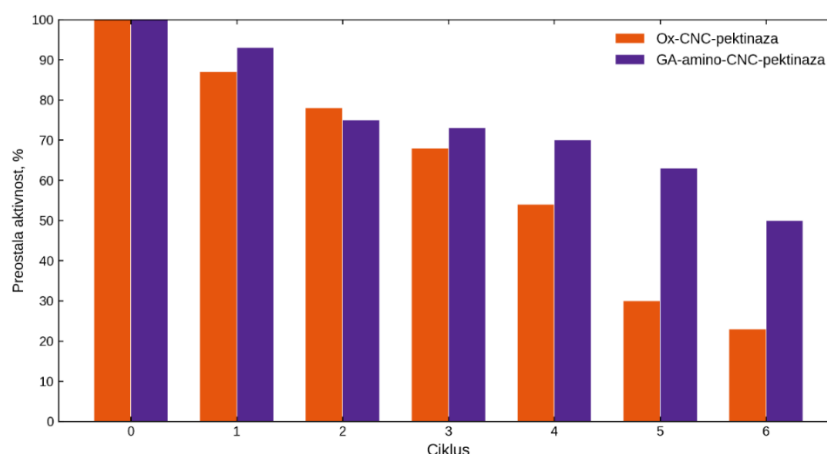
Ox-CNC-pektinaza ostvaruje nižu početnu brzinu od slobodnog enzima (0,90 naspram 1,11 mM/min) i dobijeni hidrolizati imaju najnižu finalnu koncentraciju redukujućih šećera (23 mM), što potvrđuje da prostorna ograničenja enzima vezanog neposredno uz površinu nosača preko kratkih Šifovih baza dolaze do punog izražaja u primeni na strukturno složenom supstratu. Slobodan enzim ostvaruje početnu brzinu od 1,11 mM/min i formiranje hidrolizata sa finalnom koncentracijom od 32 mM, dok GA-amino-CNC-pektinaza, uprkos najnižoj početnoj brzini od sva tri sistema (0,57 mM/min), omogućava dobijanje hidrolizata sa najvišom finalnom koncentracijom redukujućih šećera od 37 mM. Ovakav odnos između početne brzine i finalnog prinosa ukazuje da GA-amino-CNC sistem sporije vrši hidrolizu, ali efikasnije iskorišćava sekundarni supstrat dobijen nakon dužeg vremena reakcije, što je direktna posledica prostorne udaljenosti enzima od površine nosača koju uvodi glutaraldehidni most. Direktno poređenje prinosa hidrolize pektina crne ribizle imobilisanom pektinazom sa literaturnim vrednostima nije moguće, budući da je većina objavljenih radova o imobilisanoj pektinazi ispitivana na modelnim supstratima poput pektina iz citrusa ili jabuka, dok su radovi koji se bave enzimskom obradom pektina bobičastog voća usmereni pre svega na procese ekstrakcije soka i ekstrakciju polifenola [345-347], modifikaciju dijetetskih vlakana iz pogače crne ribizle [348] ili izolaciju pektinskih frakcija za primenu u kozmetici [14], a ne na isključivo dobijanje oligosaharida.

Ovo ukazuje da opisani rezultati predstavljaju jedan od prvih sistematskih pokušaja primene imobilisanih pektinolitičkih enzima u hidrolizi pektina crne ribizle u cilju dobijanja oligosaharida, što im daje poseban naučni značaj uprkos ograničenjima koja proističu iz strukturne složenosti ovog supstrata. Zanimljivo je da preparat Pectinex® Ultra SP-L imobilisan na GA-amino-CNC nosač tokom hidrolize ovog supstrata dostiže višu finalnu koncentraciju redukujućih šećera od slobodnog enzima i enzima imobilisanog na Ox-CNC, što potvrđuje da prostorna udaljenost enzima od površine nosača koju obezbeđuje glutaraldehidni most postaje ključan faktor efikasnosti upravo u reakciji hidrolize supstrata sa bočnim lancima koji sterno ometaju pristup aktivnom centru.

#### 4.4.2.3 Analiza stabilnosti imobilisanog preparata Pectinex® Ultra SP-L

LK-pektin sačme uljane repice odabran je kao model supstrat za ispitivanje višekratne primene imobilisanih preparata, jer pri njegovoj hidrolizi oba imobilisana sistema postižu praktično jednake finalne koncentracije redukujućih šećera (49 i 47 mM), što omogućava direktno poređenje stabilnosti dva nosača bez uticaja različite efikasnosti hidrolize na rezultate ispitivanja višekratne primene.

Stabilnost Ox-CNC-pektinaze i GA-amino-CNC-pektinaze tokom šest uzastopnih ciklusa hidrolize pektina iz sačme uljane repice prikazana je na slici 4.65.



Slika 4.65. Ciklusi višekratne upotrebe Pectinex® Ultra SP-L imobilisanog na Ox-CNC i GA-amino-CNC (rezidualna aktivnost nakon svakog ciklusa). Eksperimentalni uslovi: pektin 0,5% (m/v) u 0,1 M Na-acetatnom puferu pH 4,5, temperatura 50 °C, enzimska aktivnost 0,5 IU, ukupna zapremina 2 mL, konstantno mešanje; nakon svakog ciklusa nosač je odvojen centrifugiranjem, ispran puferom i ponovo korišćen sa svežim supstratom.

Tokom šest uzastopnih ciklusa hidrolize LK-pektina uljane repice, imobilisani preparat Pectinex® Ultra SP-L na GA-amino-CNC pokazao je znatno bolju operativnu stabilnost od preparata imobilisanog na Ox-CNC. Preostala aktivnost opada postepeno sa 92% nakon prvog na 50% nakon šestog ciklusa, dok Ox-CNC sistem beleži znatno intenzivniji pad, sa rezidualnom aktivnošću od svega 23% nakon šestog ciklusa. Razlika u višekratnoj upotrebi dva imobilisana preparata zaslužuje pažljiviju analizu, jer je na Ox-CNC udeo kovalentno vezanog enzima nakon desorpcionog tretmana zapravo nešto viši (83% naspram 79% za GA-amino-CNC, Tabela 4.3), što bi sugerisalo bolju stabilnost ovog sistema prilikom višekratne upotrebe. Ipak, dobijeni rezultati pokazuju upravo suprotno, što ukazuje da stabilnost imobilizacije višekomponentnog enzimskog preparata ne zavisi isključivo od udela kovalentno vezane ukupne enzimske aktivnosti, već i od sastava enzima vezanih na nosač. Enzimski preparat sadrži širok spektar pektinolitičkih komponenti. Pored endopoligalakturonaze, čija je aktivnost neposredno merena u ovim eksperimentima, prisutne su i pektinmetilesteraza, pektin liaza, kao i sporedne hidrolitičke aktivnosti, koje zajedno doprinose hidrolizi pektina, naročito demetilacijom karboksilnih grupa i razgradnjom bočnih lanaca koji okružuju galakturonanski lanac [302]. Na nosaču Ox-CNC, kratke direktne Šifove baze ograničavaju

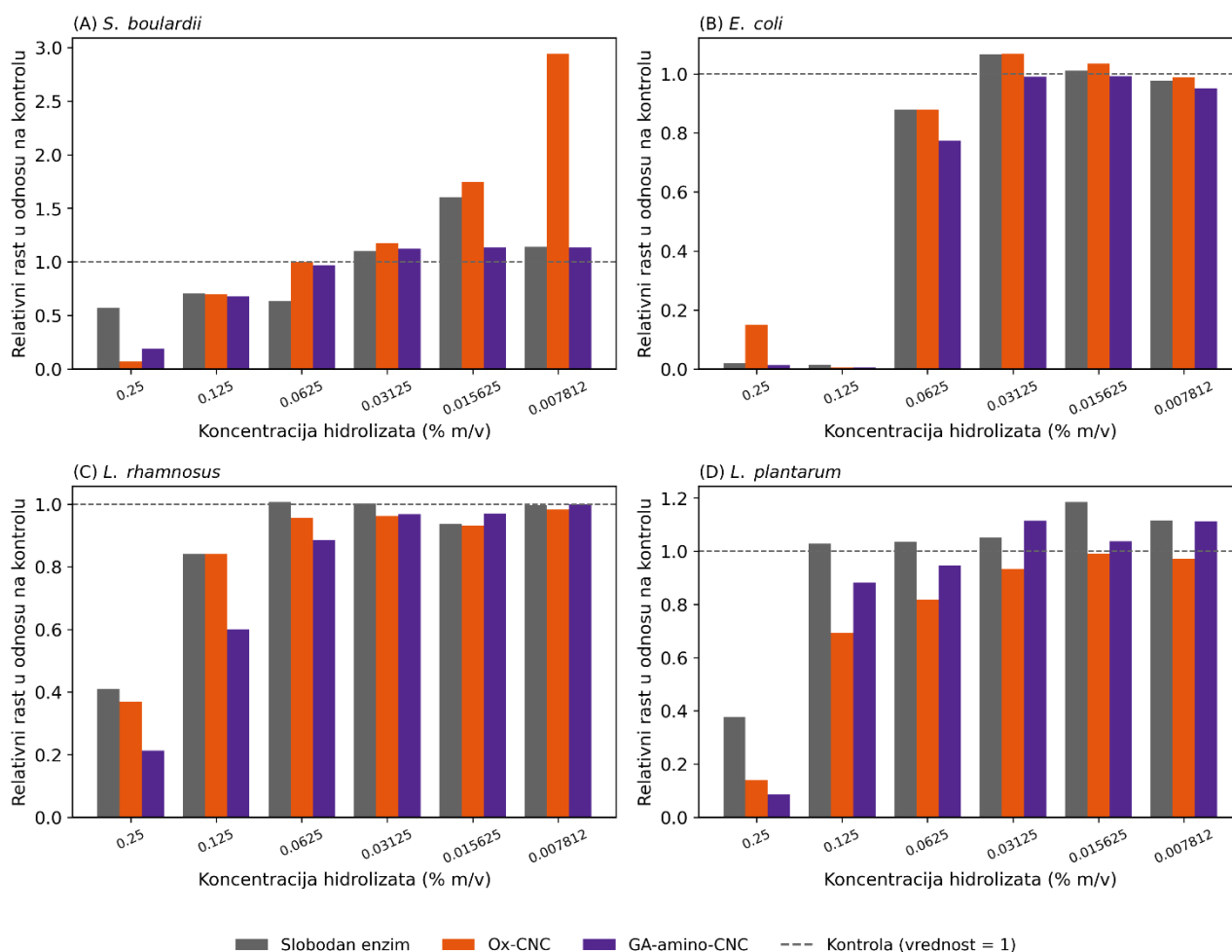
vezivanje enzima, pa se selektivno kovalentno vezuju pre svega one komponente preparata čiji su lizinski ostaci u povoljnoj orijentaciji u odnosu na površinu nosača, dok ostale komponente mogu ostati adsorbovane ali ne i kovalentno vezane. Kod GA-amino-CNC imobilizacija se odvija kao dvostepeni proces: u prvom koraku dolazi do relativno brze adsorpcije enzimskih molekula na površinu nosača, posredovane elektrostatičkim interakcijama i vodoničnim vezama, a u drugom, sporijem koraku formiraju se kovalentne Šifove baze između deprotonovanih amino grupa lizinskih ostataka enzima i aldehidnih grupa glutaraldehidnog mosta. Prostorna distanca koju uvodi glutaraldehidni most pritom ne olakšava samo kovalentno vezivanje već istovremeno povećava geometrijsku dostupnost aldehidnih grupa i olakšava inicijalnu adsorpciju šireg spektra proteinskih komponenti preparata, uključujući i prateće enzimske aktivnosti, od kojih deo potom prelazi u kovalentno vezano stanje tokom drugog koraka procesa imobilizacije. Na ovaj način, GA-amino-CNC sistem u višekratnoj upotrebi zadržava funkcionalno bogatije i stabilnije pektinolitičke enzime od Ox-CNC sistema.

Pored toga, potrebno je uzeti u obzir i mogućnost adsorpcije samog supstrata ili proizvoda hidrolize na površinu nanoceluloznih nosača tokom reakcionih ciklusa. LK-pektin, kao negativno naelektrisan polisaharid bogat slobodnim karboksilnim grupama galakturonskih jedinica, može se adsorbovati na površinu Ox-CNC i GA-amino-CNC putem elektrostatičkih interakcija i vodoničnih veza, kompetitivno zauzimajući mesta na površini nosača i ometajući pristup supstrata aktivnim centrima imobilisanih enzimskih molekula. Ovaj efekat se može pogoršavati sa svakim uzastopnim ciklusom ukoliko ispiranje između ciklusa nije dovoljno da u potpunosti ukloni adsorbovane pektinske lance sa površine nosača. Može se pretpostaviti da je ovaj efekat izraženiji na Ox-CNC sistemu, gde je enzim fiksiran neposredno uz površinu nosača, pa adsorbovani lanci pektina lakše blokiraju pristup aktivnom centru, dok glutaraldehidni most na GA-amino-CNC pravi razmak između enzima i površine nosača delimično ublažava ovaj kompetitivni efekat.

U poređenju sa literaturom, postignuti rezultati za GA-amino-CNC-pektinazu (50% preostale aktivnosti nakon šest ciklusa) nalaze se u srednjem opsegu vrednosti opisanih za kovalentno imobilisane enzime sa pektinolitičkom aktivnošću. Imobilizacija pektinaze iz *Aspergillus niger* na hitozanskim magnetnim nanočesticama, sa dekstran-polialdehidom kao makromolekularnim umreživačem, omogućila je zadržavanje 85% preostale aktivnosti nakon sedam uzastopnih ciklusa [349], dok je imobilizacija na magnetnim nanočesticama dobijenim koprecipitacijom dovela do gubitka aktivnosti od svega 21% nakon devet ciklusa [350]. Treba imati u vidu da su pomenuti sistemi zasnovani na magnetnim nanočesticama koje omogućavaju separaciju magnetnim poljem bez centrifugiranja, čime se minimizuje mehanički stres i unapređuje razdvajanje nosača od reakcione smeše, a da su u eksperimentima koristili čist komercijalni pektin iz jabuke. Sa druge strane, pektinaza iz *Aspergillus terreus* imobilisana na agarozu zadržala efektivnu aktivnost samo kroz pet uzastopnih ciklusa hidrolize, sa manje od 50% preostale aktivnosti već nakon trećeg ciklusa, prilikom hidrolize pektina iz kore citrusa [351]. Ovi rezultati pozicioniraju GA-amino-CNC-pektinazu sa 50% preostale aktivnosti nakon šest ciklusa kao konkurentan sistem.

#### 4.4.2.4 Analiza prebiotske aktivnosti proizvoda hidrolize pektina

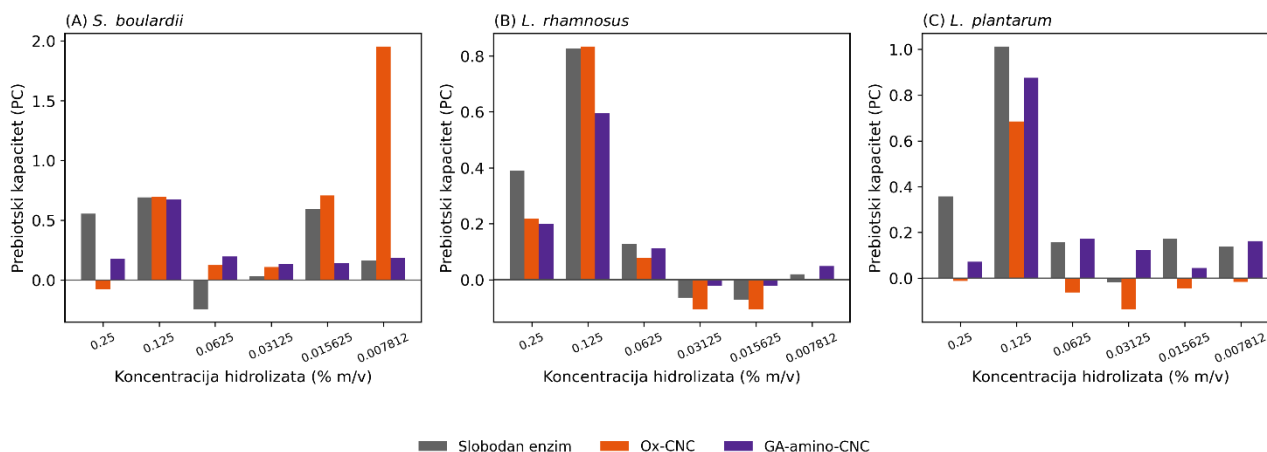
Budući da profil POS nastalih hidrolizom LK-pektina zavisi od forme enzima, a time i od stepena polimerizacije i sastava oligosaharida, ispitano je kako ove razlike utiču na biološku aktivnost, konkretno na prebiotsku aktivnost prema crevnoj mikrobioti. Prebiotski potencijal POS dobijenih hidrolizom LK-pektina sačme uljane repice slobodnom i imobilisanom pektinazom ispitan je praćenjem rasta *S. boulardii*, *E. coli*, *L. rhamnosus* i *L. plantarum* u ispitivanom opsegu koncentracija POS od 0,0078125 do 0,25% (Slika 4.66.).



Slika 4.66. Uticaj različitih koncentracija POS (dobijenih hidrolizom LK-pektina iz sačme uljane repice sa slobodnim i imobilisanim enzimom Pectinex® Ultra SP-L) na rast testiranih mikroorganizama: (A) *S. boulardii*; (B) *E. coli*; (C) *L. rhamnosus*; (D) *L. plantarum*.

Rezultati prikazani kao relativna promena rasta u odnosu na sopstvenu kontrolu pokazuju da POS dobijeni hidrolizom LK-pektina uljane repice ispoljavaju efekat zavisao od doze, sa jasnom granicom između inhibitornih i stimulatornih koncentracija. Na višim koncentracijama (0,125–0,25%) sva tri sistema uzrokuju smanjenje rasta svih ispitivanih mikroorganizama uključujući i probiotičke mikroorganizme (relativna promena <1), što ukazuje na neselektivno inhibitorno dejstvo koje se može pripisati osmotskom stresu na visokim koncentracijama oligosaharida ili prisustvu polisaharida visoke molekulske mase koji ne mogu biti fermentisani od strane probiotika. Na niskim koncentracijama (0,015625–0,03125%) sva tri sistema pokazuju selektivnu stimulaciju *S. boulardii* (relativna promena 1,1–2,9) uz istovremenu inhibiciju *E. coli* (relativna promena ≈1 ili <1), što odgovara kriterijumu prebiotske selektivnosti [196]. Inhibicija rasta *E. coli* pri ovim koncentracijama ne mora poticati samo od izostanka fermentabilnog supstrata, već i od antimikrobnog dejstva kiselih oligosaharida bogatih galakturonskom kiselinom, koji zbog strukturne sličnosti sa glikanskim receptorima crevnog epitela kompetitivno vezuju adhezine i toksine enteropatogenih sojeva [94, 352]. Posebno se izdvaja Ox-CNC sistem koji daje hidrolizate koji na najnižoj ispitivanoj koncentraciji utiču na relativnu promenu od 2,94 za *S. boulardii*, što je znatno više od hidrolizata dobijenih slobodnim enzimom (1,14) i GA-amino-CNC sistemom (1,14) istih koncentracija. Efekat na *L. rhamnosus* i *L. plantarum* je slab i uglavnom nije iznad kontrolnog nivoa, što sugerise da su ovi laktobacili manje osetljivi na prisustvo POS iz LK-pektina repice u ispitivanom opsegu koncentracija.

