

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET



Branka D. Lončarević

**Optimizacija produkcije levana bakterije
Bacillus licheniformis i primena u sintezi
kopolimera**

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY



Branka D. Lončarević

**Optimization of levan production from
bacterium *Bacillus licheniformis* and its
application in copolymer synthesis**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

Mentor:

dr Vladimir P. Beškoski, vanredni profesor
Hemijski fakultet
Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

dr Vladimir P. Beškoski, vanredni profesor
Hemijski fakultet
Univerzitet u Beogradu

dr Aleksandar Popović, redovni profesor
Hemijski fakultet
Univerzitet u Beogradu

dr Gordana Gojgić-Cvijović, naučni savetnik
IHTM-Centar za hemiju
Univerzitet u Beogradu

dr Dragica Jakovljević, naučni savetnik
IHTM-Centar za hemiju
Univerzitet u Beogradu

dr Vladimir Nikolić, naučni saradnik
Inovacioni centar Hemijskog fakulteta
Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: 01.07.2019. godine

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je urađena u laboratorijama Grupe za mikrobiološku hemiju i biotehnologiju Katedre za biohemiju Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i Centra za hemiju Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju (IHTM-a), Univerziteta u Beogradu.

Veoma sam zahvalna mentoru, dr Vladimiru Beškoskom, vanrednom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na korisnim sugestijama i velikoj pomoći pri izradi i pisanju ovog rada, kao i na podršci tokom svih godina saradnje. Posebno sam zahvalna dr Gordani Gojgić-Cvijović, naučnom savetniku IHTM-a, koja me je uvela u svet mikrobnih polisaharida, beskrajno strpljivo i velikodušno prenosila svoje znanja iz hemije i mikrobiologije, pomagala tokom izrade eksperimenata i savetovala pri pisanju ove teze. Neizmernu zahvalnost za stečena praktična znanja iz hemije polisaharida, kao i pomoć tokom svih faza izrade svog rada dugujem dr Dragici Jakovljević, naučnom savetniku IHTM-a. Zahvaljujem se dr Aleksandru Popoviću, redovnom profesoru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na vremenu koje je posvetio čitanju ove disertacije, kao i na korisnim savetima. Posebno se zahvaljujem se dr Vladimiru Nikoliću, naučnom saradniku Inovacionog centara Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu na prenesenom znanju iz hemije polimera i na velikodušnoj pomoći tokom izrade eksperimenata i pisanja ovog rada.

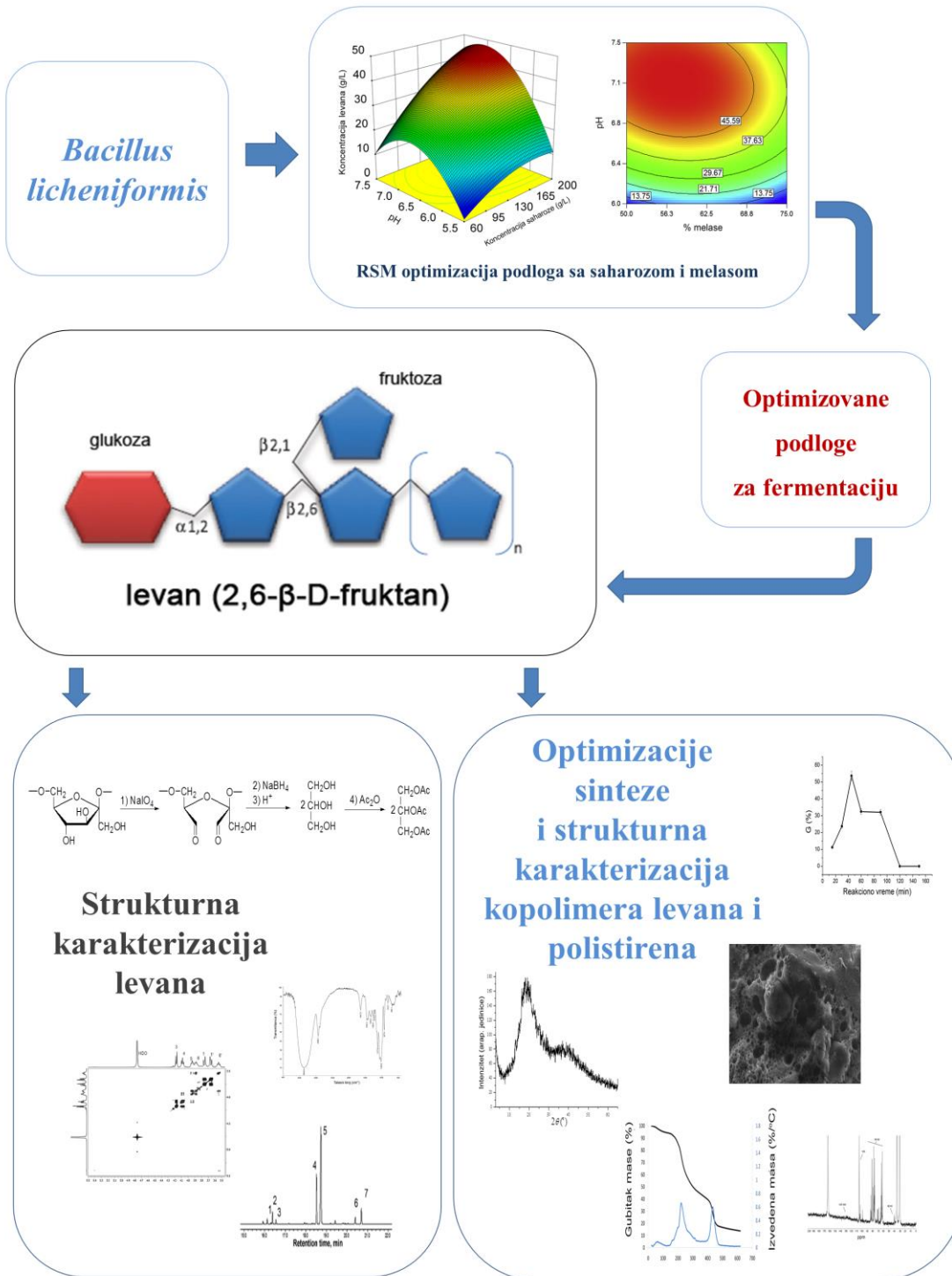
Veliku zahvalnost dugujem dr Miroslavu Vrvicu, profesoru u penziji Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu za višegodišnju podršku i saradnju. Svim kolegama iz Grupe za mikrobiološku hemiju i biotehnologiju sam izuzetno zahvalna, jer su ukazivali pomoć kad god je bila zatražena. Elementalne, NMR i FTIR spektralne analize urađene su na Odeljenju za instrumentalnu analizu Centra za hemiju IHTM-a, čijim saradnicima se takođe zahvaljujem, posebno dr Nini Todorović, naučnom savetniku IHTM-a. Posebno hvala dr Mariji Pergal, višem naučnom saradniku IHTM-a za eksperimente određivanja viskoziteta uzoraka levana. Određivanje molekulske mase rađeno je na Zernike institutu za napredne materijale u Holandiji, čijim sam saradnicama prof. dr Katji Loos i dr Jeleni Ćirić veoma zahvalna. Koleginici Mariji Lješević sa IHTM-a neizmerno sam zahvalna na dragocenoj pomoći tokom pisanja teze.