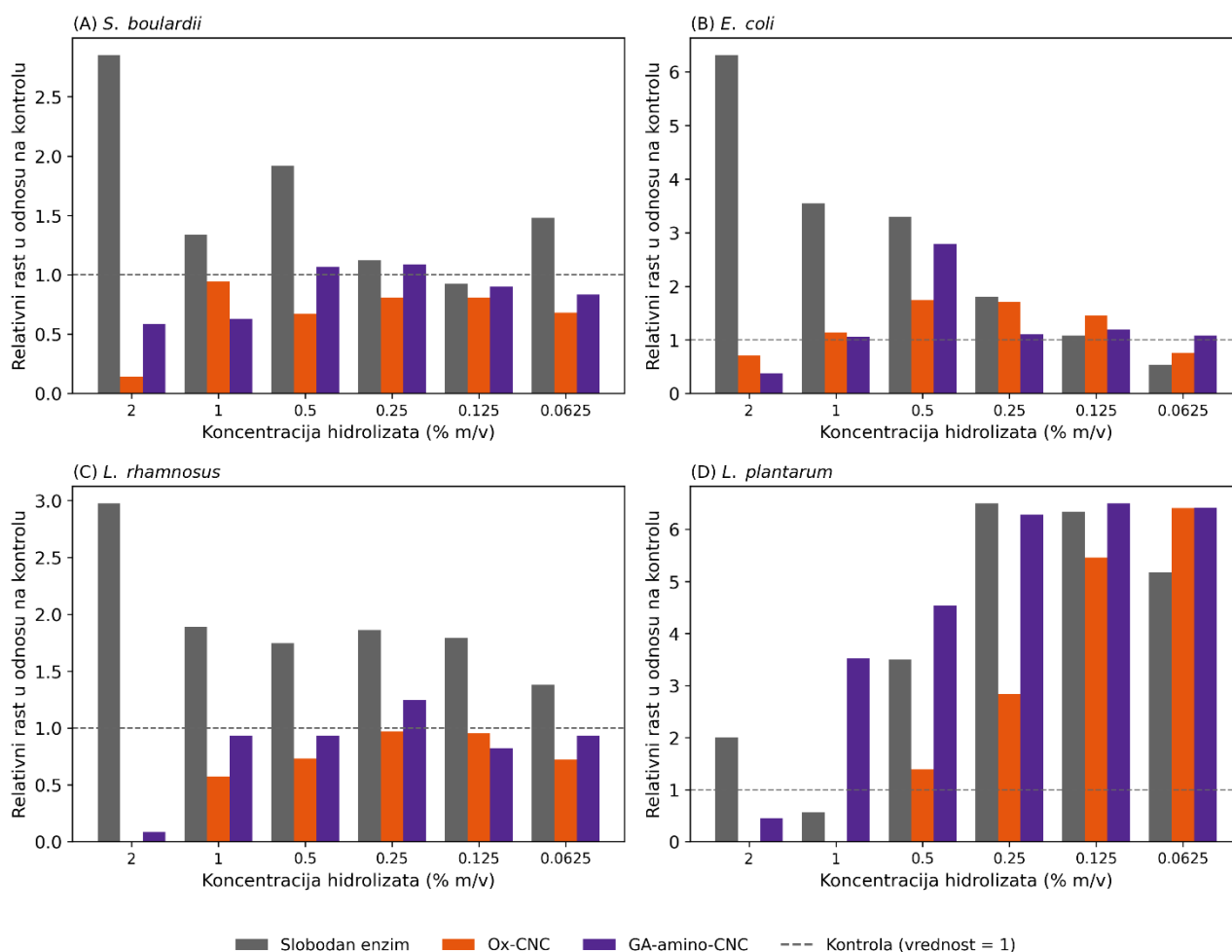
Kao i kod XOS primenjen je i drugi način procene prebiotske aktivnosti proizvoda, određivanjem njegovog prebiotskog kapaciteta, odnosno razlike relativnog rasta probiotičke i patogene vrste, koji je prikazan na slici 4.67. Vrednost PC > 0 ukazuje na selektivnu stimulaciju probiotika (prebiotski efekat), vrednost PC < 0 na favorizovanje *E. coli*, dok PC = 0 označava izostanak selektivnog dejstva. Za svaki probiotički soj PC je određen pri svim ispitivanim koncentracijama hidrolizata, kako bi se utvrdila koncentracija pri kojoj se ostvaruje optimalan uticaj na ispitane mikroorganizme.



Slika 4.67. Prebiotski kapacitet (PC) pektinskih oligosaharida (POS) dobijenih hidrolizom LK-pektina iz sačme uljane repice slobodnom i imobilisanom pektinazom (Ox-CNC i GA-amino-CNC), određen pri svim ispitivanim koncentracijama hidrolizata za (A) *S. boulardii*, (B) *L. rhamnosus* i (C) *L. plantarum*. Isprekidana linija označava vrednost PC = 0.

Za pektinske oligosaharide dobijene iz LK-pektina uljane repice vrednosti prebiotskog kapaciteta kreću se u užem opsegu nego kod XOS. Za sva tri probiotička soja najviši PC ostvaruje se pri koncentraciji hidrolizata od 0,125%: za *S. boulardii* 0,69 (slobodan enzim), 0,69 (Ox-CNC) i 0,67 (GA-amino-CNC), za *L. rhamnosus* 0,83, 0,83 i 0,59, a za *L. plantarum* 1,01, 0,69 i 0,88. Pri koncentracijama nižim od 0,0625% vrednosti PC opadaju i kod pojedinih sojeva prelaze u blago negativne, što ukazuje na izostanak selektivnog dejstva u tom opsegu. Jedino odstupanje od ovog trenda je pojedinačno visoka vrednost PC za *S. boulardii* pri koncentraciji od 0,0078% u hidrolizatu dobijenom pektinazom imobilisanom na Ox-CNC (1,95), koja ne prati vrednosti susednih koncentracija i verovatno je posledica varijabilnosti merenja. Koncentracija hidrolizata od 0,125% stoga predstavlja koncentraciju pri kojoj je uticaj na ispitivane mikroorganizme optimalan, nezavisno od primenjene forme enzima.

Pošto se profil POS dobijenih hidrolizom Ca-pektina razlikuje od LK-pektin POS usled strukturnih razlika između supstrata i različite efikasnosti hidrolize slobodnog i imobilisanih preparata, ispitan je i prebiotski potencijal ovih oligosaharida prema istim mikroorganizmima i u istom opsegu koncentracija. Rezultati su prikazani na slici 4.68.

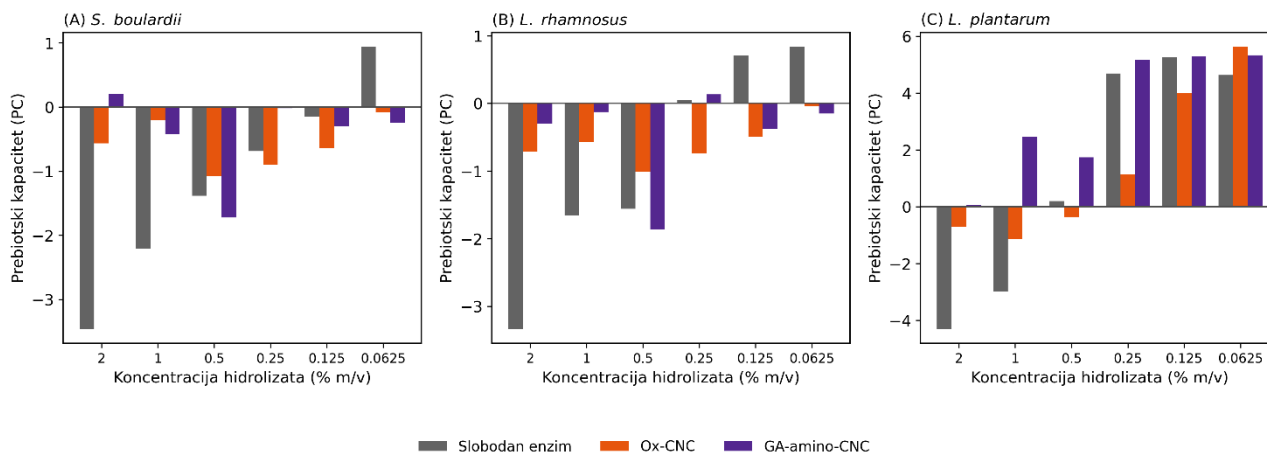


Slika 4.68. Uticaj različitih koncentracija POS (dobijenih hidrolizom Ca-pektina iz sačme uljane repice sa slobodnim i imobilisanim enzimom Pectinex® Ultra SP-L) na rast testiranih mikroorganizama: (A) *S. boulardii*; (B) *E. coli*; (C) *L. rhamnosus*; (D) *L. plantarum*.

POS dobijeni hidrolizom Ca-pektina uljane repice pokazuju izrazito različit profil relativne stimulacije između sistema, pri čemu slobodan enzim ostvaruje znatno više vrednosti relativne promene rasta korisnih mikroorganizama od oba imobilisana preparata. Na koncentracijama 0,25–2% POS dobijen slobodnim enzimom stimuliše *L. plantarum* do 6,3 puta i *L. rhamnosus* do 3 puta u odnosu na kontrolu, dok istovremeno inhibira *E. coli* (relativna promena 0,03–0,56). Izraženija inhibicija u ovom sistemu u skladu je sa antimikrobnim dejstvom kiselih oligosaharida opisanim kod POS iz LK-pektina, a prati i viši stepen hidrolize postignut slobodnim enzimom. POS dobijeni hidrolizom sa oba imobilisana sistema na istim koncentracijama daju vrednosti relativne promene ispod 1 za većinu mikroorganizama, ukazujući na odsustvo stimulatornog efekta. Ovaj obrazac je konzistentan sa nalazom da slobodan enzim ostvaruje znatno višu finalnu koncentraciju redukujućih šećera prilikom hidrolize Ca-pektina (50 mM) u poređenju sa imobilisanim preparatima (33–35 mM), što sugerise direktan uticaj stepena hidrolize na biološku aktivnost nastalih POS. Kompaktnija struktura Ca-pektina, čija je rigidnost posledica formiranja „egg-box“ dimera između nemetilesterifikovanih homogalakuronanskih regija i  $\text{Ca}^{2+}$  jona [341], ograničava difuziju glavnog lanca pektina do aktivnog centra imobilisanih enzima koji su prostorno ograničeni na površini nosača. U skladu sa opštim principom da imobilisani enzimi pokazuju smanjenu efikasnost u reakciji hidrolize makromolekularnih i strukturno zahtevnih supstrata zbog otežane difuzije supstrata do aktivnog centra [353], slobodan enzim u rastvoru ima slobodu kretanja koja mu omogućava lakši pristup nedostupnim regijama Ca-pektinske mreže, što rezultira višim stepenom konverzije i

oligosaharidima sa povoljnijim profilom za prebiotsku fermentaciju. Ovaj nalaz potvrđuje da strukturne karakteristike pektinskog supstrata direktno određuju biološku aktivnost nastalih POS, i da imobilizacija ne može da kompenzuje ograničenu pristupačnost aktivnog centra strukturno zahtevnijim supstratima.

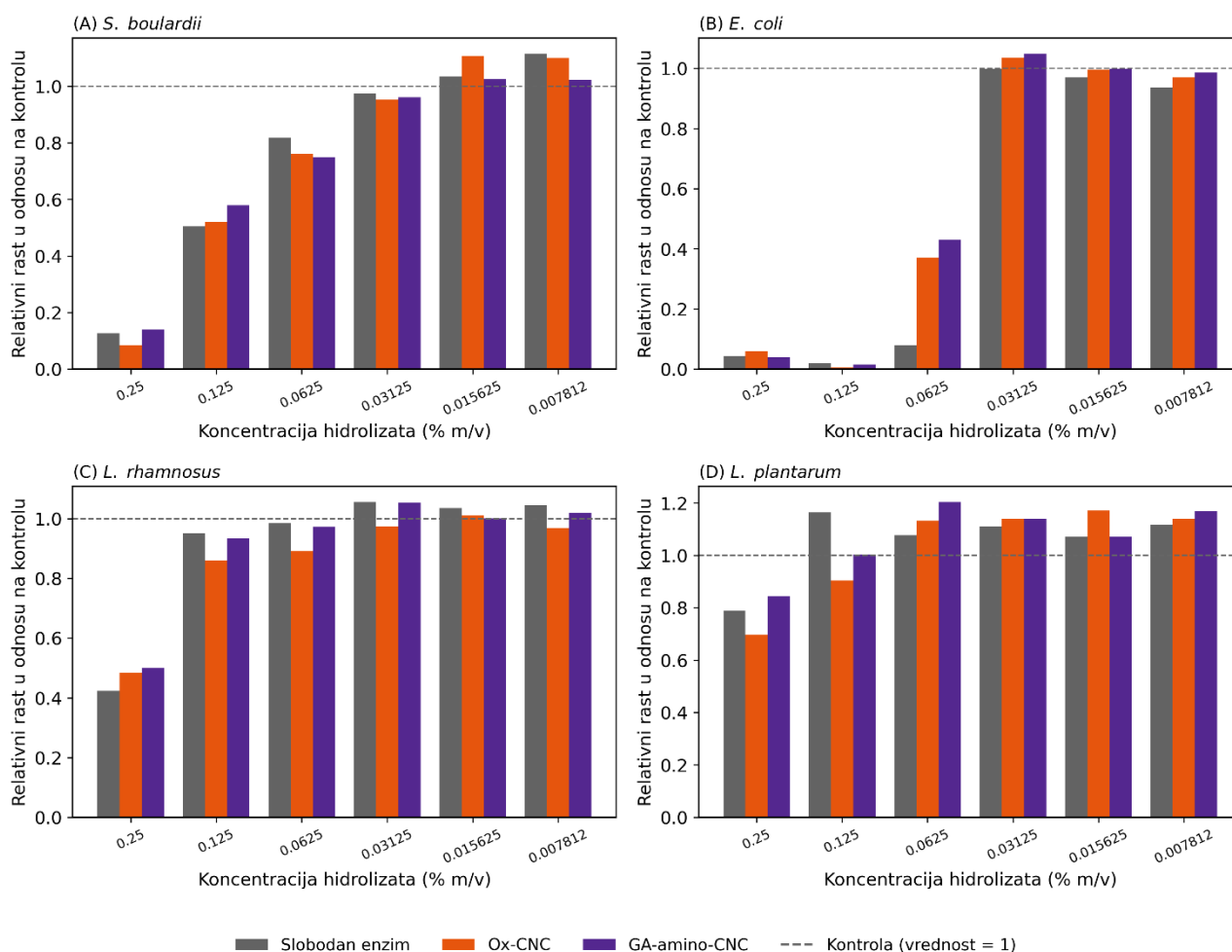
Kao i kod prethodnih oligosaharida, izračunat je i prebiotski kapacitet, odnosno razlika relativnog rasta probiotske i patogene vrste, pri svim ispitivanim koncentracijama hidrolizata, a rezultati su prikazani na slici 4.69. I ovde vrednost  $PC > 0$  ukazuje na selektivnu stimulaciju probiotika, a  $PC < 0$  na favorizovanje *E. coli*.



Slika 4.69. Prebiotski kapacitet (PC) pektinskih oligosaharida (POS) dobijenih hidrolizom Ca-pektina iz sačme uljane repice slobodnom i imobilisanom pektinazom (Ox-CNC i GA-amino-CNC), određen pri svim ispitivanim koncentracijama hidrolizata za (A) *S. boulardii*, (B) *L. rhamnosus* i (C) *L. plantarum*. Isprekidana linija označava vrednost  $PC = 0$ .

Kod pektinskih oligosaharida dobijenih iz Ca-pektina uljane repice prebiotski kapacitet izrazito zavisi i od koncentracije hidrolizata i od soja. Pri koncentracijama od 0,5% i višim vrednosti PC su pretežno negativne, budući da u tom opsegu hidrolizat izraženo stimuliše rast *E. coli*. Za *L. plantarum* PC je izrazito pozitivan u opsegu od 0,0625 do 0,25%, sa maksimumom pri 0,0625% za hidrolizate dobijene imobilisanim preparatima (5,64 za Ox-CNC i 5,33 za GA-amino-CNC), odnosno pri 0,125% za hidrolizat dobijen slobodnim enzimom (5,26). Za *S. boulardii* i *L. rhamnosus* vrednosti PC ostaju niske i pretežno oko nule ili negativne u celom ispitivanom opsegu, a najviše vrednosti (0,94, odnosno 0,84) ostvaruju se pri 0,0625% i to samo za hidrolizat dobijen slobodnim enzimom. Koncentracija hidrolizata od 0,0625% stoga predstavlja koncentraciju optimalnog uticaja na ispitivane mikroorganizme, pri čemu je odgovor izrazito zavisn od soja i najsnažniji kod *L. plantarum*.

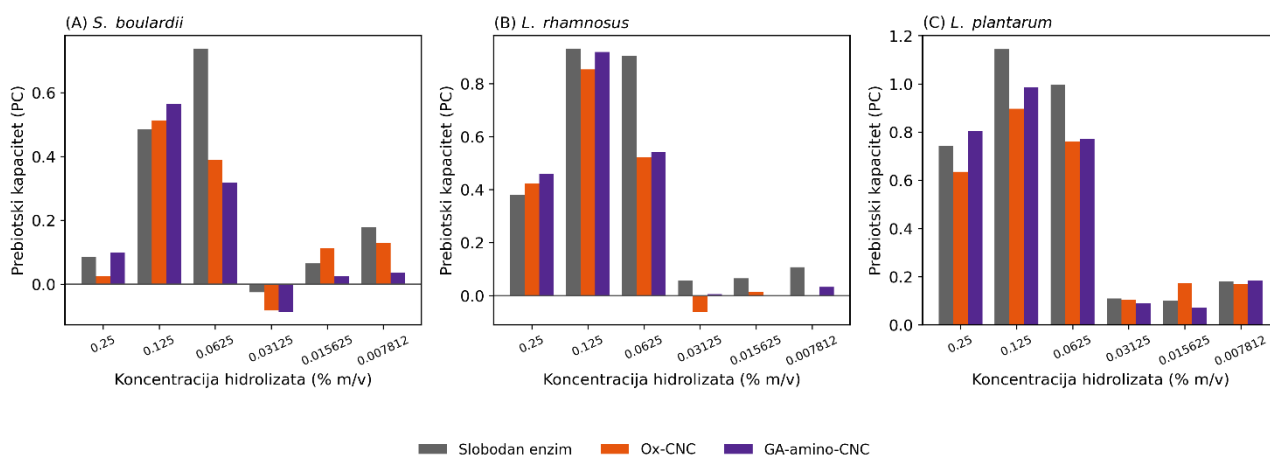
Radi sagledavanja da li strukturna razlika pektina crne ribizle u odnosu na pektine uljane repice utiče i na biološku aktivnost nastalih POS, ispitana je prebiotska aktivnost oligosaharida dobijenih hidrolizom ovog supstrata slobodnom i imobilisanim pektinazama korišćenjem istih uslova. Rezultati su prikazani na slici 4.70.



Slika 4.70. Uticaj različitih koncentracija POS (dobijenih hidrolizom pektina iz pogače crne ribizle sa slobodnim i imobilisanim enzimom Pectinex® Ultra SP-L) na rast testiranih mikroorganizama: (A) *S. boulardii*; (B) *E. coli*; (C) *L. rhamnosus*; (D) *L. plantarum*.

Za razliku od POS iz pektinskih supstrata uljane repice, gde su slobodni i imobilisani preparati davali bitno različite profile biološke aktivnosti, POS iz pektina crne ribizle pokazuju ujednačen odgovor za sve tri forme enzima u celom ispitivanom opsegu koncentracija, što ukazuje da strukturne karakteristike ovog supstrata i profil nastalih POS dominantno određuju biološki efekat, nezavisno od forme enzima. Na visokim koncentracijama (0,0625–0,25%, m/v) sva tri sistema uzrokuju smanjenje rasta svih mikroorganizama (relativna promena <1), uključujući i *E. coli*, što ukazuje na neselektivno inhibitorno dejstvo na ovim koncentracijama. Na niskim koncentracijama (0,015625–0,03125 % (m/v)) sva tri sistema pokazuju blag ali konzistentan stimulatorni efekat na *S. boulardii* i *L. plantarum* (relativna promena 1,02–1,17), uz odsustvo stimulacije *E. coli*. Ujednačenost profila rasta mikroorganizama sa POS dobijenih pomoću slobodnog enzima i oba imobilisana sistema potvrđuje da strukturne karakteristike pektina crne ribizle dominantno određuju biološku aktivnost nastalih POS, nezavisno od efikasnosti enzimskog sistema korišćenog za hidrolizu [94].

I u ovom slučaju određen je prebiotski kapacitet, odnosno razlika relativnog rasta probiotičke i patogene vrste, pri svim ispitivanim koncentracijama hidrolizata, a rezultat je prikazan na slici 4.71. Kao i ranije,  $PC > 0$  ukazuje na selektivnu stimulaciju probiotika, a  $PC < 0$  na favorizovanje *E. coli*.



Slika 4.71. Prebiotski kapacitet (PC) pektinskih oligosaharida (POS) dobijenih hidrolizom pektina iz pogače crne ribizle slobodnom i imobilisanom pektinazom (Ox-CNC i GA-amino-CNC), određen pri svim ispitivanim koncentracijama hidrolizata za (A) *S. boulardii*, (B) *L. rhamnosus* i (C) *L. plantarum*. Isprekidana linija označava vrednost PC = 0.

Za pektinske oligosaharide dobijene iz pektina pogače crne ribizle vrednosti prebiotskog kapaciteta pozitivne su za sva tri probiotska soja u opsegu koncentracija od 0,0625 do 0,25%, što ukazuje na blag prebiotski efekat. Najviši PC za većinu ispitanih kombinacija soja i forme enzima ostvaruje se pri koncentraciji hidrolizata od 0,125%: za *S. boulardii* 0,49 (slobodan enzim), 0,51 (Ox-CNC) i 0,56 (GA-amino-CNC), za *L. rhamnosus* 0,93, 0,85 i 0,92, a za *L. plantarum* 1,14, 0,90 i 0,99. Jedini izuzetak je *S. boulardii* sa hidrolizatom dobijenim slobodnim enzimom, gde je najviša vrednost (0,74) zabeležena pri 0,0625%. Pri koncentracijama nižim od 0,03125% vrednosti PC se približavaju nuli, odnosno selektivno dejstvo izostaje. Vrednosti su međusobno bliske kako između sojeva, tako i između hidrolizata dobijenih dejstvom slobodnog i imobilisanih preparata, što je u skladu sa tim da se primenom imobilisane pektinaze na ovaj supstrat ne narušava prebiotski kvalitet dobijenih POS, iako je ukupan prebiotski potencijal POS iz pogače crne ribizle niži u poređenju sa ostalim ispitivanim supstratima. Koncentracija hidrolizata od 0,125% predstavlja koncentraciju optimalnog uticaja na ispitivane mikroorganizme.

Identifikovani optimalni opseg prebiotskog dejstva POS iz LK-pektina uljane repice (0,007825% – 0,0625 % (m/v), što odgovara 0,1–0,6 mg/mL) u skladu je sa opsegom opisanom u literaturi za POS iz pektinskih supstrata različitog porekla, gde se selektivni prebiotski efekti tipično opisuju u opsegu nižih koncentracija [94, 352]. Na višim ispitivanim koncentracijama (iznad 0,0625 % (m/v)) dolazi do neselektivne inhibicije rasta svih mikroorganizama, što je opisano i za druge pektinske oligosaharidne preparate visokog stepena polimerizacije koji na visokim koncentracijama mogu uzrokovati osmotski stres ili direktno inhibitorno dejstvo na ćelijsku membranu [354]. Treba napomenuti i da su ispitivani hidrolizati korišćeni bez prethodnog prečišćavanja i frakcionisanja, što je u skladu sa konceptom direktne primene sirovih hidrolizata iz nusproizvoda prehrambene industrije, ali istovremeno znači da su rezultati konzervativna procena prebiotskog potencijala, i da bi prečišćeni i frakcionisani POS verovatno pokazali izraženiju biološku aktivnost [355].

#### 4.4.2.5 Poređenje hidrolize različitih pektinskih supstrata

Kada se rezultati hidrolize tri pektinska supstrata različite strukturne složenosti, LK-pektina i Ca-pektina sačme uljane repice i pektina iz pogače crne ribizle posmatraju zajedno, izdvaja se nekoliko zapažanja koje se ne mogu izvesti iz pojedinačnih eksperimenata i koje definišu logiku izbora nosača za imobilizaciju preparata Pectinex® Ultra SP-L.

Prvo zapažanje odnosi se na zavisnost optimalnog nosača od strukturnih karakteristika supstrata. Ox-CNC-pektinaza pokazuje najvišu efikasnost u toku hidrolize linearnog LK-pektina, dok GA-amino-

CNC-pektinaza pokazuje veću efikasnost prilikom hidrolize strukturno složenijih supstrata. Sa porastom strukturne složenosti supstrata raste i značaj prostorne udaljenosti enzima od površine nosača, što sugerira da glutaraldehidni most nije samo sredstvo kovalentnog vezivanja, već i element koji enzimu obezbeđuje konformacionu slobodu i olakšava pristup glomaznijim molekulima supstrata.

Drugo zapažanje odnosi se na neusaglašenost parametara optimizacije imobilizacije i ponašanja preparata tokom višekratne upotrebe. Ox-CNC-pektinaza, koja u eksperimentima ispitivanja parametara imobilizacije ostvaruje viši udeo kovalentno vezanog enzima a posle i veću početnu brzinu hidrolize linearnog supstrata, prilikom višekratne primene gubi aktivnost znatno brže od GA-amino-CNC-pektinaze. Slobodan enzim, sa druge strane, postiže veće početne brzine u reakciji hidrolize LK-pektina i Ca-pektina, ali prilikom hidrolize pektina crne ribizle hidrolizat dobijen upotrebom GA-amino-CNC sistema postiže višu finalnu koncentraciju redukujućih šećera. Ova zapažanja zajedno pokazuju da nijedan pojedinačni parametar, bilo udeo kovalentnog vezivanja, početna brzina hidrolize ili stabilnost prilikom višekratne upotrebe, nije pouzdan za predviđanje ponašanja imobilisanog preparata.

Treće zapažanje iz ugla praktične primene, jeste to da ne postoji direktna korelacija između prinosa hidrolize i biološke aktivnosti nastalih oligosaharida. Imobilisani preparati koji hidrolizom postižu niži prinos redukujućih šećera ne daju nužno i POS slabije prebiotske aktivnosti. U slučaju pektina crne ribizle GA-amino-CNC sistem čak vrši hidrolizu pektina do POS sa boljim prebiotskim efektom od slobodnog enzima. Ovo pokazuje da je imobilizacija pektinaze biotehnoški opravdana ne samo kao tehnološko rešenje za reciklabilnost, već i kao sredstvo za podešavanje profila nastalih oligosaharida u zavisnosti od strukturnih karakteristika ciljnog supstrata.

Sintezom rezultata kroz sve tri ispitivane kombinacije supstrat–nosač izdvaja se obrazac u kojem strukturna složenost supstrata određuje meru u kojoj forma enzima utiče na biološku aktivnost nastalih POS. U toku hidrolize linearnog LK-pektina različite forme enzima daju kvalitativno različite prebiotske profile; prilikom hidrolize strukturno rigidnijeg Ca-pektina samo slobodan enzim daje proizvod koji ima pozitivan uticaj na prebiotike; a hidrolizom strukturno najsloženijeg pektina (iz crne ribizle) proizvodi dobijeni korišćenjem slobodnih i imobilisanih enzima ispoljavaju sličan efekat na ispitivane prebiotike. Praktični značaj ovih zapažanja je da imobilizacija pektinaza na nanoceluloznim nosačima ne narušava biotehnoški potencijal dobijenih POS, ali da izbor nosača treba prilagoditi strukturnim karakteristikama ciljnog supstrata: Ox-CNC je nosač povoljan za imobilizaciju enzima za hidrolizu linearnih pektinskih supstrata, GA-amino-CNC za imobilizaciju enzima koji će učestvovati u hidrolizi strukturno složenijih supstrata.

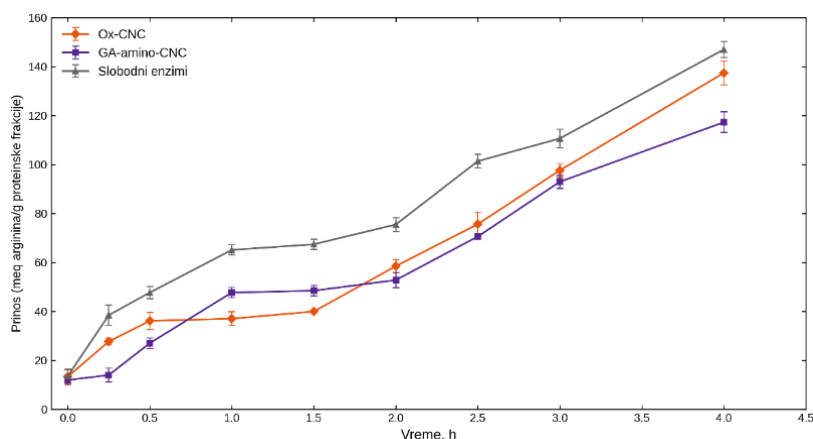
#### **4.4.3 Primena imobilisanih preparata Alcalase® i Flavourzyme® u hidrolizi proteinske frakcije suncokretove sačme**

Za primenu u hidrolizi PFSS korišćeni su kovalentno imobilisani i slobodni preparati Alcalase® i Flavourzyme®. Hidroliza je sprovedena sekvencijalno najpre sa preparatom Alcalase® (slobodnom ili imobilisanom) radi inicijalne endoproteazne razgradnje proteina, a zatim sa preparatom Flavourzyme® (slobodnim ili imobilisanim) radi dalje egzopeptidazne hidrolize nastalih polipeptida pri čemu je doza svakog preparata podešena tako da su slobodni i imobilisani enzim u reakciju uneli jednaku hidrolitičku aktivnost: 1,51 IU za preparat Alcalase® (prema azokazeinu) i 0,074 L-*p*NAU za Flavourzyme® (prema L-leucin-*p*-nitroanilidu). Time je omogućeno direktno poređenje toka hidrolize između slobodnih i imobilisanih sistema, kao i procena uticaja imobilizacije na afinitet enzima prema supstratu. Praćeni su stepen i tok hidrolize ninhidrinskom metodom, SDS-PAGE i HPLC metodama, kao i rezidualna aktivnost oba imobilisana preparata nakon više ciklusa.

Naime, peptidi dobijeni hidrolizom proteina mogu ispoljavati značajne bioaktivne funkcije, kao što su antihipertenzivna, antioksidativna i antimikrobna svojstva, i zavise od tipa enzima [356, 357].

Sekvencijalna primena ova dva enzima, posebno za hidrolizu proteina mahunarki poput sočiva [358] i pasulja [359], dovodi do povećanja antioksidativne aktivnosti i ACE-inhibitornih osobina uz istovremeno poboljšanje ukusa.

Radi sagledavanja kinetike sekvencijalne hidrolize i poređenja efikasnosti slobodnih i imobilisanih preparata u ranoj fazi reakcije, praćen je stepen hidrolize proteinskog izolata suncokretove sačme u vremenskom intervalu od 0 do 4 h, pri čemu je samo Alcalase® primenjena u prvoj fazi (0–2 h), a Flavourzyme® dodat u drugoj fazi hidrolize (2–4 h). Tok hidrolize za slobodne i imobilisane sisteme prikazan je na slici 4.72.



*Slika 4.72. Tok sekvencijalne hidrolize proteinske frakcije suncokretove sačme (PFSS) pomoću Alcalase® i Flavourzyme®: slobodnih enzima i imobilisanih na Ox-CNC i GA-amino-CNC.*

*Eksperimentalni uslovi: PFSS 2,5% (m/v) u 0,01 M Na-fosfatnom puferu pH 7,0, temperatura 50 °C, 24 h; 1. faza: Alcalase® (1,51 IU), 2 h; 2. faza: dodatak Flavourzyme® (0,074 L-pNAU); analiza stepena hidrolize (DH) ninhidrinskom metodom.*

U svim ispitivanim sistemima prinos hidrolize raste kontinualno tokom čitavog trajanja reakcije bez dostizanja platoa u okviru ispitivanog vremenskog intervala od 4 h. Slobodni enzimi ostvaruju viši prinos u celom ispitivanom opsegu do 4 h, pri čemu razlika između slobodnih i imobilisanih sistema ostaje relativno konstantna od 0,5 h nadalje. Hidrolizom slobodnim enzimima postižu se vrednosti od 148 meq/g proteinske frakcije nakon 4 h, hidrolizom sa Ox-CNC sistemom 138 meq/g proteinske frakcije, a hidrolizom pomoću GA-amino-CNC sistema 118 meq/g proteinske frakcije. Niži prinos imobilisanih preparata u ranoj fazi reakcije konzistentan je sa difuzionim ograničenjima svojstvenim heterogenim katalitičkim sistemima u kojima supstrat mora da difunduje do površine nosača pre nego što dođe u kontakt sa enzimom, što usporava početnu brzinu hidrolize u poređenju sa slobodnim enzimima u rastvoru [360].

Radi sagledavanja ukupnog efekta sekvencijalne hidrolize, reakcija je produžena do 24 h, a prinos hidrolize i stepen hidrolize određeni su na kraju eksperimenta za sve tri ispitivane forme enzima i prikazani u tabeli 4.8.

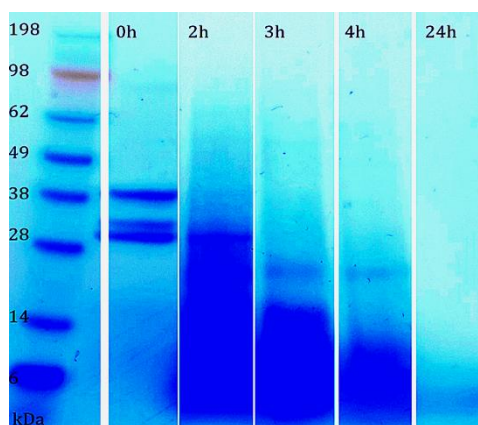
*Tabela 4.8. Prinos hidrolize i stepen hidrolize proteinske frakcije suncokretove sačme nakon 24 h tretmana slobodnim i imobilisanim preparatima Alcalase® i Flavourzyme®. Eksperimentalni uslovi: PFSS 2,5% (m/v) u 0,01 M Na-fosfatnom puferu pH 7,0, temperatura 50 °C, 24 h; 1. faza: Alcalase®, 2 h; 2. faza: dodatak Flavourzyme®, analiza prinosa hidrolize ninhidrinskom metodom.*

|                                 | <i>Prinos (meq arginina/g proteinske frakcije)</i> | <i>Stepen hidrolize, %</i> |
|---------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------|
| Slobodni enzimi                 | 954                                                | 12,6                       |
| Ox-CNC imobilisani enzimi       | 1125                                               | 15,0                       |
| GA-amino-CNC imobilisani enzimi | 1425                                               | 19,0                       |

Pri hidrolizi proteinske frakcije pomoću GA-amino-CNC imobilisanog sistema postiže se najviši prinos od 1425 meq arginina/g proteinske frakcije i stepen hidrolize od 19 %, što je znatno više od vrednosti hidrolizata dobijenih slobodnim enzimima i Ox-CNC sistemom. Viši stepen hidrolize postignut primenom imobilisanih preparata u poređenju sa slobodnim enzimima zanimljiv je nalaz koji se razlikuje od uobičajenog očekivanja da imobilizacija smanjuje katalitičku efikasnost. Postignuti stepen hidrolize od 19% hidrolizom pomoću GA-amino-CNC sistema i 15% sa Ox-CNC sistemom može se porediti sa vrednostima opisanim u literaturi za hidrolizu proteinskih frakcija suncokretove sačme slobodnim i imobilisanim proteazama. U literaturi su opisane vrednosti stepena hidrolize od 12–16% prilikom sekvencijalne primene ova dva preparata na proteinskom izolatu suncokretove sačme pri sličnim uslovima (pH 7,0, 50 °C, 24 h) [357]. Stepen hidrolize od 19% postignut hidrolizom sa imobilisanim proteazama na GA-amino-CNC stoga ulazi u gornji deo opsega opisanog u literaturi i direktno se može pripisati sprečavanju autolize proteaza u toku produžene hidrolize, što je jedan od ključnih mehanizama gubitka aktivnosti slobodnog preparata. Pored toga, postignuti stepen hidrolize je u skladu sa literaturnim preporukama za optimalan opseg za dobijanje bioaktivnih peptida koji su rastvorljivi i odlikuju se odsustvom gorčine [361, 362], i sličan je onom koji je u literaturi povezan sa značajnim poboljšanjem funkcionalnih i senzorskih svojstava, i bolju apsorpciju od strane organizma [363]. Takođe, hidroliza proteinske frakcije suncokretove sačme upotrebom imobilisanih proteaza omogućava proizvodnju bioaktivnih peptida sa izraženim antioksidativnim i antimikrobnim dejstvom [356].

Činjenica da je nanobiokatalitički sistem dobijen imobilizacijom na GA-amino-CNC optimalan za primenu u ispitivanim uslovima hidrolize se može objasniti time da je proteinska frakcija suncokretove sačme kompleksna smeša proteina različitih struktura i dostupnosti, a glutaraldehidni most na GA-amino-CNC verovatno pozicionira molekule ovih proteaza u konformacijama koje favorizuju pristup hidrofobnim regijama proteina, dok istovremeno sprečava autolizu enzima koja je u toku dužeg vremena reakcije merljiv uzrok gubitka aktivnosti slobodnog preparata [311, 319].