Zahvaljujem se Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja na trogodišnjem stipendiranju i uključivanju u naučnoistraživačke projekte, kao studenta doktorskih studija.

Svojim roditeljima, Biljani i Dušanu, suprugu Draganu i sestri Sanji dugujem zahvalnost za podršku i pomoć tokom školovanja.

Branka D. Lončarević

GRAFIČKI SAŽETAK



Optimizacija produkcije levana bakterije *Bacillus licheniformis* i primena u sintezi kopolimera

SAŽETAK

U okviru ove doktorske disertacije proučavan je uticaj različitih uslova fermentacije na produkciju levana bakterije *Bacillus licheniformis* NS032, ispitivana struktura dobijenog polisaharida i sintetisani kalemljeni kopolimeri levana i polistirena (Lev-g-PS).

U prvoj seriji eksperimenata optimizovane su podloge za produkciju levana tehnikom jedne promenljive u vremenu i metodom površine odgovora. Najviši prinosi polisaharida se dobijaju na temperaturi od 37 °C i bez mešanja. Upotrebom podloge sa 196,75 g/L saharoze, 2,44 g/L amonijum-hlorida i inicijalnog pH od 6,97 dobija se 47,84 g/L levana LS200, a na podlozi sa 397,65 g/L saharoze, 4,62 g/L amonijum-hlorida i inicijalnog pH od 7,31 dobija se 99,19 g/L levana LS400. U sledećim uslovima: 62,6 % melase, 4,66 g/L fosfata i inicijalnim pH od 7,2 dobija se 53,6 g/L levana LM.

Strukturna ispitivanja (kisela hidroliza, metilaciona analiza, FTIR, ¹³C- i ¹H-NMR, COSY, HSQC i HMBC) su pokazala da su dobijeni levani polifruktani sa β-(2,6)-glikozidnom vezom u osnovnom nizu i grananjem u položaju β-(2,1). Stepeni grananja su 11,04 ± 0,57 %, 11,99 ± 0,63 % 12,68 ± 0,71 % za levane LS200, LS400 i LM respektivno. Levani LS200 i LM relativno su visoke molekulske mase (opseg > 10⁶ Da) sa viskozitetima 0,25 dL/g i 0,24 dL/g, dok je levan LS400 niže molekulske mase (10⁵ Da) i viskoziteta 0,14 dL/g.