SDS-PAGE analiza hidrolizata dobijenih GA-amino-CNC imobilisanim sistemom (Slika 4.73.) vizuelno potvrđuje napredak hidrolize kroz vreme.

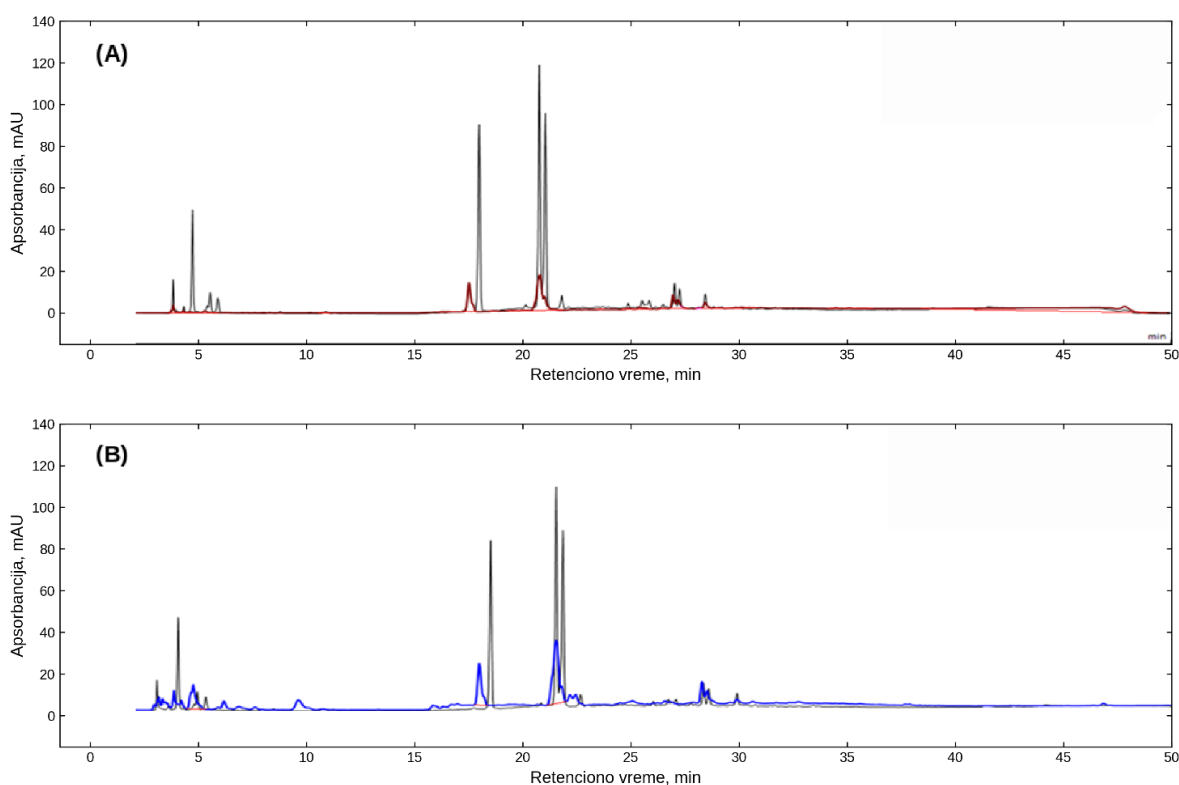


*Slika 4.73. SDS-PAGE analiza hidrolizata proteinske frakcije suncokretove sačme (PFSS) dobijenih sekvencijalnom hidrolizom Alcalase® i Flavourzyme® imobilisanih na GA-amino-CNC u različitim vremenskim tačkama. Eksperimentalni uslovi: Bolt™ Bis-Tris Plus gel 4–12 %, NuPAGE™ MES SDS Running Buffer, 200 V/160–70 mA, 20 min; bojenje SimplyBlue™ SafeStain; standard SeeBlue™ Pre-stained; uzorci uzimani nakon 0, 2, 3, 4 i 24 h sekvencijalne hidrolize; PFSS 2,5% (m/v), 0,01 M Na-fosfatni pufer pH 7,0, 50 °C.*

Na početku reakcije (0 h) vidljive su dve dominantne proteinske trake na 38 kDa i oko 30 kDa koje odgovaraju glavnim proteinskim frakcijama suncokreta: 11S globulinu heliantininu, čije subjediniice  $\alpha$  (38 kDa) i  $\beta$  (22 kDa) formiraju heksamernu strukturu [364, 365]. Na slici 4.73. je traka  $\beta$  subjediniice nešto pomerenjena u odnosu na teorijsku vrednost. Nakon 2 h hidrolize intenzitet trake na

38 kDa značajno opada, dok se pojavljuje difuzno bojenje u oblasti ispod 14 kDa, što ukazuje na brzu proteolitičku aktivnost preparata Alcalase® koja preferentno razlaže  $\alpha$ -subjedinice heliantinina na kraće peptide [366]. Nakon 3 h traka na 30 kDa gotovo iščezava i akumulira se intenzivno bojenje u oblasti 6–14 kDa, što odražava kombinovano delovanje endo- i egzopeptidaza. Dok Alcalase® nastavlja razgradnju  $\beta$ -subjedinica i preostalih frakcija, egzopeptidazna aktivnost Flavourzyme® počinje oslobađati kratke peptide i slobodne aminokiseline iz već nastalih fragmenata [361]. Nakon 4 h i 24 h hidrolize nema više vidljivih traka iznad 14 kDa, što potvrđuje kompletnu degradaciju svih visokomolekularnih proteinskih frakcija, dok difuzno i homogeno bojenje u oblasti ispod 6 kDa ukazuje na akumulaciju kratkih peptida i slobodnih aminokiselina čije su funkcionalne i senzorne osobine od interesa za primenu u prehrambenoj industriji [367, 368].

HPLC analiza hidrolizata dobijenih hidrolizom pomoću GA-amino-CNC nanobiokatalitičkog sistema pruža uvid u promene peptidnog profila tokom hidrolize i omogućava identifikaciju frakcija koje se akumuliraju u toku reakcije, u poređenju sa nehidrolizovanom proteinskom frakcijom sačme. Dobijeni hromatogrami nakon 4h i 24h, preklopljeni sa početnim uzorcima proteina suncokretove sačme prikazani su na slici 4.74.

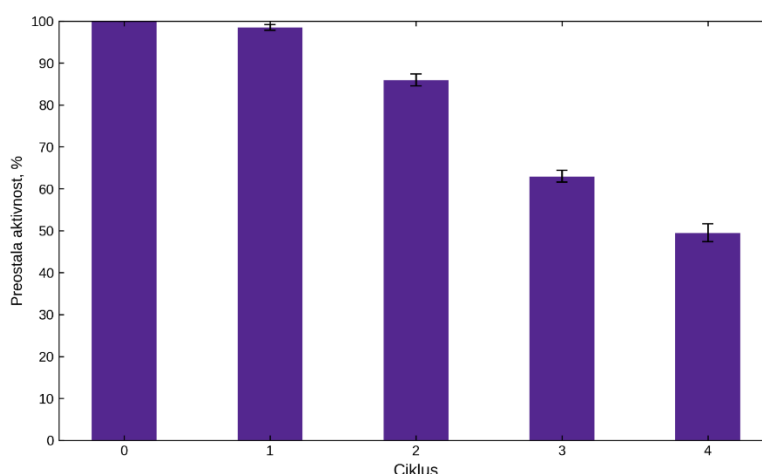


*Slika 4.74. HPLC analiza hidrolizata proteinske frakcije suncokretove sačme (PFSS) sekvencijalnom hidrolizom Alcalase® i Flavourzyme® imobilisanih na GA-amino-CNC: (A) 4 h; (B) 24 h. Eksperimentalni uslovi: BioBasic-8 kolona (150×4,6 mm, 5  $\mu$ m), mobilna faza: voda/TFA 0,1% (A): acetonitril (B), gradijent 0–50% B (45 min), protok 1,0 mL/min, 30 °C, detekcija UV 214/280/345 nm; crna linija – nehidrolizovana PFSS; crvena linija – hidrolizat nakon 4 h; plava linija – hidrolizat nakon 24 h.*

Crne linije u oba panela predstavljaju profil nehidrolizovanog supstrata, koji se odlikuje pikovima na retencionim vremenima od 16–20 min koji odgovaraju dominantnim proteinskim frakcijama suncokreta. Nakon 4 h hidrolize (slika 4.74. (A), crvena linija) intenzitet pikova u oblasti 16–20 min je značajno smanjen u poređenju sa nehidrolizovanim proteinima, dok se istovremeno pojavljuju novi pikovi na ranijim retencionim vremenima (3–5 min) koji odgovaraju peptidnim frakcijama manje molekulske mase nastalim delovanjem preparata Alcalase®. Pikovi u opsegu 25–27 min prisutni u

nehidrolizovanim uzorcima gotovo u potpunosti iščezavaju, što ukazuje da su hidrofobniji proteinski fragmenti preferentni supstrat za inicijalnu endoproteaznu hidrolizu. Nakon 24 h (slika 4.74. (B), plava linija) profil hidrolizata se dodatno menja. Intenzitet preostalog signala u oblasti 16–20 min dalje opada, a pikovi u oblasti od 3–5 min postaju izraženiji, što odražava napredak egzopeptidazne aktivnosti i oslobađanje slobodnih aminokiselina i kraćih peptida tokom reakcije. Smanjenje hidrofobnih pikova na retencionim vremenima od 25–27 min koje je započelo već nakon 4 h od početka hidrolize i koje se vidi i nakon 24 h hidrolize povoljno je iz ugla senzorskog kvaliteta hidrolizata, budući da su upravo hidrofozni peptidi srednje dužine lanca glavni uzročnici gorčine u proteinskim hidrolizatima suncokretovog semena [361].

Budući da je GA-amino-CNC biokatalitički sistem ostvario najviši stepen hidrolize i prinos nakon 24 h hidrolize, stabilnost u višecikličnoj upotrebi ispitana je upravo za ovaj preparat u četiri uzastopna ciklusa hidrolize proteinske frakcije suncokretove sačme (Slika 4.75.).



*Slika 4.75. Ciklusi višekratne upotrebe smeše enzima Alcalase® i Flavourzyme® imobilisanih na GA-amino-CNC (rezidualna aktivnost nakon svakog ciklusa). Eksperimentalni uslovi: PFSS 2,5% (m/v) u 0,01 M Na-fosfatnom puferu pH 7,0, temperatura 50 °C; nakon svakog ciklusa nosač je odvojen centrifugiranjem, ispran puferom i ponovo korišćen sa svežim rastvorom; analiza aktivnosti preko stepena hidrolize određenog ninhidrinskom metodom.*

Nakon prvog ciklusa rezidualna aktivnost ostaje praktično nepromenjena (98%), što potvrđuje da jednokratna primena ne uzrokuje merljiv gubitak katalitičke efikasnosti. Nakon drugog ciklusa dolazi do pada na 85%, koji se ubrzava u trećem (63%) i četvrtom ciklusu (50%). Ovakav gubitak aktivnosti znatno je izraženiji od onog zabeleženog za pektinazu imobilisanu na istom nosaču u jednakom broju ciklusa (zadržanih 70% aktivnosti nakon četiri ciklusa), što ukazuje na specifičnu složenost sekvencijalnog dvoenzimskog sistema. Razloge ovakvog ponašanja treba tražiti u dva komplementarna efekta. Prvi je rizik od selektivnog gubitka jedne od dve enzimske komponente između ciklusa. Komponente sa slabijim afinitetom prema površini nosača progresivno se gube, i posledica je manja efikasnost.

Drugi efekat odnosi se na progresivnu kontaminaciju površine nosača proizvodima reakcije, koja je svojstvena biokatalitičkim sistemima koji rade sa proteinskim supstratima [369, 370]. Peptidi i nehidrolizovane proteinske frakcije nastale tokom hidrolize postepeno se adsorbuju na slobodne površine nanočestica kroz elektrostatičke interakcije sa amino grupama nosača i vodonične veze. Akumulacija ovih molekula blokira pristup novom supstratu aktivnim centrima vezanih enzima, što se manifestuje kao progresivan pad katalitičke efikasnosti nezavisan od stvarne stabilnosti samih imobilisanih enzima. Posebno je ovaj efekat izražen prilikom hidrolize proteinskih supstrata jer nastali peptidi različitih dužina, naelektrisanja i hidrofobnosti pružaju širok spektar mogućnosti za nespecifičnu adsorpciju, što je metodološki izazov koji ne zavisi od izbora nosača.

Uprkos tome, zadržavanje 50% aktivnosti nakon četiri ciklusa povoljno je u poređenju sa literaturnim podacima za imobilisane serinske proteaze na alternativnim nosačima. Alkalaza imobilisana na glioksil-agarozu i naknadno modifikovana glutaraldehydom u reakciji hidrolize kazeina zadržava približno 50% aktivnosti nakon pet uzastopnih ciklusa, dok preparat bez glutaraldehydne modifikacije postaje gotovo neaktivan već nakon tri ciklusa [316]. Sličan obrazac dobijen na ovom nosaču sugerise da glutaraldehydno umrežavanje nezavisno od tipa nosača obezbeđuje stabilnost u opsegu 50% rezidualne aktivnosti nakon 4–5 ciklusa prilikom hidrolize proteinskih supstrata, što GA-amino-CNC sistem pozicionira u srednjem opsegu vrednosti opisanih za kovalentno imobilisanog preparata Alcalase<sup>®</sup>, sa dodatnom prednošću da je u našem slučaju ovaj rezultat postignut u sekvencijalnom dvoenzimskom sistemu na strukturno složenoj proteinskoj frakciji suncokretove sačme.

## 5 ZAKLJUČAK

U ovoj disertaciji dobijeni su i ispitani nanocelulozni nosači za imobilizaciju hidrolitičkih enzima, sa ciljem valorizacije nusproizvoda prehrambene industrije u proizvode sa dodatom vrednošću. Istraživanje je obuhvatilo pripremu i funkcionalizaciju nanoceluloze, optimizaciju adsorpcije i kovalentne imobilizacije četiri enzimska preparata (Rohalase® SEP-Visco, Pectinex® Ultra SP-L, Alcalase® i Flavourzyme®) i primenu dobijenih nanobiokatalizatora u hidrolizi hemiceluloznih, pektinskih i proteinskih frakcija agroindustrijskih sirovina. Sistematskim poređenjem četiri nosača (CNC, amino-CNC, Ox-CNC i GA-amino-CNC) pokazano je da izbor površinske funkcionalizacije nanoceluloze nije univerzalan, već da zavisi od osobina i molekulske strukture enzima koji se vezuje za nosač, kao i od strukturne složenosti ciljnog supstrata. Ovaj zaključak predstavlja ključnu poruku disertacije i osnovu za racionalan dizajn nanobiokatalitičkih sistema namenjenih preradi nusproizvoda prehrambene industrije, odnosno frakcija dobijenih iz ovih sirovina.

Na osnovu izvedenih eksperimenata izvedeni su sledeći zaključci:

- Kiselinskom hidrolizom mikrokristalne celuloze (MCC, 20 µm) sumpornom kiselinom (98 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, razblaženom do 45 % (m/m)) dobijeni su nanokristali celuloze (CNC) čiji je štapčast oblik potvrđen TEM analizom, dok je veličina čestica u disperziji određena metodom dinamičkog rasipanja svetlosti. Dve strategije hemijske modifikacije, perjodatna oksidacija i silanizacija APTES-om sa naknadnom aktivacijom glutaraldehydom (amino-CNC i GA-amino-CNC), uspešno su potvrđene FTIR spektroskopijom, pri čemu je osnovna morfologija čestica u najvećoj meri očuvana, dok je kod Ox-CNC uočena izraženija agregacija, kako na TEM snimcima tako i kroz porast hidrodinamičkog prečnika.
- Analizom uticaja ključnih faktora i optimizacijom uslova imobilizacije utvrđen je dvostepeni mehanizam kovalentnog vezivanja na Ox-CNC i GA-amino-CNC: brza inicijalna adsorpcija praćena sporijim formiranjem Šifovih baza između aldehidnih grupa nosača i amino grupa lizinskih ostataka enzima. Analiza trodimenzionalne strukture enzima (raspodela elektrostatičkog potencijala i položaj lizinskih ostataka u odnosu na aktivni centar) pružila je okvir za tumačenje razlika u efikasnosti imobilizacije i za predviđanje optimalnog nosača za svaki enzim.
- Izbor optimalnog nosača pokazao se specifičnim za svaki enzim. Za ksilanazu najbolji rezultati postignuti su na Ox-CNC (247 IU/g nosača, specifična aktivnost 1,47 IU/mg proteina, odnosno 61% vrednosti za slobodni enzim, uz oko 90% kovalentno vezanog enzima nakon 5 h imobilizacije), koji uz to omogućava jednostavniji, jednostepeni postupak aktivacije nosača. Za pektinazu optimalan je nosač GA-amino-CNC (112 IU/g nosača, 1,70 IU/mg proteina, 79% kovalentno vezanog enzima), kod kojeg glutaraldehidni most pogoduje očuvanju katalitičke aktivnosti. Kod proteaza, GA-amino-CNC obezbeđuje viši kapacitet vezivanja i otpornost na desorpciju pri imobilizaciji preparata Alcalase®, dok se pri imobilizaciji višekomponentnog proteolitičkog preparata Flavourzyme® na dva nosača ispoljava komplementarna selektivnost: na Ox-CNC je izraženije vezivanje egzopeptidaznih, a na GA-amino-CNC endopeptidaznih komponenti, čime se otvara mogućnost ciljanog podešavanja proteolitičkog dejstva imobilisanog preparata izborom nosača.
- Razvijeni nanobiokatalitički sistemi uspešno su primenjeni u hidrolizi frakcija dobijenih iz nusproizvoda prehrambene industrije. Ksilanaza imobilisana na Ox-CNC u hidrolizi ksilanske frakcije suncokretove sačme omogućila je dobijanje XOS dominantnog stepena polimerizacije 3–6, sa prinosom od 31% u odnosu na ukupnu koncentraciju ksiloze; sistem je zadržao 95% aktivnosti nakon šest ciklusa, a dobijeni hidrolizati stimulisali su rast sva tri ispitivana probiotska soja, pri čemu je rast *E. coli* bio blago inhibiran u sistemima sa slobodnim enzimom i GA-amino-CNC preparatom.