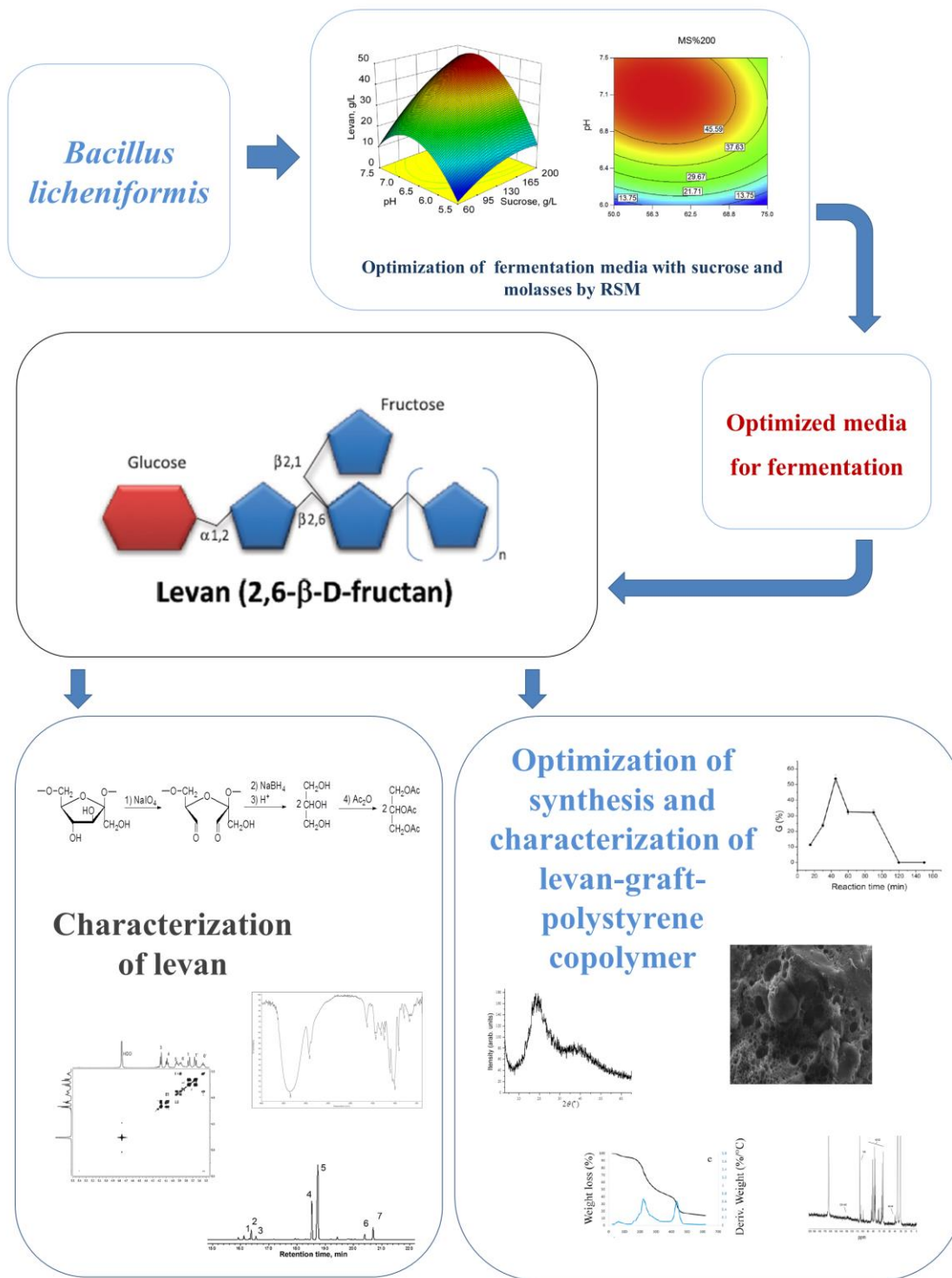
U poslednjoj seriji eksperimenata ispitivan je uticaj različitih reakcionih uslova na sintezu Lev-g-PS slobodnoradikalnim mehanizmom i upotrebom kalijum-persulfata kao inicijatora. Maksimalni G (%) = 58,1 dobijen je na 70 °C, u atmosferi azota i upotrebom aminoaktivatora DMEA. FTIR, SEM, TG/DTA, XRD i ¹³C NMR spektroskopija dobijenog kopolimera su pokazali da je došlo do reakcije kalemljenja između levana i polistirena.

Ključne reči: *Bacillus licheniformis*, levan, melasa, stiren, RSM, kalemljeni kopolimeri

Naučna oblast: Biohemija, Biotehnologija

Uža naučna oblast: Mikrobni polisaharidi

GRAPHICAL ABSTRACT



Optimization of levan production from bacterium *Bacillus licheniformis* and its application in copolymer synthesis

ABSTRACT

Within this doctoral dissertation, the effects of various fermentation factors on levan production by *Bacillus licheniformis* NS032 were studied, structure of obtained polysaccharide was investigated and grafted copolymers of levan and polystyrene (Lev-g-PS) were synthesized.

In the first series of experiments, media for levan production were optimized using one factor at a time and response surface methods. The highest levan yield was obtained at 37 °C and without agitation. Using the medium with 196.75 g/L sucrose, 2.44 g/L ammonium chloride and pH 6.97, obtained amount of LS200 levan was 47.84 g/L and in medium with 397.65 g/L sucrose, 4.62 g/L ammonium chloride and pH 7.31 amount of LS400 levan was 99.19 g/L. In the following conditions: 62.6 % molasses, 4.66 g/L phosphate and an initial pH 7.2, LM levan (53.6 g/L) was obtained.

Structural characterization (acid hydrolysis, methylation analysis, FTIR, ¹³C- and ¹H-NMR, COSY, HSQC i HMBC) showed that investigated levans are polyfructans with β-(2,6)- glycosidic linkages in backbone and branching through β-(2,1) positions. The extents of branching are 11.04 ± 0.57 %, 11.99 ± 0.63 % 12.68 ± 0.71 % for LS200, LS400 and LM levans, respectively. LS200 and LM have relatively high molecular weight (range > 10⁶ Da) and viscosity (0.25 dL/g and 0.24 dL/g), contrary to LS400 with lower molecular weight (10⁵ Da) and viscosity (0.14 dL/g).

Finally, influence of different reaction conditions on synthesis of Lev-g-PS by free radical mechanism and potassium persulfate as initiator was investigated. Maximum G (%) = 58.1 was obtained at 70 °C, in nitrogen atmosphere and using the amine activator DMEA. FTIR, SEM, TG/DTA, XRD and ¹³C NMR spectroscopy of copolymer showed that grafting reaction of levan and polystyrene was successful.

Keywords: *Bacillus licheniformis*, levan, molasses, styrene, RSM, grafted copolymers

Scientific field: Biochemistry, Biotechnology

Scientific subfield: Microbial polysaccharides

SPISAK SKRAĆENICA I SIMBOLA

\bar{M}_n – srednja brojna vrednost molekulske mase

\bar{M}_w – srednja masena vrednost molekulske mase

\bar{M}_z – srednja z-vrednost molekulske mase

% *melase* – procenat saharoze u melasi

ABC transporter – ATP vezujuća kasetna

ADP – adenzin-difosfat

AK – askorbinska kiselina

ANOVA – analiza varijanse

ATP – adenzin-trifosfat

COSY – korelisana spektroskopija („Correlated spectroscopy”)

dF – broj stepeni slobode

DMEA – dimetiletanolamin

EK – ekstrakt kvasca

EPS - egzopolisaharidi

F test – Fišerov test

FAD – flavin adenin dinukleotid

FADH₂ – redukovani FAD

FDA – uprava za hranu i lekove („Food and Drug Administration”)

FOS – fruktooligosaharidi

Fpol – FukoPol, fukan iz *Enterobacter* A47

FTIR – infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom

G (%) – stepen kalemljenja

GALT – limfoidno tkivo gastrointestinalnog sistema („Gut-associated lymphoid tissue”)

GC/MS – gasna hromatografija sa masenim detektorom

GDP – guanozin-difosfat

Gpol – galaktoPol, glikan iz *Pseudomonas oleovorans*

GRAS – generalno smatrane kao bezbedne („Generally Regarded as Safe”)

GT- glikoziltransferaza

HMBC – heteronuklearna korelacija više veza („Heteronuclear Multiple Bond Correlation”)

HSQC – heteronuklearna koherentnost jednog kvanta („Heteronuclear Single Quantum Coherence”)

ICP/AES – induktivno kuplovana plazma sa atomskom emisionom spektrometrom

KPS - kalijum-persulfat

LD₅₀ – letalna doza za 50 % jedinki

Lev-g-PS – kalemljeni kopolimer levana i polistirena

LM – levan izolovan nakon fermentacije u optimalnoj podlozi sa melasom

LS200 – levan izolovan nakon fermentacije na NH_4Cl -PS200

LS400 - levan izolovan nakon fermentacije na NH_4Cl -PS400

MALDI TOF MS – jonizacija potpomognuta laserskom desorpcijom iz matriksa u analizatoru sa vremenom preleta i masenim detektorom

ME – mesni ekstrakt

MS – srednji kvadrat odstupanja

MS100 – 100 g/L saharoze u melasi

MS120 – 120 g/L saharoze u melasi

MS140 – 140 g/L saharoze u melasi

MS160 – 160 g/L saharoze u melasi

MS180 – 180 g/L saharoze u melasi

MS200 – 200 g/L saharoze u melasi

NAD⁺ - nikotinamid adenindinukleotid

NADH – redukovani NAD^+

NDP – nukleozid-difosfat

NH₄Cl-PS200 – podloga 196,75 g/L saharoze, 2,44 g/L amonijum-hlorida i inicijalnog pH od 6,97

NH₄Cl-PS400 – podloga 397,65 g/L saharoze, 4,62 g/L amonijum-hlorida i inicijalnog pH od 7,31

NMP – nukleozid-monofosfat

NMR – nuklearna magnetna rezonancija

NnPS – podloga sa saharozom i neorganskim izvorom azota

NOEL – nivo bez vidljivog efekta („no observed effect level”)

NoPS – podloga sa saharozom i organskim izvorom azota

OPS – osnovna podloga sa saharozom

P – fosfat

PCP – polisaharidna kopolimeraza

PDI – indeks polidisperznosti

PRESS – greška sume kvadrata („Prediction error sum of squares”)

PS – polistiren

R^2 – koeficijent determinacije

RSM – metoda površine odgovora („Response Surface Methodology”)

S100 – koncentracija saharoze od 100 g/L

S20 – koncentracija saharoze od 20 g/L

S40 – koncentracija saharoze od 40 g/L

S60 – koncentracija saharoze od 60 g/L

S80 – koncentracija saharoze od 80 g/L

SCFA – kratkolančane masne kiseline („Short chain fatty acids”)