- Primena imobilisanog preparata sa pektinolitičkom aktivnošću na tri pektinska supstrata pokazala je da izbor nosača zavisi od strukturne složenosti supstrata. Pri hidrolizi linearnog LK-pektina iz sačme uljane repice Ox-CNC-pektinaza zadržava početnu brzinu na nivou slobodnog enzima (1,34 naspram 1,42 mM/min) i znatno je nadmašuje GA-amino-CNC-pektinazu (0,85 mM/min), jer vezivanje neposredno uz površinu nosača ne ometa pristup linearnim galakturonanskim lancima. Kod strukturno najsloženijeg pektina iz pogače crne ribizle odnos se obrće: GA-amino-CNC-pektinaza daje najvišu finalnu koncentraciju redukujućih šećera (37 mM, naspram 32 mM sa slobodnim enzimom i 23 mM sa Ox-CNC-pektinazom), pošto prostorna udaljenost enzima od površine nosača, koju obezbeđuje glutaraldehidni most, postaje ključan faktor. Imobilisani preparat na GA-amino-CNC zadržao je 50% početne pektinolitičke aktivnosti nakon šest ciklusa. Dobijeni POS iz sve tri pektinske frakcije, mogu stimulisati sva tri ispitivana probiotska soja, i u slučaju hidrolize imobilisanim preparatom.
- Sekvencijalnom primenom imobilisanih proteaza (Alcalase® i Flavourzyme®) na GA-amino-CNC u hidrolizi proteinske frakcije suncokretove sačme postignut je stepen hidrolize od 19%, viši nego sa slobodnim enzimima i sa sistemom imobilisanim na Ox-CNC. Ovakav ishod, u kojem imobilisani sistem nadmašuje slobodne enzime, objašnjen je sprečavanjem autolize proteaza prostorno razdvojenih kovalentnim vezivanjem za nosač. SDS-PAGE analiza potvrdila je potpunu razgradnju  $\alpha$ - i  $\beta$ -subjedinica 11S heliantinina uz akumulaciju peptida u oblasti ispod 14 kDa, dok je HPLC analiza pokazala iščezavanje pikova nehidrolizovanih proteinskih frakcija i nastanak peptidnih frakcija niže molekulske mase; sistem je pritom zadržao 50% aktivnosti nakon četiri ciklusa.

U celini, rezultati disertacije pokazuju da se ciljanim izborom površinske funkcionalizacije nanoceluloznog nosača, vođenim strukturnim osobinama enzima i supstrata, mogu dobiti efikasni nanobiokatalizatori sa zadovoljavajućim katalitičkim osobinama i mogućnostima za višekratnu upotrebu, koji se mogu koristiti za proizvodnju prebiotskih oligosaharida i funkcionalnih proteinskih hidrolizata iz nusproizvoda prehrambene industrije.

## 6 LITERATURA

1. Maghraby, Y.R., et al., *Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications*. ACS Omega, 2023. **8**(6): p. 5184-5196.
2. Jothyswarupha, K.A., et al., *Immobilized enzymes: exploring its potential in food industry applications*. Food Science and Biotechnology, 2025. **34**(7): p. 1533-1555.
3. Gogoi, S., et al., *Chapter 6 - Different methods for nanomaterial-based immobilization of enzymes*, in *Antimicrobial Dressings*, R. Khan and S. Gowri, Editors. 2023, Academic Press. p. 113-131.
4. Kaczmarek, M. and A.M. Białkowska, *Enzymatic functionalization of bacterial nanocellulose: current approaches and future prospects*. Journal of Nanobiotechnology, 2025. **23**(1): p. 82.
5. Incani, V., C. Danumah, and Y. Boluk, *Nanocomposites of nanocrystalline cellulose for enzyme immobilization*. Cellulose, 2013. **20**: p. 191-200.
6. Modenbach, A.A. and S.E. Nokes, *Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings – A review*. Biomass and Bioenergy, 2013. **56**: p. 526-544.
7. Carvalho, A.F.A., et al., *Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis*. Food Research International, 2013. **51**(1): p. 75-85.
8. Elayaperumal, S., et al., *Green Enzymatic Hydrolysis Protocols for Protein Recovery from Food By-Products*, in *Food Waste Valorization : Green Techniques in Sustainable Management*, T. Sarkar, Editor. 2025, Springer US: New York, NY. p. 63-83.
9. Zhang, M., et al., *Composition, functional properties, health benefits and applications of oilseed proteins: A systematic review*. Food Research International, 2023. **171**: p. 113061.
10. Muñoz-Almagro, N., et al., *Berry fruits as source of pectin: Conventional and non-conventional extraction techniques*. International Journal of Biological Macromolecules, 2021. **186**: p. 962-974.

11. Añón, M.C., et al., *Plant Bioactive Peptides (Oilseed, Legume, Cereal, Fruit, and Vegetable)*, in *Handbook of Food Bioactive Ingredients: Properties and Applications*, S.M. Jafari, A. Rashidinejad, and J. Simal-Gandara, Editors. 2022, Springer International Publishing: Cham. p. 1-34.
12. Simović, M., et al., *Sunflower Meal Valorization through Enzyme-Aided Fractionation and the Production of Emerging Prebiotics*. Foods, 2024. **13**(16).
13. Cobs-Rosas, M., et al., *Assessment of antiproliferative activity of pectic substances obtained by different extraction methods from rapeseed cake on cancer cell lines*. Carbohydrate Polymers, 2015. **117**: p. 923-932.
14. Ćorović, M., et al., *Valorisation of Blackcurrant Pomace by Extraction of Pectin-Rich Fractions: Structural Characterization and Evaluation as Multifunctional Cosmetic Ingredient*. Polymers (Basel), 2024. **16**(19).
15. Sath, P.K., et al., *Recovery of agricultural waste biomass: A path for circular bioeconomy*. Science of The Total Environment, 2023. **870**: p. 161904.
16. Google, *Gemini (Nano Banana 2)*. 2026.
17. Dwevedi, A. *Enzyme Immobilization*. in *Cambridge International Law Journal*. 2016.
18. Guisan, J., *Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition*. 2013.
19. Moehlenbrock, M.J.M., Shelley D. , *Enzyme Stabilization and Immobilization: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology. Vol. 679. 2011: Humana Totowa, NJ.
20. Mohidem, N.A., et al., *Recent Advances in Enzyme Immobilisation Strategies: An Overview of Techniques and Composite Carriers*. Journal of Composites Science, 2023. **7**(12): p. 488.
21. Knežević-Jugović, Z., *Enzimsko inženjerstvo*. 2008, Beograd: Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu.
22. Alaqarbeh, M., *Adsorption Phenomena: Definition, Mechanisms, and Adsorption Types: Short Review*. 2021. **13**: p. 43-51.

23. Spasojevic, M., et al., *The Enzyme Immobilization: Carriers and Immobilization methods*. JOURNAL OF ENGINEERING & PROCESSING MANAGEMENT, 2020. **11**.
24. Sirisha, V.L., A. Jain, and A. Jain, *Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes*. Adv Food Nutr Res, 2016. **79**: p. 179-211.
25. Thangaraj, B. and P. Solomon, *Immobilization of Lipases – A Review. Part II: Carrier Materials*. ChemBioEng Reviews, 2019. **6**.
26. Credou, J. and T. Berthelot, *Cellulose: from biocompatible to bioactive material*. Journal of Materials Chemistry B, 2014. **2**(30): p. 4767-4788.
27. Bisht, M., et al., *Biomass-derived functional materials as carriers for enzymes: towards sustainable and robust biocatalysts*. Green Chemistry, 2023. **25**(12): p. 4591-4624.
28. Trache, D., et al., *Nanocellulose: From Fundamentals to Advanced Applications*. Front Chem, 2020. **8**: p. 392.
29. Kumar, R., R.K. Sharma, and A.P. Singh, *Cellulose based grafted biosorbents - Journey from lignocellulose biomass to toxic metal ions sorption applications - A review*. Journal of Molecular Liquids, 2017. **232**: p. 62-93.
30. Nikolic, T., et al., *Preparation of cellulosic fibers with biological activity by immobilization of trypsin on periodate oxidized viscose fibers*. Cellulose, 2014. **21**(3): p. 1369-1380.
31. Ittrat, P., et al., *Application of agriculture waste as a support for lipase immobilization*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2014. **3**(3): p. 77-82.
32. Wu, R., et al., *Immobilization of pectinase on oxidized pulp fiber and its application in whitewater treatment*. Carbohydr Polym, 2013. **97**(2): p. 523-9.
33. R, R., et al., *Bacterial nanocellulose: engineering, production, and applications*. Bioengineered, 2021. **12**(2): p. 11463-11483.
34. Tamaddon, F. and D. Arab, *Urease covalently immobilized on cotton-derived nanocellulose-dialdehyde for urea detection and urea-based multicomponent synthesis of tetrahydro-pyrazolopyridines in water*. RSC Adv, 2019. **9**(71): p. 41893-41902.

35. Sampaio, L.M., et al., *Laccase immobilization on bacterial nanocellulose membranes: Antimicrobial, kinetic and stability properties*. Carbohydr Polym, 2016. **145**: p. 1-12.
36. Yuan, H., et al., *Evaluation of nanocellulose carriers produced by four different bacterial strains for laccase immobilization*. Carbohydr Polym, 2018. **196**: p. 457-464.
37. Anirudhan, T.S. and S.R. Rejeena, *Adsorption and hydrolytic activity of trypsin on a carboxylate-functionalized cation exchanger prepared from nanocellulose*. J Colloid Interface Sci, 2012. **381**(1): p. 125-36.
38. Ariaeenejad, S., E. Motamedi, and G.H. Salekdeh, *Highly efficient removal of dyes from wastewater using nanocellulose from quinoa husk as a carrier for immobilization of laccase*. Bioresource Technology, 2022. **349**: p. 126833.
39. Ruming, Y., et al., *Peroxidase Conjugate of Cellulose Nanocrystals for the Removal of Chlorinated Phenolic Compounds in Aqueous Solution*. Biotechnology, 2008. **7**.
40. Di Risio, S. and N. Yan, *Adsorption and inactivation behavior of horseradish peroxidase on cellulosic fiber surfaces*. J Colloid Interface Sci, 2009. **338**(2): p. 410-9.
41. Karra-Chaabouni, M., et al., *Physical immobilization of Rhizopus oryzae lipase onto cellulose substrate: activity and stability studies*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2008. **66**(2): p. 168-77.
42. Monier, M. and A.M. El-Sokkary, *Modification and characterization of cellulosic cotton fibers for efficient immobilization of urease*. Int J Biol Macromol, 2012. **51**(1-2): p. 18-24.
43. Bryjak, J., J. Liesiene, and V. Štefuca, *Man-tailored cellulose-based carriers for invertase immobilization*. Cellulose, 2008. **15**(4): p. 631-640.
44. Nikolic, T., et al., *TEMPO-oxidized cotton as a substrate for trypsin immobilization: impact of functional groups on proteolytic activity and stability*. Cellulose, 2017. **24**(4): p. 1863-1875.
45. Dufresne, A., *Nanocellulose: a new ageless bionanomaterial*. Materials Today, 2013. **16**(6): p. 220-227.
46. Pennells, J., et al., *Trends in the production of cellulose nanofibers from non-wood sources*. Cellulose, 2020. **27**.

47. Phanthong, P., et al., *Nanocellulose: Extraction and application*. Carbon Resources Conversion, 2018. **1**(1): p. 32-43.
48. Sulaiman, S., et al., *A Review: Potential Usage of Cellulose Nanofibers (CNF) for Enzyme Immobilization via Covalent Interactions*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015. **175**(4): p. 1817-1842.
49. Imamura, A.H., et al., *Monitoring cellulose oxidation for protein immobilization in paper-based low-cost biosensors*. Mikrochim Acta, 2020. **187**(5): p. 272.
50. Wang, S., et al., *Simple and covalent fabrication of a paper device and its application in sensitive chemiluminescence immunoassay*. Analyst, 2012. **137**(16): p. 3821-7.
51. Fabbrizzi, L., *Beauty in Chemistry: Making Artistic Molecules with Schiff Bases*. J Org Chem, 2020. **85**(19): p. 12212-12226.
52. Billman, J.H. and A.C. Diesing, *Reduction of Schiff Bases with Sodium Borohydride*. The Journal of Organic Chemistry, 1957. **22**(9): p. 1068-1070.
53. Hansen, E.H. and H.S. Mikkelsen, *Enzyme-Immobilization by the Glutardialdehyde Procedure. An Investigation of the Effects of Reducing the Schiff-Bases Generated, as Based on Studying the Immobilization of Glucose Oxidase to Silanized Controlled Pore Glass*. Analytical Letters, 1991. **24**(8): p. 1419-1430.
54. Xiao, N., H. Liang, and J. Lu, *Degradable and biocompatible aldehyde-functionalized glycopolymer conjugated with doxorubicin via acid-labile Schiff base linkage for pH-triggered drug release*. Soft Matter, 2011. **7**(22).
55. Orelma, H., et al., *Surface functionalized nanofibrillar cellulose (NFC) film as a platform for immunoassays and diagnostics*. Biointerphases, 2012. **7**(1-4): p. 61.
56. Yamaguchi, A., et al., *Enhanced and Prolonged Activity of Enzymes Adsorbed on TEMPO-Oxidized Cellulose Nanofibers*. ACS Omega, 2020. **5**(30): p. 18826-18830.
57. Barkane, A., et al., *Cellulose nanocrystals vs. cellulose nanofibers: A comparative study of reinforcing effects in uv-cured vegetable oil nanocomposites*. Nanomaterials, 2021. **11**(7): p. 1791.

58. Isogai, A., T. Saito, and H. Fukuzumi, *TEMPO-oxidized cellulose nanofibers*. *Nanoscale*, 2010. **3**: p. 71-85.
59. Vrancken, K.C., et al., *The Role of Silanols in the Modification of Silica Gel with Aminosilanes*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1995. **170**(1): p. 71-77.
60. Mohd, N.H., et al., *Effect of Aminosilane Modification on Nanocrystalline Cellulose Properties*. *Journal of Nanomaterials*, 2016. **2016**(1): p. 4804271.
61. Gadhave, R., P. Dhawale, and C. Sorate, *Surface Modification of Cellulose with Silanes for Adhesive Application: Review*. *Open Journal of Polymer Chemistry*, 2021. **11**: p. 11-30.
62. Salgado-Delgado, A., et al., *Chemical modification of rice (*Oryza sativa*) and potato (*Solanum tuberosum*) starches by silanization with trimethoxy(methyl)silane*. 2022.
63. Khanjanzadeh, H., et al., *Surface chemical functionalization of cellulose nanocrystals by 3-aminopropyltriethoxysilane*. *Int J Biol Macromol*, 2018. **106**: p. 1288-1296.
64. Wei, B., et al., *Synthesis, characterization and hydrophobicity of silylated starch nanocrystal*. *Carbohydr Polym*, 2016. **136**: p. 1203-8.
65. Pacaphol, K. and D. Aht-Ong, *The influences of silanes on interfacial adhesion and surface properties of nanocellulose film coating on glass and aluminum substrates*. *Surface and Coatings Technology*, 2017. **320**: p. 70-81.
66. Banjanac, K., et al., *Epoxy-silanization – tool for improvement of silica nanoparticles as support for lipase immobilization with respect to esterification activity*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2016. **91**(10): p. 2654-2663.
67. Alvarado, D.R., et al., *A facile strategy for photoactive nanocellulose-based antimicrobial materials*. *Green Chemistry*, 2019. **21**(12): p. 3424-3435.
68. Ngwabebhoh, F.A., A. Erdem, and U. Yildiz, *A design optimization study on synthesized nanocrystalline cellulose, evaluation and surface modification as a potential biomaterial for prospective biomedical applications*. *Int J Biol Macromol*, 2018. **114**: p. 536-546.

69. Wang, D., *A critical review of cellulose-based nanomaterials for water purification in industrial processes*. Cellulose, 2019. **26**(2): p. 687-701.
70. Østby, H. and A. Várnai, *Hemicellulolytic enzymes in lignocellulose processing*. Essays in Biochemistry, 2023. **67**(3): p. 533-550.
71. Wertz, J.-L. and O. Bedue, *Lignocellulosic Biorefineries*. 2013. 1-521.
72. Wyman, C., et al., *43 Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose*. Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility, 2005.
73. Flickinger, M.C. and S.W. Drew, *The encyclopedia of bioprocess technology : fermentation, biocatalysis, and bioseparation*. Wiley biotechnology encyclopedias. 1999, New York: Wiley.
74. Chauhan, P.S., et al., *Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications*. Appl Microbiol Biotechnol, 2012. **93**(5): p. 1817-30.
75. Oliveira Rodrigues, P., et al., *Potential Applications of Hemicellulose*. 2023. p. 1-31.
76. Haile, S. and A. Ayele, *Pectinase from Microorganisms and Its Industrial Applications*. ScientificWorldJournal, 2022. **2022**: p. 1881305.
77. Tousehik, S.H., et al., *Functional Applications of Lignocellulolytic Enzymes in the Fruit and Vegetable Processing Industries*. J Food Sci, 2017. **82**(3): p. 585-593.
78. Pedrolli, D., et al., *Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes*. The Open Biotechnology Journal, 2009. **3**: p. 9-18.
79. Rawlings, N.D., F.R. Morton, and A.J. Barrett, *An Introduction to Peptidases and the Merops Database*, in *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*, J. Polaina and A.P. MacCabe, Editors. 2007, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 161-179.
80. Knežević-Jugović, Z., *Enzimsko inženjerstvo udžbenik*. 2008, Beograd: Tehnološko-metalurški fakultet.
81. Song, P., et al., *Microbial proteases and their applications*. Frontiers in Microbiology, 2023. **Volume 14 - 2023**.