SDS – natrijum-dodecilsulfat

SEM – skenirajuća elektronska mikroskopija

SS – suma kvadrata odstupanja

t – vreme protoka

t₀ – vreme protoka rastvarača

TDP – timidin-difosfat

TG/DTA – termogravimetrijska/diferencijalnotermička analiza

TPR – tetrapeptid ponavljajući protein

t_{sr} – srednja vrednost tri merenja vremena

UDP – uridin-difosfat

W_{zx} – flipaza unutrašnje membrane

W_{zy} – polimeraza spoljašnje membrane

W_{zz} – kisela fosfataza

XRD – difrakcija X-zraka

η – unutrašnji viskozitet

η_r - relativni viskozitet

η_{red} - redukovani viskozitet

η_{sp} - specifični viskozitet

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	4
2.1. <i>Mikrobni egzopolisaharidi</i>	5
2.1.1. Mikroorganizmi koji proizvode egzopolisaharide	6
2.1.2. Fiziološka uloga EPS-a	7
2.1.2. Biosinteza EPS-a.....	8
2.1.2.1. Intracelularna biosinteza Wzx/Wzy i ABC transporter zavisnim putanjama	10
2.1.2.2. Intracelularna biosinteza sintazno zavisnim putanjom	12
2.1.3. Uslovi za produkciju EPS-a	12
2.1.4. Ekstrakcija, prečišćavanje i analiza EPS-a.....	13
2.1.5. Primena EPS-a	15
2.2. <i>Optimizacija produkcije egzopolisaharida</i>	16
2.2.1. Dizajn eksperimenata i optimizacija	16
2.2.2. Metoda površine odgovora.....	18
2.2.2.1. Selekcija faktora koji utiču na sistem	18
2.2.2.2. Odabir eksperimentalnog dizajna	19
2.2.2.3. Matematičko-statistički tretman podataka	20
2.2.2.4. Evaluacija uklapanja modela	21
2.2.2.5. Određivanje optimalnih uslova	22
2.2.3. Primena RSM-a za optimizaciju produkcije EPS-a	23
2.2.3.1. Optimizacija produkcije dekstrana primenom RSM-a.....	23
2.2.3.2. Optimizacija produkcije velan gume primenom RSM-a	24
2.2.3.3. Optimizacija produkcije pululana primenom RSM-a	24
2.2.3.4. Optimizacija produkcije levana primenom RSM-a	25
2.3. <i>Upotreba alternativnih izvora ugljenika za produkciju egzopolisaharida</i>	26
2.3.1. Melasa	27
2.3.2. Upotreba melase za produkciju levana	28
2.4. <i>Fruktani</i>	29

2.5. <i>Levan</i>	31
2.3.1. Mikrobn o proizvođa či levana	32
2.3.1.1. <i>Bacillus licheniformis</i>	32
2.3.1.2. Ostali Gram pozitivni proizvođa či levana	33
2.3.1.3. Gram negativni proizvođa či levana	34
2.3.1.3. Rekombinantna produkcija levana	35
2.3.2. Fiziološka uloga levana.....	36
2.3.3. Mikrobn a biosinteza levana	36
2.3.4. Struktura i fizi č ko-hemijske osobine levana	39
2.3.5. Primena levana	41
2.3.5.1. Levan u industriji hrane i pi ć a	41
2.3.5.2. Levan u kozmeti č koj industriji	42
2.3.5.3. Levan kao antioksidativni, antitumorni i antiinflatorni agens	42
2.3.5.4. Levan kao agens protiv hiperholesterolemije, hiperglikemije i gojaznosti	43
2.3.5.5. Levan kao biomaterijal	44
2.3.5.7. Prebiotsko dejstvo levana	46
2.3.5.8. Levan kao adsorptivni agens i nemedicinski adheziv	48
2.3.5.9. Perspektive primene levana	49
2.6. <i>Kalemljeni kopolimeri sa polisaharidima</i>	49
2.6.1. Slobodnoradikalsko kalemljenje	52
2.6.1.1. Persulfatna inicijacija polimerizacije	52
2.6.1.2. Askorbinska kiselina za inicijaciju polimerizacije	54
2.6.2. Faktori koji uti č u na kalemljenje.....	54
2.6.3. Modifikacije polistirena sa polisaharidima	55
2.6.4. Primena kalemljenih kopolimera sa polisaharidima	56
3. MATERIJAL I METODE	58
3.1. <i>Supstance i rastvarači</i>	59
3.2. <i>Mikroorganizam</i>	59
3.3. <i>Podloge</i>	60
3.3.1. Hranljivi agar	60
3.3.2. Osnovna podloga sa saharozom (OPS)	60

3.4. <i>Produkcija, izolovanje i određivanje prinosa levana</i>	61
3.4.1. <i>Izolovanje, prečišćavanje i određivanje prinosa levana za eksperimente optimizacije</i>	61
3.4.2. <i>Izolovanje, prečišćavanje i određivanje prinosa levana za eksperimente optimizacije sa melasom</i>	61
3.4.3. <i>Izolovanje i prečišćavanje levana za strukturnu karakterizaciju</i>	62
3.5. <i>Optimizacija produkcije levana tehnikom jedne promenljive u vremenu u OPS-u</i> ...	62
3.6. <i>Optimizacija produkcije levana upotrebom RSM-a u NnPS-u</i>	63
3.7. <i>Hemijska analiza i pretretman melase</i>	63
3.8. <i>Optimizacija produkcije levana na podlozi sa melasom pomoću RSM-a</i>	64
3.9. <i>Metode korišćene za strukturnu karakterizaciju polisaharida</i>	65
3.9.1. <i>Elementalna organska mikroanaliza</i>	65
3.9.2. <i>Optička rotacija</i>	65
3.9.3. <i>Hidroliza i papirna hromatografija</i>	65
3.9.4. <i>Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)</i>	65
3.9.5. <i>Merenje viskoziteta</i>	66
3.9.6. <i>Određivanje molekulske mase</i>	66
3.9.7. <i>Perjodatna oksidacija levana i Smith-ova degradacija</i>	67
3.9.7.1. <i>Gasna hromatografija sa masenim spektrometrom (GC/MS)</i>	69
3.9.8. <i>Metilovanje polisaharida i reduktivno raskidanje glikozidnih veza</i>	69
3.9.8.1. <i>GC/MS analiza 2,5 anhidroalditol derivata</i>	70
3.9.9. <i>Nuklearna magnetna rezonancija (NMR)</i>	70
3.10. <i>Sinteza, prečišćavanje i stepen kalemljenja kopolimera levana i polistirena</i>	71
3.11. <i>Metode korišćene za strukturnu karakterizaciju kopolimera levana i polistirena</i> ..	72
3.11.1. <i>FTIR spektroskopija</i>	72
3.11.2. <i>Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)</i>	72
3.11.3. <i>Simultana termogravimetrijska/diferencijalnotermička analiza (TG/DTA)</i>	72
3.11.4. <i>Difrakcija X-zraka (XRD)</i>	73
3.11.5. <i>¹³C NMR spektroskopija</i>	73
4. REZULTATI I DISKUSIJA	74
4.1. <i>Ispitivanje ključnih promenljivih koje utiču na produkciju levana</i>	75

4.2. <i>Primena RSM-a za optimizaciju produkcije levana</i>	79
4.2.1. Ispitivanje sistema fermentacije sa nižom koncentracijom saharoze	80
4.2.2. Ispitivanje sistema fermentacije sa višom koncentracijom saharoze	83
4.3. <i>Upotreba melase kao izvora ugljenika za produkciju levana</i>	87
4.3.1. Melasa šećerne repe: hemijski sastav i pretretman	87
4.3.2. Primena RSM-a za optimizaciju produkcije levana na podlozi sa melasom	89
4.4. <i>Ispitivanje strukturnih karakteristika izolovanog polisaharida</i>	92
4.4.1. Elementalna organska mikroanaliza, optička rotacija i hidroliza	93
4.4.2. Analiza FTIR spektroskopijom	93
4.4.3. Viskozitet	94
4.4.4. Molekulska masa	94
4.4.5. Analiza polisaharida perjodatnom oksidacijom i Smith-ovom degradacijom ...	96
4.4.6. Metilaciona analiza polisaharida	98
4.4.7. NMR spektroskopija	102
4.4.7.1. ¹³ C NMR spektroskopija	102
4.4.7.2. ¹ H NMR spektroskopija	103
4.4.7.3. Dvodimenzionalna NMR spektroskopija	105
4.4.7.4. Ispitivanje grananja levana pomoću NMR spektroskopije.....	110
4.5. <i>Optimizacija uslova za kopolimerizaciju levana i polistirena</i>	111
4.5.1. Uticaj temperature i atmosfere	111
4.5.2. Uticaj reakcionog vremena	114
4.5.3. Uticaj amina	115
4.5.4. Sinteze inicirane sistemom KPS/AK	117
4.6. <i>Strukturna karakterizacija kopolimera levana i polistirena</i>	118
4.6.1. FTIR spektroskopija levana, polistirena i kopolimera	118
4.6.2. SEM mikroskopija levana i kopolimera	119
4.6.3. TG/DTA analiza levana, polistirena i kopolimera	121
4.6.4. XRD analiza levana, polistirena i kopolimera	123
4.6.5. ¹³ C NMR spektroskopija kopolimera.....	124
5. ZAKLJUČCI	125
6. LITERATURA	130

1. UVOD

Mikrobni polisaharidi, široko prihvaćeni biotehnološki proizvodi, imaju veliki ekonomski značaj, jer se zbog svoje strukturne raznolikosti mogu primeniti u različitim oblastima: prehrambenoj industriji, kozmetici, agronomiji, farmaciji i medicini. Istovremeno, strukturne i funkcionalne karakteristike mnogih mikrobnih polisaharida se intenzivno proučavaju, što može da doprinese još većoj primeni ovih biopolimera. Osim toga, procesi mikrobiološki fermentacija se optimizuju da bi se povećale performanse produkcije ekstracelularnih polisaharida, a cena ostala nepromenjena. Bakterijski egzopolisaharid levan je prirodni polimer fruktoze, koji usled pogodnih fizičko-hemijskih karakteristika, netoksičnosti, biokompatibilnosti i biodegradabilnosti ima brojne primene kao stabilizator, emulgator, nosač ukusa i mirisa, prebiotik, biomaterijal, adheziv, antioksidativni, antiinflamatorni, hipoholesterolemijski, antitumorni ili agens za inkapsulaciju.

Poslednjih godina veliki interes posvećen je pronalaženju alternativnih materijala, koji bi prevazišli ograničenja sintetičkih polimera, koja nepovoljno deluju na životnu sredinu. Iako se polistiren široko koristi zbog odličnih fizičkih osobina, povoljne cene i jednostavne tehnologije dobijanja, veoma je hemijski inertan i ostaje u prirodi nepromenjen veoma dug vremenski period. Zbog toga je poželjan pristup modifikacija polistirena prirodnim polimerima, kao što je levan, koji bi zahvaljujući svojoj strukturi omogućio bolju dostupnost za mikrobiološku degradaciju.

Cilj ovog rada bio je ispitivanje optimalnih uslova za dostizanje maksimalnog prinosa ekstracelularnog polisaharida levana bakterije *Bacillus licheniformis* i ispitivanje uticaja reakcionih uslova na stepen kalemljenja kopolimera levana i polistirena slobodnoradikalnim mehanizmom. Ovakav pristup istraživanja je prvi put primenjen u ispitivanju levana dobijenog iz bakterije *B. licheniformis* NS032, takođe i u sintezi kopolimera, jer do sada levan nije korišćen kao prirodni polimer u ovakvom tipu reakcija sa polistirenom.