82. Costa, J.R., et al., *Valorization of Agricultural Lignocellulosic Plant Byproducts through Enzymatic and Enzyme-Assisted Extraction of High-Value-Added Compounds: A Review*. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2020. **8**(35): p. 13112-13125.
83. Dhillon, G.S., et al., *Chapter 2 - Agricultural-Based Protein By-Products: Characterization and Applications*, in *Protein Byproducts*, G. Singh Dhillon, Editor. 2016, Academic Press. p. 21-36.
84. Brito, T., M. Ferreira, and A. Fai, *Utilization of Agricultural By-products: Bioactive Properties and Technological Applications*. Food Reviews International, 2020. **38**: p. 1-25.
85. Kadam, D. and S. Lele, *Value addition of oilseed meal: a focus on bioactive peptides*. Journal of Food Measurement and Characterization, 2018. **12**: p. 1-10.
86. Chen, Y., et al., *Xylo-Oligosaccharides, Preparation and Application to Human and Animal Health: A Review*. Frontiers in Nutrition, 2021. **Volume 8 - 2021**.
87. de Moura, F.A., F.T. Macagnan, and L.P. da Silva, *Oligosaccharide production by hydrolysis of polysaccharides: a review*. International Journal of Food Science and Technology, 2015. **50**(2): p. 275-281.
88. Pasarin, D., et al. *Characterization of Pectin Oligosaccharides Obtained from Citrus Peel Pectin*. Fermentation, 2023. **9**, DOI: 10.3390/fermentation9030312.
89. Orrego, D., et al., *Towards a sustainable circular bioprocess: Pectic oligosaccharides (POS) enzymatic production using passion fruit peels*. LWT, 2024. **207**: p. 116681.
90. Aondona, M.M., et al., *In vitro antioxidant and antihypertensive properties of sesame seed enzymatic protein hydrolysate and ultrafiltration peptide fractions*. Journal of Food Biochemistry, 2021. **45**(1): p. e13587.
91. He, R., et al., *Antihypertensive and free radical scavenging properties of enzymatic rapeseed protein hydrolysates*. Food Chemistry, 2013. **141**(1): p. 153-159.
92. Meshginfar, N., et al., *Production of antioxidant peptide fractions from a by-product of tomato processing: mass spectrometry identification*

- of peptides and stability to gastrointestinal digestion*. J Food Sci Technol, 2018. **55**(9): p. 3498-3507.
93. Wongkaew, M., et al., *Mango Pectic Oligosaccharides: A Novel Prebiotic for Functional Food*. Frontiers in Nutrition, 2022. **Volume 9 - 2022**.
  94. Babbar, N., et al., *Pectic oligosaccharides from agricultural by-products: production, characterization and health benefits*. Critical Reviews in Biotechnology, 2016. **36**(4): p. 594-606.
  95. Sharma, D., et al., *Functional oligosaccharides as a promising food ingredient: a gleam into health apprehensions and techno-functional advantages*. Journal of Food Measurement and Characterization, 2025. **19**(1): p. 505-536.
  96. König, D., et al. *Potential Relevance of Bioactive Peptides in Sports Nutrition*. Nutrients, 2021. **13**, DOI: 10.3390/nu13113997.
  97. Sharma, V. and M. Thakur, *Plant Protein Hydrolysates as Healthier and Sustainable Nutraceutical*, in *Sustainable Food Systems (Volume II): SFS: Novel Sustainable Green Technologies, Circular Strategies, Food Safety & Diversity*, M. Thakur, Editor. 2024, Springer Nature Switzerland: Cham. p. 329-341.
  98. Chalamaiah, M., et al., *Regulatory requirements of bioactive peptides (protein hydrolysates) from food proteins*. Journal of Functional Foods, 2019. **58**: p. 123-129.
  99. Sun, X.D., *Enzymatic hydrolysis of soy proteins and the hydrolysates utilisation*. International Journal of Food Science and Technology, 2011. **46**(12): p. 2447-2459.
  100. Ancuța, P. and A. Sonia, *Oil Press-Cakes and Meals Valorization through Circular Economy Approaches: A Review*. Applied Sciences, 2020. **10**(21): p. 7432.
  101. Gonçalves, D.A., et al., *How prebiotics have been produced from agro-industrial waste: An overview of the enzymatic technologies applied and the models used to validate their health claims*. Trends in Food Science & Technology, 2023. **135**: p. 74-92.
  102. Park, B. and J.M. Burke, *Phylogeography and the Evolutionary History of Sunflower (*Helianthus annuus* L.): Wild Diversity and the Dynamics of Domestication*. Genes (Basel), 2020. **11**(3).

103. FAOSTAT. *Fao.org*. 2025 04.02.2025.]; Available from: [https://ourworldindata.org/grapher/sunflower-seed-production?tab=chart&country=European+Union~OWID\\_EUR~OWID\\_ASI~OWID\\_NAM~OWID\\_SAM~OWID\\_AFR](https://ourworldindata.org/grapher/sunflower-seed-production?tab=chart&country=European+Union~OWID_EUR~OWID_ASI~OWID_NAM~OWID_SAM~OWID_AFR).
104. RZS. *Očekivana proizvodnja pšenice, malina i višanja i zasejane površine kukuruza, šećerne repe, suncokreta i soje, stanje 23.05. 2023.* 2025 04.02.2025.]; Available from: <https://data.stat.gov.rs/Home/Result/130102?languageCode=sr-Latn#>.
105. Vinnichuk, L., E. Pogorelova, and A. Dergunov, *Oilseed market: global trends*. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2019. **274**(1): p. 012030.
106. Piazza, G.J. and T.A. Foglia, *Rapeseed oil for oleochemical usage*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2001. **103**(7): p. 450-454.
107. Lomascolo, A., et al., *Rapeseed and sunflower meal: a review on biotechnology status and challenges*. Appl Microbiol Biotechnol, 2012. **95**(5): p. 1105-14.
108. Shchekoldina, T. and M. Aider, *Production of low chlorogenic and caffeic acid containing sunflower meal protein isolate and its use in functional wheat bread making*. J Food Sci Technol, 2014. **51**(10): p. 2331-43.
109. Li, P., et al., *Chemical composition, energy and amino acid digestibility in double-low rapeseed meal fed to growing pigs*. Journal of Animal Science and Biotechnology, 2015. **6**(1): p. 37.
110. Feng, D.Z., J., *Nutritional and anti-nutritional composition of rapeseed meal and its utilization as a feed ingredient for animal*. International Consultative Group for Research on Rapeseed, 2007: p. 265–270.
111. Kaur, R. and G. Ghoshal, *Sunflower protein isolates-composition, extraction and functional properties*. Advances in Colloid and Interface Science, 2022. **306**: p. 102725.
112. Murru, M. and C. Calvo, *Sunflower protein enrichment. Methods and potential applications*. OCL, 2020. **27**: p. 17.

113. Bautista, J., J. Parrado, and A. Machado, *Composition and fractionation of sunflower meal: Use of the lignocellulosic fraction as substrate in solid-state fermentation*. *Biological Wastes*, 1990. **32**(3): p. 225-233.
114. Lomascolo, A., et al., *Rapeseed and sunflower meal: a review on biotechnology status and challenges*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012. **95**(5): p. 1105-1114.
115. Beaubier, S., et al., *A Rational Approach for the Production of Highly Soluble and Functional Sunflower Protein Hydrolysates*. *Foods*, 2021. **10**(3).
116. Rodrigues, I., M.G. Carvalho, and J.M.s. Rocha, *Increasing the Protein Content of Rapeseed Meal by Enzymatic Hydrolysis of Carbohydrates*. *Bioresources*, 2014. **9**: p. 2010-2015.
117. Goodarzi Boroojeni, F., et al., *Spontaneous and enzymatic fermentation of rapeseed cake for broiler nutrition*. *Animal Feed Science and Technology*, 2022. **284**: p. 115135.
118. Eide, L.H., et al., *Fermented sunflower meal in diets for Atlantic salmon under commercial-like farming conditions promotes gut lactic acid bacteria and controls inflammation in the distal intestine*. *Aquaculture*, 2025. **595**: p. 741517.
119. Camargo, D. and L. Sene, *Production of ethanol from the hemicellulosic fraction of sunflower meal biomass*. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2014. **4**(2): p. 87-93.
120. Hurtado-Romero, A., et al., *Characterization of berry by-products as fermentable substrates: Proximate and phenolic composition, antimicrobial activity, and probiotic growth dynamics*. *LWT*, 2024. **204**: p. 116468.
121. Petrov Ivanković, A., et al., *Berries Pomace Valorization: From Waste to Potent Antioxidants and Emerging Skin Prebiotics*. *International Journal of Fruit Science*, 2024. **24**(1): p. 85-101.
122. Vilas-Franquesa, A., et al., *The food by-products bioprocess wheel: a guidance tool for the food industry*. *Trends in Food Science & Technology*, 2024. **152**: p. 104652.

123. Jaouhari, Y., et al., *Carbohydrases treatment on blueberry pomace: Influence on chemical composition and bioactive potential*. LWT, 2024. **206**: p. 116573.
124. Liu, H., et al., *Sustainable blueberry waste recycling towards biorefinery strategy and circular bioeconomy: A review*. Bioresource Technology, 2021. **332**: p. 125181.
125. Agrosmart. *Beri biznis forum: Proizvodnja bobičastog voća sve popularnija u Srbiji*. 2022 30.06.2025.]; Available from: <https://agrosmart.net/2022/09/26/beri-biznis-forum-proizvodnja-bobicastog-voca-sve-popularnija-u-srbiji/>.
126. Pedisić, S., et al. *Valorization of Berry Fruit By-Products: Bioactive Compounds, Extraction, Health Benefits, Encapsulation and Food Applications*. Foods, 2025. **14**, DOI: 10.3390/foods14081354.
127. Diez-Sánchez, E., A. Quiles, and I. Hernando, *Use of Berry Pomace to Design Functional Foods*. Food Reviews International, 2023. **39**(6): p. 3204-3224.
128. Tagliani, C., et al., *Blueberry pomace, valorization of an industry by-product source of fibre with antioxidant capacity*. Food Science and Technology, 2019. **39**.
129. Quiles, A., et al., *Use of berry pomace to replace flour, fat or sugar in cakes*. International Journal of Food Science & Technology, 2018. **53**.
130. Zhang, J. and Y. Li, *Berry pomace as a potential ingredient for plant-based meat analogs*. Food Biomacromolecules, 2024. **1**: p. 127-139.
131. Kumar, H., et al., *Selected fruit pomaces: Nutritional profile, health benefits, and applications in functional foods and feeds*. Current Research in Food Science, 2024. **9**: p. 100791.
132. Chedea, V.S., et al. *Grape Pomace Polyphenols as a Source of Compounds for Management of Oxidative Stress and Inflammation—A Possible Alternative for Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs?* Molecules, 2022. **27**, DOI: 10.3390/molecules27206826.
133. Szymanowska, U. and B. Baraniak *Antioxidant and Potentially Anti-Inflammatory Activity of Anthocyanin Fractions from Pomace Obtained from Enzymatically Treated Raspberries*. Antioxidants, 2019. **8**, DOI: 10.3390/antiox8080299.

134. Gopalan, A., et al., *The health benefits of blackcurrants*. Food Funct, 2012. **3**(8): p. 795-809.
135. Bonarska-Kujawa, D., et al., *Biological activity of blackcurrant Extracts (Ribes nigrum L.) in relation to erythrocyte membranes*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 783059.
136. Trych, U., et al., *The Bioaccessibility of Antioxidants in Black Currant Puree after High Hydrostatic Pressure Treatment*. Molecules, 2020. **25**(15).
137. Cosmulescu, S., I. Trandafir, and V. Nour, *MINERAL COMPOSITION OF FRUIT IN BLACK AND RED CURRANT*. South-Western Journal of Horticulture, Biology & Environment, 2015. **6**: p. 46-51.
138. Jurevičiūtė, I., et al., *Characterization of Berry Pomace Powders as Dietary Fiber-Rich Food Ingredients with Functional Properties*. Foods, 2022. **11**(5).
139. Raczkowska, E., A. Wojdyło, and P. Nowicka, *The use of blackcurrant pomace and erythritol to optimise the functional properties of shortbread cookies*. Scientific Reports, 2024. **14**(1): p. 3788.
140. Diez-Sánchez, E., A. Quiles, and I. Hernando, *Interactions between Blackcurrant Polyphenols and Food Macronutrients in Model Systems: In Vitro Digestion Studies*. Foods, 2021. **10**(4).
141. Jaroslawska, J. and P. Matusevicius, *Polyphenol-rich Blackcurrant Pomace Counteracts Impaired Antioxidant Status and Serum Lipid Profile in Rabbits Fed a Diet High in Unsaturated Fat*. Journal of Nutrition & Food Sciences, 2016. **6**.
142. Untea, A.E., et al., *Blackcurrant (Fruits, Pomace, and Leaves) Phenolic Characterization before and after In Vitro Digestion, Free Radical Scavenger Capacity, and Antioxidant Effects on Iron-Mediated Lipid Peroxidation*. Foods, 2024. **13**(10).
143. Jurgoński, A., et al., *Polyphenol-rich extract from blackcurrant pomace attenuates the intestinal tract and serum lipid changes induced by a high-fat diet in rabbits*. Eur J Nutr, 2014. **53**(8): p. 1603-13.
144. Alba, K., et al., *Fractionation and characterisation of dietary fibre from blackcurrant pomace*. Food Hydrocolloids, 2018. **81**: p. 398-408.

145. Hall, M.B., *Challenges with nonfiber carbohydrate methods*<sup>1,2</sup>. Journal of Animal Science, 2003. **81**(12): p. 3226-3232.
146. Van Soest, P.J., J.B. Robertson, and B.A. Lewis, *Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition*. Journal of Dairy Science, 1991. **74**(10): p. 3583-3597.
147. Ordaz, S., *Fibrolitic Enzymes And Silage Inoculants To Improve The Nutritive Value Of Silage*. 2017, University of Vermont.
148. de Leeuw, J.A., et al., *Effects of dietary fibre on behaviour and satiety in pigs*. Proc Nutr Soc, 2008. **67**(4): p. 334-42.
149. Jović, J., et al., *Application of lignocellulolytic fungi for bioethanol production from renewable biomass*. Hemijska industrija, 2014. **69**: p. 86-86.
150. Klemm, D., et al., *Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material*. Angewandte Chemie International Edition, 2005. **44**(22): p. 3358-3393.
151. Singh, N., et al., *Overview of the Process of Enzymatic Transformation of Biomass*. 2019.
152. Chen, H., *Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice*. 2014. 1-511.
153. Chen, H., *Chemical Composition and Structure of Natural Lignocellulose*. 2014. p. 25-71.
154. Adetunji, L.R., et al., *Advances in the pectin production process using novel extraction techniques: A review*. Food Hydrocolloids, 2017. **62**: p. 239-250.
155. Maxwell, E., et al., *Pectin – An emerging new bioactive food polysaccharide*. Trends in Food Science & Technology, 2012. **24**: p. 64–73.
156. Polesca, C., et al., *Structure and Applications of Pectin in Food, Biomedical, and Pharmaceutical Industry: A Review*. Coatings, 2021. **11**: p. 922.
157. Jayani, R., S. Saxena, and R. Gupta, *Microbial pectinolytic enzymes: A review*. Process Biochemistry, 2005. **40**: p. 2931-2944.

158. Thornton, P., H. Gurney-Smith, and E. Wollenberg, *Alternative sources of protein for food and feed*. Current Opinion in Environmental Sustainability, 2023. **62**: p. 101277.
159. Kotecka-Majchrzak, K., et al., *Oilseed proteins – Properties and application as a food ingredient*. Trends in Food Science & Technology, 2020. **106**: p. 160-170.
160. Voisin, A.-S., et al., *Legumes for feed, food, biomaterials and bioenergy in Europe: a review*. Agronomy for Sustainable Development, 2014. **34**(2): p. 361-380.
161. Yu, L.J. and M.S.L. Brooks, *Chapter 7 - Food Industry Protein By-Products and Their Applications*, in *Protein Byproducts*, G. Singh Dhillon, Editor. 2016, Academic Press. p. 120-132.
162. Chandran, A.S., S. Suri, and P. Choudhary, *Sustainable plant protein: an up-to-date overview of sources, extraction techniques and utilization*. Sustainable Food Technology, 2023. **1**(4): p. 466-483.
163. Khan, Z.S., et al. *Sustainable Isolation of Bioactive Compounds and Proteins from Plant-Based Food (and Byproducts)*. Plants, 2023. **12**, DOI: 10.3390/plants12162904.
164. Jōgi, K. and R. Bhat, *Valorization of food processing wastes and by-products for bioplastic production*. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 2020. **18**: p. 100326.
165. Tomičić, Z., et al., *By-products of the oil industry as sources of amino acids in feed*. Food and Feed Research, 2020. **47**: p. 131-137.
166. Samtiya, M., R.E. Aluko, and T. Dhewa, *Plant food anti-nutritional factors and their reduction strategies: an overview*. Food Production, Processing and Nutrition, 2020. **2**(1): p. 6.
167. Rațu, R.N., et al. *Application of Agri-Food By-Products in the Food Industry*. Agriculture, 2023. **13**, DOI: 10.3390/agriculture13081559.
168. Trujillo-Cayado, L.A., et al. *Emerging Trends in Sustainable Biological Resources and Bioeconomy for Food Production*. Applied Sciences, 2025. **15**, DOI: 10.3390/app15126555.
169. Moncada B, J., V. Aristizábal M, and C.A. Cardona A, *Design strategies for sustainable biorefineries*. Biochemical Engineering Journal, 2016. **116**: p. 122-134.

170. Kazmi, A., et al., *Introduction*, in *Advanced Oil Crop Biorefineries*, A. Kazmi, Editor. 2011, The Royal Society of Chemistry. p. 0.
171. Kassim, M., et al., *Sustainable Biorefinery Concept for Industrial Bioprocessing*. 2020. p. 15-53.
172. Lucarini, M., et al., *Biorefinery for Innovative Production of Bioactive Compounds from Vegetable Biomass*, in *Biorefinery Production Technologies for Chemicals and Energy*. 2020. p. 89-128.
173. Sengupta, S., D. Bhattacharya, and M. Mukhopadhyay, *Bioactive Compounds Production from Vegetable Biomass*, in *Biorefinery Production Technologies for Chemicals and Energy*. 2020. p. 241-258.
174. Chabanon, G., et al., *Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates*. *Process Biochemistry*, 2007. **42**(10): p. 1419-1428.
175. Rutherford, S.M., *Methodology for determining degree of hydrolysis of proteins in Hydrolysates: a review*. *J AOAC Int*, 2010. **93**(5): p. 1515-22.
176. Agyei, D., et al., *Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides*. *Food and Bioproducts Processing*, 2016. **98**: p. 244-256.
177. Leni, G., et al. *Degree of Hydrolysis Affects the Techno-Functional Properties of Lesser Mealworm Protein Hydrolysates*. *Foods*, 2020. **9**, DOI: 10.3390/foods9040381.
178. Alahmad, K., et al., *Effect of the Degree of Hydrolysis on Nutritional, Functional, and Morphological Characteristics of Protein Hydrolysate Produced from Bighead Carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) Using Ficin Enzyme*. *Foods*, 2022. **11**(9).
179. Vaishnav, A., et al., *Bromelain excised hydrolysates with potent bioactivity from *Bellamia bengalensis* soft tissues: Process optimization and characterization*. *Journal of Agriculture and Food Research*, 2025. **19**: p. 101595.
180. Jogi, N., et al., *The role of dual hydrolysis of soybean on functional properties and protein digestibility: a sustainable approach*. *Front Nutr*, 2024. **11**: p. 1444329.

181. Cingöz, A. and M. Yildirim, *Effects of hydrolysis degree on the functional properties of hydrolysates from sour cherry kernel protein concentrate*. Foods and Raw Materials, 2023. **11**: p. 197-206.
182. Chakrabarti, S., S. Guha, and K. Majumder, *Food-Derived Bioactive Peptides in Human Health: Challenges and Opportunities*. Nutrients, 2018. **10**(11).
183. Nasri, M., *Chapter Four - Protein Hydrolysates and Biopeptides: Production, Biological Activities, and Applications in Foods and Health Benefits. A Review*, in *Advances in Food and Nutrition Research*, F. Toldrá, Editor. 2017, Academic Press. p. 109-159.
184. Sanchez, A. and A. Vázquez, *Bioactive peptides: A review*. Food Quality and Safety, 2017. **1**: p. 29-46.
185. Cesaretti, A., et al., *Protein hydrolysates: from agricultural waste biomasses to high added-value products (minireview)*. AgroLife Scientific Journal, 2020. **9**(1): p. 79-87.
186. Martínez-Alvarez, O., S. Chamorro, and A. Brenes, *Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review*. Food Research International, 2015. **73**: p. 204-212.
187. Qian, J., et al., *Ultrasound-Assisted Enzymatic Protein Hydrolysis in Food Processing: Mechanism and Parameters*. Foods, 2023. **12**(21): p. 4027.
188. Udenigwe, C.C. and R.E. Aluko, *Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits*. J Food Sci, 2012. **77**(1): p. R11-24.
189. Sarmadi, B.H. and A. Ismail, *Antioxidative peptides from food proteins: a review*. Peptides, 2010. **31**(10): p. 1949-56.
190. Pessione, E. and S. Cirrincione, *Bioactive Molecules Released in Food by Lactic Acid Bacteria: Encrypted Peptides and Biogenic Amines*. Front Microbiol, 2016. **7**: p. 876.
191. Nongonierma, A.B. and R.J. FitzGerald, *The scientific evidence for the role of milk protein-derived bioactive peptides in humans: A Review*. Journal of Functional Foods, 2015. **17**: p. 640-656.
192. Wouters, A.G.B., et al., *Relevance of the Functional Properties of Enzymatic Plant Protein Hydrolysates in Food Systems*.

Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2016. **15**(4): p. 786-800.

193. Gómez-Guillén, M.C., et al., *Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review*. Food Hydrocolloids, 2011. **25**(8): p. 1813-1827.
194. Lafarga, T. and M. Hayes, *Bioactive protein hydrolysates in the functional food ingredient industry: Overcoming current challenges*. Food Reviews International, 2017. **33**(3): p. 217-246.
195. Gibson, G.R. and M.B. Roberfroid, *Handbook of prebiotics*. 2008, Boca Raton: CRC Press.
196. Gibson, G.R., et al., *Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017. **14**(8): p. 491-502.
197. Davani-Davari, D., et al., *Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications*. Foods, 2019. **8**(3).
198. Tzounis, X., et al., *Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study*. Am J Clin Nutr, 2011. **93**(1): p. 62-72.
199. Rajagopalan, G. and C. Krishnan, *Functional Oligosaccharides: Production and Action*. 2019. p. 155-180.
200. Buddington, R., *Using Probiotics and Prebiotics to Manage the Gastrointestinal Tract Ecosystem*, in *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*, D. Charalampopoulos and R.A. Rastall, Editors. 2009, Springer New York: New York, NY. p. 1-31.
201. Steed, H. and S. Macfarlane, *Mechanisms of Prebiotic Impact on Health*, in *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*, D. Charalampopoulos and R.A. Rastall, Editors. 2009, Springer New York: New York, NY. p. 135-161.
202. Gullón, P., et al., *Manufacture of Prebiotics from Biomass Sources*, in *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*, D. Charalampopoulos and R.A. Rastall, Editors. 2009, Springer New York: New York, NY. p. 535-589.

203. Rastall, R. and A. Hotchkiss, *Potential for the Development of Prebiotic Oligosaccharides from Biomass*. Oligosaccharides in Food and Agriculture, 2003. **849**: p. 44-53.
204. Zheng, J., et al., *A taxonomic note on the genus Lactobacillus: Description of 23 novel genera, emended description of the genus Lactobacillus Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2020. **70**(4): p. 2782-2858.
205. Jain, I., V. Kumar, and T. Satyanarayana, *Xylooligosaccharides: an economical prebiotic from agroresidues and their health benefits*. Indian J Exp Biol, 2015. **53**(3): p. 131-42.
206. Singh, R., J. Banerjee, and A. Arora, *Prebiotic potential of oligosaccharides: A focus on xylan derived oligosaccharides*. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2015. **5**: p. 19-30.
207. Akpınar, O., et al., *Enzymatic processing and antioxidant activity of agricultural waste autohydrolysis liquors (Tarımsal atık otohidroliz likörlerinin enzimatik işlenmesi ve antioksidan aktivitesi)*. Bioresources, 2010. **5**.
208. Mäkeläinen, H., M. Juntunen, and O. Hasselwander, *Prebiotic Potential of Xylo-Oligosaccharides*, in *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*, D. Charalampopoulos and R.A. Rastall, Editors. 2009, Springer New York: New York, NY. p. 245-258.
209. Gullón, B., et al., *Pectic oligosaccharides: Manufacture and functional properties*. Trends in Food Science & Technology, 2013. **30**(2): p. 153-161.
210. Míguez Alonso, B., et al., *Pectic Oligosaccharides and Other Emerging Prebiotics*. 2016.
211. Zeng, M., et al., *Prebiotic Oligosaccharides in Skin Health: Benefits, Mechanisms, and Cosmetic Applications*. Antioxidants (Basel), 2025. **14**(6).
212. Tang, W., et al., *Pectic oligosaccharides: enzymatic preparation, structure, bioactivities and application*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2025. **65**(11): p. 2117-2133.
213. Kargarzadeh, H., et al., *Effects of hydrolysis conditions on the morphology, crystallinity, and thermal stability of cellulose*

*nanocrystals extracted from kenaf bast fibers*. Cellulose, 2012. **19**(3): p. 855-866.

214. Zhao, H. and N.D. Heindel, *Determination of Degree of Substitution of Formyl Groups in Polyaldehyde Dextran by the Hydroxylamine Hydrochloride Method*. Pharmaceutical Research, 1991. **8**(3): p. 400-402.
215. Hakulinen, N., et al., *Three-dimensional structures of thermophilic beta-1,4-xylanases from Chaetomium thermophilum and Nonomuraea flexuosa. Comparison of twelve xylanases in relation to their thermal stability*. Eur J Biochem, 2003. **270**(7): p. 1399-412.
216. Cho, S.W., S. Lee, and W. Shin, *The X-ray structure of Aspergillus aculeatus polygalacturonase and a modeled structure of the polygalacturonase-octagalacturonate complex*. J Mol Biol, 2001. **311**(4): p. 863-78.
217. Neidhart, D.J. and G.A. Petsko, *The refined crystal structure of subtilisin Carlsberg at 2.5 Å resolution*. Protein Eng, 1988. **2**(4): p. 271-6.
218. Meng, E.C., et al., *UCSF ChimeraX: Tools for structure building and analysis*. Protein Sci, 2023. **32**(11): p. e4792.
219. Barbosa, O., et al., *Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization*. RSC Adv., 2014. **4**(4): p. 1583-1600.
220. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
221. Miller, G.L., *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar*. Analytical Chemistry, 2002. **31**(3): p. 426-428.
222. Charney, J. and R.M. Tomarelli, *A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice*. J Biol Chem, 1947. **171**(2): p. 501-5.
223. Iversen, S.L. and M.H. Jørgensen, *Azocasein assay for alkaline protease in complex fermentation broth*. Biotechnology Techniques, 1995. **9**(8): p. 573-576.
224. Singh, L.R., M.Y. Bhat, and T.A. Dar, *Casein Proteins: Structural and Functional Aspects*, in *Milk Proteins - From Structure to Biological*

*Properties and Health Aspects*, I. Gigli, Editor. 2016, IntechOpen: London.

225. Holt, C. and C.G. De Kruif, *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins*. 2003. p. 233-276.
226. Ratnayake, S., P. Selvarkumar, and K. Hayashi, *A putative proline iminopeptidase of Thermotoga maritima is a leucine aminopeptidase with lysine-p-nitroanilide hydrolyzing activity*. Enzyme and Microbial Technology, 2003. **32**(3): p. 414-421.
227. Erlanger, B.F., N. Kokowsky, and W. Cohen, *The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1961. **95**(2): p. 271-278.
228. Banjanac, K., *Imobilizacija enzima na nanočestice SiO<sub>2</sub> modifikovane organosilanima*. 2017, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet. p. 242
229. Adler-Nissen, J., *Enzymic hydrolysis of food proteins*. 1986.
230. Honda, S., et al., *High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives*. Anal Biochem, 1989. **180**(2): p. 351-7.
231. Moore, S. and W.H. Stein, *A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds*. J Biol Chem, 1954. **211**(2): p. 907-13.
232. Doi, E., D. Shibata, and T. Matoba, *Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay*. Anal Biochem, 1981. **118**(1): p. 173-84.
233. Huebner, J., R.L. Wehling, and R.W. Hutkins, *Functional activity of commercial prebiotics*. International Dairy Journal, 2007. **17**(7): p. 770-775.
234. Veljković, M.B., *Enzimski sinteza i membransko prečišćavanje frukto-oligosaharida*, in *Faculty of Technology and Metallurgy*. 2025, University of Belgrade: Belgrade, Serbia.
235. Yu, Y., et al., *Preparation and characterization of dialdehyde cellulose nanocrystals from the waste nutshell*. Environment, Development and Sustainability, 2023. **27**: p. 10789-10805.

236. Verma, V., et al., *2, 3-Dihydrazone cellulose: Prospective material for tissue engineering scaffolds*. Materials Science and Engineering: C, 2008. **28**: p. 1441-1447.
237. Kim, U.-J., et al., *Periodate Oxidation of Crystalline Cellulose*. Biomacromolecules, 2000. **1**(3): p. 488-492.
238. Calvini, P., et al., *FTIR and WAXS analysis of periodate oxycellulose: Evidence for a cluster mechanism of oxidation*. Vibrational Spectroscopy, 2006. **40**: p. 177-183.
239. Nypelö, T., et al., *Review: Periodate oxidation of wood polysaccharides—Modulation of hierarchies*. Carbohydrate Polymers, 2021. **252**: p. 117105.
240. Sun, X. and F. Jiang, *Periodate oxidation-mediated nanocelluloses: Preparation, functionalization, structural design, and applications*. Carbohydrate Polymers, 2024. **341**: p. 122305.
241. Kono, H., et al., *Nanofibrillated Bacterial Cellulose Modified with (3-Aminopropyl)trimethoxysilane under Aqueous Conditions: Applications to Poly(methyl methacrylate) Fiber-Reinforced Nanocomposites*. ACS Omega, 2020. **5**(45): p. 29561-29569.
242. Robles, E., L. Csóka, and J. Labidi *Effect of Reaction Conditions on the Surface Modification of Cellulose Nanofibrils with Aminopropyl Triethoxysilane*. Coatings, 2018. **8**, 139 DOI: 10.3390/coatings8040139.
243. Chen, D. and T. van de Ven, *Morphological changes of sterically stabilized nanocrystalline cellulose after periodate oxidation*. Cellulose, 2016. **23**.
244. Posada, P., et al., *Drying and redispersion of plant cellulose nanofibers for industrial applications: a review*. Cellulose, 2020. **27**(18): p. 10649-10670.
245. Beck, S., J. Bouchard, and R. Berry, *Dispersibility in Water of Dried Nanocrystalline Cellulose*. Biomacromolecules, 2012. **13**(5): p. 1486-1494.
246. Habibi, Y., L.A. Lucia, and O.J. Rojas, *Cellulose Nanocrystals: Chemistry, Self-Assembly, and Applications*. Chemical Reviews, 2010. **110**(6): p. 3479-3500.

247. Boluk, Y. and C. Danumah, *Analysis of cellulose nanocrystal rod lengths by dynamic light scattering and electron microscopy*. Journal of Nanoparticle Research, 2014. **16**.
248. Moon, R.J., et al., *Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites*. Chemical Society Reviews, 2011. **40**(7): p. 3941.
249. Dufresne, A., *Nanocellulose: from nature to high performance tailored materials*. De Gruyter. Nanocellulose, 2012.
250. Restiawaty, E., et al., *Preparation, Characterization, and Surface Modification of Cellulose Nanocrystal from Lignocellulosic Biomass for Immobilized Lipase*. Fibers, 2022. **10**(4): p. 33.
251. Solhi, L., et al., *Understanding Nanocellulose–Water Interactions: Turning a Detriment into an Asset*. Chemical Reviews, 2023. **123**(5): p. 1925-2015.
252. Bruel, C., et al., *The apparent structural hydrophobicity of cellulose nanocrystals*. J-FOR The Journal of Science and Technology for Forest Products and Processes, 2018. **7**(4): p. 13-23.
253. Gennari, A., et al., *Immobilization of  $\beta$ -Galactosidases on Magnetic Nanocellulose: Textural, Morphological, Magnetic, and Catalytic Properties*. Biomacromolecules, 2019. **20**(6): p. 2315-2326.
254. Jin, L., et al., *Amino-functionalized nanocrystalline cellulose as an adsorbent for anionic dyes*. Cellulose, 2015. **22**(4): p. 2443-2456.
255. Ludovici, F., R. Hartmann, and H. Liimatainen, *Aqueous bifunctionalization of cellulose nanocrystals through amino and alkyl silylation: functionalization, characterization, and performance of nanocrystals in quartz microflotation*. Cellulose, 2023. **30**(2): p. 775-787.
256. Hartvig, R.A., et al., *Protein Adsorption at Charged Surfaces: The Role of Electrostatic Interactions and Interfacial Charge Regulation*. Langmuir, 2011. **27**(6): p. 2634-2643.
257. Rabe, M., D. Verdes, and S. Seeger, *Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces*. Adv Colloid Interface Sci, 2011. **162**(1-2): p. 87-106.

258. Nikolic, T., et al., *Sodium periodate oxidized cotton yarn as carrier for immobilization of trypsin*. Carbohydrate Polymers, 2010. **82**(3): p. 976-981.
259. Xing, X., et al., *Immobilization of laccases onto cellulose nanocrystals derived from waste newspaper: relationship between immobilized laccase activity and dialdehyde content*. Cellulose, 2021. **28**(8): p. 4793-4805.
260. Qiao, W., et al., *Bacterial laccase immobilized on a magnetic dialdehyde cellulose without cross-linking agents for decolorization*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2022. **632**: p. 127818.
261. Lv, M., et al., *Immobilization of urease onto cellulose spheres for the selective removal of urea*. Cellulose, 2018. **25**(1): p. 233-243.
262. Rodrigues, R.C., et al., *Stabilization of enzymes via immobilization: Multipoint covalent attachment and other stabilization strategies*. Biotechnology Advances, 2021. **52**: p. 107821.
263. Das, J. and H.N. Mishra, *Electrochemical biosensor for monitoring fish spoilage based on nanocellulose as enzyme immobilization matrix*. Journal of Food Measurement and Characterization, 2023. **17**(4): p. 3827-3844.
264. Liu, Y. and J.Y. Chen, *Enzyme immobilization on cellulose matrixes*. Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 2016. **31**(6): p. 553-567.
265. Zorn, H., et al., *Safety evaluation of the food enzyme endo-1,4- $\beta$ -xylanase from the non-genetically modified Trichoderma citrinoviride strain X31*. EFSA Journal, 2025. **23**(6): p. e9482.
266. He, J., et al., *Design, expression and functional characterization of a thermostable xylanase from Trichoderma reesei*. PLOS ONE, 2019. **14**(1): p. e0210548.
267. Enzymes, A. *ROHALASE® SEP-VISCO Enzyme*. 2026 February 11, 2026]; Available from: <https://www.abenzymes.com/en/your-industry/grain-and-oilseed-processing/viscosity-reduction/rohalase-sep-visco/>.
268. Enzymes, A., *A Petition to Amend the Australia New Zealand Food Standards Code with a Xylanase Enzyme Preparation produced by*

*Trichoderma reesei*. 2017., AB Enzymes GmbH, Feldbergstrasse 78, D-64293 Darmstadt.

269. Grimsley, G.R., J.M. Scholtz, and C.N. Pace, *A summary of the measured pK values of the ionizable groups in folded proteins*. Protein Sci, 2009. **18**(1): p. 247-51.
270. Bolivar, J.M., I. Eisl, and B. Nidetzky, *Advanced characterization of immobilized enzymes as heterogeneous biocatalysts*. Catalysis Today, 2016. **259**: p. 66-80.
271. Secundo, F., *Conformational changes of enzymes upon immobilisation*. Chemical Society Reviews, 2013. **42**(15): p. 6250-6261.
272. Coutinho, T.C., P.W. Tardioli, and C.S. Farinas, *Hydroxyapatite nanoparticles modified with metal ions for xylanase immobilization*. International Journal of Biological Macromolecules, 2020. **150**: p. 344-353.
273. Rodrigues, R.C., et al., *Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization*. Chemical Society Reviews, 2013. **42**(15): p. 6290-6307.
274. Jesionowski, T., J. Zdarta, and B. Krajewska, *Enzyme immobilization by adsorption: A review*. Adsorption, 2014. **20**.
275. Landarani-Isfahani, A., et al., *Xylanase Immobilized on Novel Multifunctional Hyperbranched Polyglycerol-Grafted Magnetic Nanoparticles: An Efficient and Robust Biocatalyst*. Langmuir, 2015. **31**(33): p. 9219-9227.
276. Soozanipour, A., A. Taheri-Kafrani, and A. Landarani Isfahani, *Covalent attachment of xylanase on functionalized magnetic nanoparticles and determination of its activity and stability*. Chemical Engineering Journal, 2015. **270**: p. 235-243.
277. Norde, W. and J. Lyklema, *Why proteins prefer interfaces*. J Biomater Sci Polym Ed, 1991. **2**(3): p. 183-202.
278. Ariaeenejad, S., et al., *An efficient nano-biocatalyst for lignocellulosic biomass hydrolysis: Xylanase immobilization on organically modified biogenic mesoporous silica nanoparticles*. International Journal of Biological Macromolecules, 2020. **164**: p. 3462-3473.

279. Fears, K.P. and R.A. Latour, *Assessing the Influence of Adsorbed-State Conformation on the Bioactivity of Adsorbed Enzyme Layers*. Langmuir, 2009. **25**(24): p. 13926-13933.
280. Mehnati-Najafabadi, V., A. Taheri-Kafrani, and A.-K. Bordbar, *Xylanase immobilization on modified superparamagnetic graphene oxide nanocomposite: Effect of PEGylation on activity and stability*. International Journal of Biological Macromolecules, 2018. **107**: p. 418-425.
281. Mateo, C., et al., *Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports*. Nat Protoc, 2007. **2**(5): p. 1022-33.
282. Mateo, C., et al., *Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins*. Enzyme and Microbial Technology, 2006. **39**: p. 274-280.
283. Isobe, N., et al., *Immobilization of protein on cellulose hydrogel*. Cellulose, 2011. **18**(5): p. 1251-1256.
284. Migneault, I., et al., *Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking*. Biotechniques, 2004. **37**(5): p. 790-6, 798-802.
285. Bolivar, J.M., J.M. Woodley, and R. Fernandez-Lafuente, *Is enzyme immobilization a mature discipline? Some critical considerations to capitalize on the benefits of immobilization*. Chemical Society Reviews, 2022. **51**(15): p. 6251-6290.
286. Wahab, R., et al., *On the taught new tricks of enzymes immobilization: An all-inclusive overview*. Reactive and Functional Polymers, 2020. **152**: p. 104613.
287. Sheldon, R.A. and S. van Pelt, *Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how*. Chemical Society Reviews, 2013. **42**(15): p. 6223-6235.
288. Romo-Sánchez, S., et al., *Immobilization of Commercial Cellulase and Xylanase by Different Methods Using Two Polymeric Supports*. Advances in Bioscience and Biotechnology, 2014. **05**: p. 517-526.
289. Sigma-Aldrich. *Pectinase from Aspergillus aculeatus (P2611) Product Information*. 2026 May 14, 2026]; Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/SI/en/product/sigma/p2611>.