U cilju dobijanja maksimalnog prinosa levana, kao i maksimalnog stepena kalemljenja kopolimera levana i stirena, u ovom radu su postavljeni sledeći zadaci:

1. Tehnikom jedne promenljive u vremenu ispitati uticaj temperature, mešanja, koncentracije saharoze i različitih izvora azota (organskih i neorganskih) na produkciju levana;
2. Kvadratnim modelom metode površine odgovora ispitati uticaj međusobnih interakcija tri faktora (pH vrednosti, koncentracija saharoze i amonijum-hlorida) u sistemima sa nižom i višom koncentracijom saharoze na produkciju levana;
3. Ispitati mogućnost supstitucije saharoze, melasom (nusproizvodom prerade šećerne repe) u podlogama za produkciju levana;
4. Izolovati polisaharid iz fermentacione tečnosti, prečistiti ga i strukturno okarakterisati hidrolizom i papirnom hromatografijom hidrolizata, elementalnom organskom analizom, infracrvenom spektroskopijom sa Furijeovom transformacijom, nuklearnom magnetnom rezonancijom, određivanjem optičke rotacije, viskoziteta i molekulske mase, perjodatnom oksidacijom i Smith-ovom degradacijom i metilacionom analizom;
5. Ispitati uticaj temperature, atmosfere, reakcionog vremena, aminoaktivatora i redoks sistema na stepen kalemljenja kopolimera levana i polistirena radi dobijanja kopolimera sa najvišim procentom kalemljenja;
6. Odvojiti kopolimer iz reakcione smeše, prečistiti ga i strukturno okarakterisati infracrvenom spektroskopijom sa Furijeovom transformacijom, skenirajućom elektronskom mikroskopijom, termogravimetrijskom/diferencijalnotermičkom analizom, difrakcijom X-zracima i ^{13}C nuklearnom magnetnom rezonancijom.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Mikrobni egzopolisaharidi

Termin biopolimeri koristi se za opisivanje prirodnih polimera koje proizvode biološki sistemi, ili sintetičkih polimera nastalih od bioloških polaznih materijala kao što su aminokiseline, šećeri ili masti. Biopolimeri mikrobnog porekla se prema strukturi mogu podeliti na četiri grupe: poliestri, poliamidi, neorganski polianhidridi i polisaharidi. Prvi bakterijski polimer, dekstran, otkrio je 1861. godine Paster u vinu, kao proizvod aktivnosti mikroorganizama, a potom je 1878. godine Tieghem identifikovao bakteriju *Leuconostoc mesenteroides* koja proizvodi ovaj polisaharid [1].

Najčešći sastojci mikrobnih polisaharida su D-glukoza, D-galaktoza, D-manoza, L-fukoza, L-ramnoza, N-acetil-D-glukozamin, N-acetil-D-galaktozamin, D-glukuronska kiselina i D-galakturonska kiselina, a prisutni su i drugi ugljeni hidrati u ograničenom obimu. Tipični organski supstituent mikrobnih polisaharida je O-acetil grupa povezana estarskom vezom, koja ne menja ukupno naelektrisanje molekula, ali utiče na konformaciju i interakcije. Ostali identifikovani supstituenti povezani estarskom vezom su: propionil, hidroksibutanil i gliceril ostaci i ponekad aminokiseline. Ketal-piruvat je druga važna komponenta ovih polimera i doprinosi naelektrisanju molekula. Velika strukturna raznolikost molekula mikrobnih polisaharida potiče od varijacija u kondenzaciji veza i različitih kombinacija monomera u sekvenci polimera [2].

Prema mestu gde se nalaze u ćeliji, mikrobni polisaharidi se mogu klasifikovati u tri grupe:

- **intracelularni** – obezbeđuju ćeliji izvor ugljenika i energije;
- **polisaharidi ćelijskog zida** – kao što su peptidoglikani, lipopolisaharidi i tejhodne kiseline;
- **egzopolisaharidi** – izlučuju se u ekstracelularnu sredinu u obliku kapsula ili biofilma [3].

Egzopolisaharidi (EPS) se dele na dve grupe: **homopolisaharide** koji su izgrađeni od samo jedne vrste monosaharidnih jedinica (dekstran, levan) i **heteropolisaharide** sastavljene iz više različitih monosaharidnih jedinica (ksantan, gelan) [3].

Pored razlike u vrsti ugljenohidratnog monomera, drugačiji su enzimi i mesto za sintezu homopolisaharida i heteropolisaharida. Na osnovu tipa veze i monomernih jedinica mikrobnih homopolisaharida mogu se podeliti na: α -glukane, β -glukane, fruktane i galaktane [1]. Većina bakterijskih egzopolisaharida su heteropolisaharidi i oni se najčešće sintetišu izvan ćelije u formi ponavljajućih jedinica. Neke vrste bakterija, kao što su *Serratia marcescens* i *Aeromonas salmonicida* mogu da proizvode dva različita tipa polisaharida [1,3]. Ponavljajuće jedinice heteropolisaharida su uglavnom D-glukoza, D-galaktoza, L-ramnoza, N-acetilglukozamin, N-acetilgalaktozamin, glukuronska kisenina, a dodatni supstituenti fosfat, acetil grupa i glicerol [1].