290. Novonesis. *Pectinex® Ultra SP-L: Product Data Sheet for Juice, Fruit and Vegetable Processing*. 2026 May 14, 2026]; Available from: <https://www.novonesis.com/en/biosolutions/food-and-beverages/beverages/juice-fruit-vegetables/vegetables/pectinex-ultra-sp-l>.
291. van Pouderoyen, G., et al., *Structural insights into the processivity of endopolygalacturonase I from Aspergillus niger*. FEBS Lett, 2003. **554**(3): p. 462-6.
292. Nagai, M., et al., *Purification and characterization of an endopolygalacturonase. From Aspergillus awamori*. Biosci Biotechnol Biochem, 2000. **64**(8): p. 1729-32.
293. Contreras Esquivel, J.C. and C.E. Voget, *Purification and partial characterization of an acidic polygalacturonase from Aspergillus kawachii*. J Biotechnol, 2004. **110**(1): p. 21-8.
294. Fratebianchi, D., I.A. Cavello, and S.F. Cavalitto, *Purification and Biochemical and Kinetic Properties of an Endo-Polygalacturonase from the Industrial Fungus Aspergillus sojae*. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2017. **27**(2): p. 102-109.
295. Gasteiger, E., et al., *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*, in *The Proteomics Protocols Handbook*, J.M. Walker, Editor. 2005, Humana Press: Totowa, NJ. p. 571-607.
296. Vroman, L. and A.L. Adams, *Findings with the recording ellipsometer suggesting rapid exchange of specific plasma proteins at liquid/solid interfaces*. Surface Science, 1969. **16**: p. 438-446.
297. Slack, S.M. and T.A. Horbett, *Changes in fibrinogen adsorbed to segmented polyurethanes and hydroxyethylmethacrylate-ethylmethacrylate copolymers*. J Biomed Mater Res, 1992. **26**(12): p. 1633-49.
298. Bhat, M.K., *Cellulases and related enzymes in biotechnology*. Biotechnol Adv, 2000. **18**(5): p. 355-83.
299. Mateo, C., et al., *Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins*. Enzyme and Microbial Technology, 2005. **37**(4): p. 456-462.

300. Mateo, C., et al., *Epoxy-amino groups: a new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method*. Biomacromolecules, 2003. **4**(3): p. 772-7.
301. Boudrant, J., J.M. Woodley, and R. Fernandez-Lafuente, *Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation*. Process Biochemistry, 2020. **90**: p. 66-80.
302. Combo, A.M.M., et al., *Enzymatic production of pectic oligosaccharides from polygalacturonic acid with commercial pectinase preparations*. Food and Bioproducts Processing, 2012. **90**(3): p. 588-596.
303. Bolivar, J., J. Wiesbauer, and B. Nidetzky, *Biotransformations in microstructured reactors: More than flowing with the stream?* Trends in biotechnology, 2011. **29**: p. 333-42.
304. Mateo, C., et al., *Improvement of enzyme properties with a two-step immobilization process on novel heterofunctional supports*. Biomacromolecules, 2010. **11**(11): p. 3112-7.
305. Hirsh, S.L., et al., *The Vroman effect: competitive protein exchange with dynamic multilayer protein aggregates*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2013. **103**: p. 395-404.
306. Noh, H. and E.A. Vogler, *Volumetric interpretation of protein adsorption: competition from mixtures and the Vroman effect*. Biomaterials, 2007. **28**(3): p. 405-22.
307. Li, T., et al., *Optimization of covalent immobilization of pectinase on sodium alginate support*. Biotechnol Lett, 2007. **29**(9): p. 1413-6.
308. Alagöz, D., S.S. Tükel, and D. Yildirim, *Immobilization of pectinase on silica-based supports: Impacts of particle size and spacer arm on the activity*. International Journal of Biological Macromolecules, 2016. **87**: p. 426-432.
309. Rawlings, N.D., et al., *The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database*. Nucleic Acids Res, 2018. **46**(D1): p. D624-d632.
310. Razzaq, A., et al., *Microbial Proteases Applications*. Front Bioeng Biotechnol, 2019. **7**: p. 110.

311. Tacias-Pascacio, V.G., et al., *Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: A review*. Int J Biol Macromol, 2020. **165**(Pt B): p. 2143-2196.
312. Mao, Y., et al., *Synergistic Hydrolysis of Soy Proteins Using Immobilized Proteases: Assessing Peptide Profiles*. Foods, 2023. **12**(22).
313. Merz, M., et al., *Flavourzyme, an Enzyme Preparation with Industrial Relevance: Automated Nine-Step Purification and Partial Characterization of Eight Enzymes*. J Agric Food Chem, 2015. **63**(23): p. 5682-93.
314. Rao, M.B., et al., *Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(3): p. 597-635.
315. Sánchez-Milla, M., et al., *Immobilization of Alcalase on Silica Supports Modified with Carbosilane and PAMAM Dendrimers*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(24).
316. Hussain, F., et al. *Further Stabilization of Alcalase Immobilized on Glyoxyl Supports: Amination Plus Modification with Glutaraldehyde*. Molecules, 2018. **23**, 3188 DOI: 10.3390/molecules23123188.
317. Tardioli, P.W., et al., *Hydrolysis of Proteins by Immobilized-Stabilized Alcalase-Glyoxyl Agarose*. Biotechnology Progress, 2003. **19**(2): p. 352-360.
318. Yust, M.d.M., et al., *Improvement of functional properties of chickpea proteins by hydrolysis with immobilised Alcalase*. Food Chemistry, 2010. **122**(4): p. 1212-1217.
319. Žuža, M.G., et al., *Design and characterization of alcalase–chitosan conjugates as potential biocatalysts*. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2017. **40**(11): p. 1713-1723.
320. Jonović, M., et al. *Immobilized Alcalase on Micron- and Submicron-Sized Alginate Beads as a Potential Biocatalyst for Hydrolysis of Food Proteins*. Catalysts, 2021. **11**, 305 DOI: 10.3390/catal11030305.
321. Wang, S.-n., et al., *Immobilized alcalase alkaline protease on the magnetic chitosan nanoparticles used for soy protein isolate hydrolysis*. European Food Research and Technology, 2014. **239**(6): p. 1051-1059.

322. Li, A., et al., *Development of Alcalase-Polyacrylonitrile Nanofibrous Biocatalytic Membranes for Protein Hydrolysis*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2024. **63**(39): p. 16662-16671.
323. Fernandez-Lopez, L., et al., *Effect of protein load on stability of immobilized enzymes*. Enzyme Microb Technol, 2017. **98**: p. 18-25.
324. Khan, H., et al., *Enhanced Stability and Reusability of Subtilisin Carlsberg Through Immobilization on Magnetic Nanoparticles*. Nanotechnology, Science and Applications, 2025. **18**(null): p. 71-91.
325. Teng, C., et al., *Production of xylooligosaccharides from the steam explosion liquor of corncobs coupled with enzymatic hydrolysis using a thermostable xylanase*. Bioresource Technology, 2010. **101**(19): p. 7679-7682.
326. Milessi, T.S.S., et al., *Immobilization and stabilization of an endoxylanase from Bacillus subtilis (XynA) for xylooligosaccharides (XOs) production*. Catalysis Today, 2016. **259**: p. 130-139.
327. Gui, Y., et al., *Multi-point immobilization of GH 11 endo- $\beta$ -1,4-xylanase on magnetic MOF composites for higher yield of xylooligosaccharides*. International Journal of Biological Macromolecules, 2024. **260**: p. 129277.
328. Bian, J., et al., *Structural features and antioxidant activity of xylooligosaccharides enzymatically produced from sugarcane bagasse*. Bioresource Technology, 2013. **127**: p. 236-241.
329. Brenelli, L.B., et al., *An integrated approach to obtain xylooligosaccharides from sugarcane straw: From lab to pilot scale*. Bioresource Technology, 2020. **313**: p. 123637.
330. Qin, L., et al. *Production of Xylooligosaccharides from Jiuzao by Autohydrolysis Coupled with Enzymatic Hydrolysis Using a Thermostable Xylanase*. Foods, 2022. **11**, DOI: 10.3390/foods11172663.
331. Gracida, J., et al., *Improved Thermal and Reusability Properties of Xylanase by Genipin Cross-Linking to Magnetic Chitosan Particles*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2019. **188**(2): p. 395-409.
332. Kapoor, M. and R.C. Kuhad, *Immobilization of Xylanase from Bacillus pumilus Strain MK001 and its Application in Production of*

*Xylo-oligosaccharides*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2007. **142**(2): p. 125-138.

333. Falck, P., et al., *Xylooligosaccharides from hardwood and cereal xylans produced by a thermostable xylanase as carbon sources for Lactobacillus brevis and Bifidobacterium adolescentis*. J Agric Food Chem, 2013. **61**(30): p. 7333-40.
334. Aachary, A.A. and S.G. Prapulla, *Xylooligosaccharides (XOS) as an Emerging Prebiotic: Microbial Synthesis, Utilization, Structural Characterization, Bioactive Properties, and Applications*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2011. **10**(1): p. 2-16.
335. Pustjens, A.M., et al., *Characterisation of cell wall polysaccharides from rapeseed (Brassica napus) meal*. Carbohydrate Polymers, 2013. **98**(2): p. 1650-1656.
336. Voragen, A.G.J., et al., *Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls*. Structural Chemistry, 2009. **20**(2): p. 263-275.
337. Yapo, B.M., et al., *Pectins from citrus peel cell walls contain homogalacturonans homogenous with respect to molar mass, rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II*. Carbohydrate Polymers, 2007. **69**(3): p. 426-435.
338. Müller-Maatsch, J., et al., *Pectin content and composition from different food waste streams*. Food Chemistry, 2016. **201**: p. 37-45.
339. Daas, P.J.H., et al., *Investigation of the non-esterified galacturonic acid distribution in pectin with endopolygalacturonase*. Carbohydrate Research, 1999. **318**(1): p. 135-145.
340. van Santen, Y., et al., *1.68-Å Crystal Structure of Endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and Identification of Active Site Residues by Site-directed Mutagenesis \**. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(43): p. 30474-30480.
341. Braccini, I. and S. Pérez, *Molecular Basis of Ca<sup>2+</sup>-Induced Gelation in Alginates and Pectins: The Egg-Box Model Revisited*. Biomacromolecules, 2001. **2**(4): p. 1089-1096.
342. Cao, L., et al., *Egg-box model-based gelation of alginate and pectin: A review*. Carbohydrate Polymers, 2020. **242**: p. 116389.

343. Abdel Wahab, W.A., et al., *Optimization of pectinase immobilization on grafted alginate-agar gel beads by 24 full factorial CCD and thermodynamic profiling for evaluating of operational covalent immobilization*. International Journal of Biological Macromolecules, 2018. **113**: p. 159-170.
344. Salleh, N., et al., *Characterization of Anthocyanin-Bound Pectin-Rich Fraction Extracted from New Zealand Blackcurrant (*Ribes nigrum*) Juice*. ACS Food Science & Technology, 2021. **1**(6): p. 1130-1142.
345. Landbo, A.K. and A.S. Meyer, *Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenols from black currant juice press residues (*Ribes nigrum*)*. J Agric Food Chem, 2001. **49**(7): p. 3169-77.
346. Laaksonen, O., et al., *The effect of enzymatic treatment on blackcurrant (*Ribes nigrum*) juice flavour and its stability*. Food Chemistry, 2012. **130**(1): p. 31-41.
347. Cortez, R.E. and E. Gonzalez de Mejia, *Blackcurrants (*Ribes nigrum*): A Review on Chemistry, Processing, and Health Benefits*. Journal of Food Science, 2019. **84**(9): p. 2387-2401.
348. Kairè, A., et al. *Influence of Enzymatic Hydrolysis on Composition and Technological Properties of Black Currant (*Ribes nigrum*) Pomace*. Applied Sciences, 2025. **15**, 6207 DOI: 10.3390/app15116207.
349. Sojitra, U.V., S.S. Nadar, and V.K. Rathod, *Immobilization of pectinase onto chitosan magnetic nanoparticles by macromolecular cross-linker*. Carbohydrate Polymers, 2017. **157**: p. 677-685.
350. Navarro-López, D.E., et al., *Nanocatalytic performance of pectinase immobilized over in situ prepared magnetic nanoparticles*. Heliyon, 2023. **9**(8).
351. Vaz, R.P., et al., *Immobilization studies of a pectinase produced by *Aspergillus terreus**. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2021. **68**(1): p. 197-208.
352. Olano-Martin, E., et al., *Pectins and pectic-oligosaccharides inhibit *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin as directed towards the human colonic cell line HT29*. FEMS Microbiol Lett, 2003. **218**(1): p. 101-5.
353. Garcia-Galan, C., et al., *Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance*. Advanced Synthesis & Catalysis, 2011. **353**(16): p. 2885-2904.

354. Gómez, B., et al., *Purification, Characterization, and Prebiotic Properties of Pectic Oligosaccharides from Orange Peel Wastes*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014. **62**(40): p. 9769-9782.
355. Wilkowska, A., et al. *The Molecular Weight of Enzymatically Modified Pectic Oligosaccharides from Apple Pomace as a Determinant for Biological and Prebiotic Activity*. Molecules, 2025. **30**, 46 DOI: 10.3390/molecules30010046.
356. Taha, F., et al., *Antioxidant and antimicrobial activities of enzymatic hydrolysis products from sunflower protein isolate*. World Applied Sciences Journal, 2013. **21**: p. 651-658.
357. Taha, F., et al., *Biological activities of sunflower protein hydrolysate*. World Applied Sciences Journal, 2014. **30**: p. 1462-1470.
358. Rezvankhah, A., et al., *Generation of bioactive peptides from lentil protein: degree of hydrolysis, antioxidant activity, phenol content, ACE-inhibitory activity, molecular weight, sensory, and functional properties*. Journal of Food Measurement and Characterization, 2021. **15**(6): p. 5021-5035.
359. Karami, Z., et al., *Comparative study on structural, biological and functional activities of hydrolysates from Adzuki bean (*Vigna angularis*) and mung bean (*Vigna radiata*) protein concentrates using Alcalase and Flavourzyme*. Food Research International, 2022. **161**: p. 111797.
360. Mateo, C., et al., *Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques*. Enzyme and Microbial Technology, 2007. **40**(6): p. 1451-1463.
361. Villanueva, A., et al., *Production of an extensive sunflower protein hydrolysate by sequential hydrolysis with endo-and exo-proteases*. 1999.
362. Villanueva, A., et al., *Peptide characteristics of sunflower protein hydrolysates*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1999. **76**(12): p. 1455-1460.
363. Ren, J., et al., *Effect of Hydrolysis Degree on Structural and Interfacial Properties of Sunflower Protein Isolates*. Journal of Food Processing and Preservation, 2017. **41**(1).

364. González-Pérez, S., *12 - Sunflower Proteins*, in *Sunflower*, E. Martínez-Force, N.T. Dunford, and J.J. Salas, Editors. 2015, AOCS Press. p. 331-393.
365. Ugolini, L., et al., *Production of an enzymatic protein hydrolyzate from defatted sunflower seed meal for potential application as a plant biostimulant*. Industrial Crops and Products, 2015. **75**: p. 15-23.
366. González-Pérez, S. and J.M. Vereijken, *Sunflower proteins: overview of their physicochemical, structural and functional properties*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2007. **87**(12): p. 2173-2191.
367. Eric, K., et al., *Temperature and cysteine addition effect on formation of sunflower hydrolysate Maillard reaction products and corresponding influence on sensory characteristics assessed by partial least square regression*. Food Research International, 2014. **57**: p. 242-258.
368. Bao, X., et al., *Sensory and structural characterization of umami peptides derived from sunflower seed*. CyTA - Journal of Food, 2020. **18**(1): p. 485-492.
369. Bilal, M., et al., *Proteases immobilized on nanomaterials for biocatalytic, environmental and biomedical applications: Advantages and drawbacks*. Biotechnol Adv, 2024. **70**: p. 108304.
370. Liese, A. and L. Hilterhaus, *Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications*. Chemical Society Reviews, 2013. **42**(15): p. 6236-6249.

## Biografija autora

Katarina Katić, master inženjer tehnologije, rođena je 17. oktobra 1994. godine u Beogradu, gde je završila Osnovnu školu „Vladislav Ribnikar“. Školovanje je nastavila u Medicinskoj školi na Zvezdari, gde je sa odličnim uspehom završila smer za laboratorijskog tehničara. Osnovne akademske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je 2013. godine na studijskom programu Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija i diplomirala u avgustu 2017. godine sa prosečnom ocenom 8,65. Master akademske studije na istom fakultetu upisala je 2017. godine na studijskom programu Biohemijsko inženjerstvo i završila u avgustu 2018. godine sa prosečnom ocenom 9,38, stekavši zvanje master inženjer tehnologije. Doktorske akademske studije na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju upisala je školske 2018/2019. godine, pod mentorstvom prof. dr Dejana Bezbradice, i položila sve ispite sa prosečnom ocenom 9,82. U zvanje istraživač-pripravnik izabrana je 2019. godine. Od novembra 2018. do jula 2021. godine bila je zaposlena u Institutu za higijenu i tehnologiju mesa kao istraživač-pripravnik. Od jula 2021. do 2026. godine radila je u razvojno-inovacionoj firmi „Bio-ReCell“ u Ljubljani (Slovenija) kao razvojni istraživač, a od aprila 2026. godine zaposlena je na Institutu za fiziku u Beogradu, kao menadžer za intelektualnu svojinu, na projektu programa Horizont Evropa.

Koautor je jednog rada u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), dva rada u istaknutom međunarodnom časopisu (M22), jednog poglavlja u međunarodnoj monografiji (M14), jednog rada u nacionalnom časopisu međunarodnog značaja (M24), jednog saopštenja sa međunarodnog skupa štampanog u celini (M33) i jednog saopštenja sa međunarodne konferencije štampanog u sažetku (M34). Takođe je koautor jednog priznatog međunarodnog patenta (WO2023209175A1, priznat u SAD pod brojem US12624338B2) i jedne međunarodne patentne prijave (WO2025083206A1). Ukupan broj citata naučnih radova iznosi 16, a Hiršov indeks je  $h = 3$ .

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Катарина Катић \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ 4024/2018 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Развој имобилисаних биокатализатора са наноцелулозним носачима за примену у валоризацији нуспроизвода индустрије хране

- 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, 18.08.2026 \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

# Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Катарина Катић

Број индекса 4024/2018

Студијски програм Биохемијско инжењерство и биотехнологија

Наслов рада Развој имобилисаних биокатализатора са наноцелулозним носачима за примену у валоризацији нуспроизвода индустрије хране

Ментор проф. др Дејан Безбрадица и др Катарина Бањанац

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, 18.08.2026

\_\_\_\_\_

## Изјава о коришћењу

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

Развој имобилисаних биокатализатора са наноцелулозним носачима за примену у валоризацији нуспроизвода индустрије хране

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, 18.08.2026

\_\_\_\_\_

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

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

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

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

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

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

## ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације **„Развој имобилисаних биокатализатора са наноцелулозним носачима за примену у валоризацији нуспроизвода индустрије хране“**, аутора **Катарине Катић**, мастер инж. технологије, констатујемо да утврђено подударање текста износи **11%**. Овај степен подударности претежно је последица употребљених личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, детаљног описа примењених аналитичких техника, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из њене дисертације што је у складу са чланом 9. Правилника.

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

05.09.2026. године

Ментори

---

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

---

Др Катарина Бањанац, виши научни сарадник  
Универзитет у Београду, Иновациони Центар  
Технолошко-металуршког факултета