2.1.1. Mikroorganizmi koji proizvode egzopolisaharide

Mikroorganizmi koji proizvode egzopolisaharide mogu biti prokarioti (eubakterije i arhee) i eukarioti (fitoplankton, gljive, alge) [4].

Sposobnost izlučivanja polisaharida je široko rasprostranjena među bakterijama rodova *Streptococcus*, *Xanthomonas* i *Acetobacter*. Prvi komercijalizovani bakterijski EPS je dekstran, glukan koga proizvode bakterije generalno smatrane kao bezbedne (GRAS, „Generally Regarded as Safe”) rodova *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Weisella*, *Pediococcus* and *Lactobacillus*. Rodovi bakterija *Alcaligenes* i *Agrobacterium* proizvode kurdlan, čiju upotrebu je, zajedno sa dekstranom, odobrila Uprava za hranu i lekove Sjedinjenih Američkih Država (FDA, „Food and Drug Administration”). Nerastvorljiv biopolimer dobre mehaničke čvrstoće i visokog kapaciteta za adsorpciju vode - celulozu, izlučuju rodovi *Acetobacter*, *Glucanoacetobacter* i *Rhizobium*. Sojevi *Xanthomonas sp.* i *X. campestris* sintetišu heteropolisaharid ksantan, koji je 1969. godine FDA odobrila za upotrebu u prehrambenoj industriji. *Streptococcus zooepidemicus* proizvodi hijaluronsku kiselinu, pa ova bakterija postaje alternativni izvor dobijanja ovog polisaharida umesto korišćenja tkiva životinjskog porekla. Zabrinutost zbog patogenosti roda *Streptococcus* uticala je na ispitivanje mogućnosti transformacije GRAS bakterija, kao što su *L. lactis* i *B. subtilis*, da vrše sintezu hijaluronske kiseline. Heteropolisaharid alginat sekretuju bakterije rodova *Pseudomonas* i *Azotobacter*, a homopolisaharid levan *Halomonas*, *Zymomonas*,

Bacillus i *Pseudomonas*. Gelan guma je takođe odobrena od strane FDA za primenu u industriji, a produkuje je *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461. Pokazano je da neke bakterije kao što su *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas oleovorans*, *Enterobacter* A47 i *Escherichia coli*, izlučuju proizvode različitih i potencijalno novih struktura. Bakterije rodova *Pseudoalteromonas*, *Bacillus*, *Halomonas*, i *Vibrio* izolovane iz ekstremnih staništa (antartički ekosistemi, slana jezera, geotermalni izvori) takođe proizvode egzopolisaharide [4].

Proizvodnja EPS-a je široko rasprostranjena među gljivama rodova *Aureobasidium*, *Candida*, *Cryptococcus*, ali i mnogim drugim. Iako je hemijski i strukturni diverzitet ovih glikana veoma veliki, mnogi od njih još uvek nisu dovoljno proučavani, izuzev pululana koga sekretuje *Aureobasidium pullulans*. Skleroglukan je komercijalizovan sedamdesetih godina prošlog veka, a izlučuje ga biljni patogen *Sclerotium sp.* Mnoge više gljive rodova *Ganoderma*, *Poria*, *Tremella* proizvode bioaktivne egzopolisaharide sa antioksidativnim, imunostimulirajućim i antimikrobnim osobinama. Prema nedavnim istraživanjima, endofitske gljive sintetišu egzopolisaharide, koji su učestvuju u interakciji biljaka i endofita, a pokazuju i biološku aktivnost [4].

U poređenju sa drugim mikrobnim izvorima EPS-a, mikroalge proizvode polisaharide kompleksnijih hemijskih struktura sa većim diverzitetom monomera i retkim ponavljajućim jedinicama, kao što su fukoza, ramnoza i riboza. U strukturi mogu biti prisutne i uronske kiseline i sulfati [4].

U nekim bioreaktorima za tretman otpadnih voda mikroorganizmi su agregirani u vidu granula ili biofilma, a neke mikrobne vrste u granulama izlučuju različite vrste gelirajućih EPS-a. Ekstrahovani su alginatu slični EPS iz aerobnog i anaerobnog granularnog mulja. Granulan, EPS veoma kompleksne strukture, izolovan je iz aerobnog granularnog mulja nakon uklanjanja azota i fosfora iz industrijske otpadne vode bogate hranljivim supstancama [4].

2.1.2. Fiziološka uloga EPS-a

Prirodna fiziološka uloga EPS-a zavisi od staništa mikroorganizma koji ga sintetiše, a produkcija je direktni odgovor na selektivne pritiske životne sredine: biotički stres

(predatori, efekti antibiotika, antimikrobnih supstanci i antitela), kompeticija i abiotički stres (temperatura, pH, intenzitet svetlosti) [1,3]. Mikroorganizmi se često udružuju u biofilmove visoke ćelijske gustine, a glikokaliks, koji je neophodan za formiranje biofilma, pretežno se sastoji iz EPS-a. Adhezija mikrobne flore na biološku podlogu, odnosno supstrat za rast, potpomognuta je egzopolisaharidima. Okružujući se slojem ekstracelularnih polisaharida sa visokim sadržajem vode, mikroorganizmi se štite od isušivanja i predatora, a anjonska priroda spoljašnjeg polisaharidnog sloja pomaže u zadržavanju minerala i hranljivih supstanci [3].

Zahvaljujući anjonskom karakteru i kapacitetu da heliraju metale i jone, egzopolimeri pomažu mikrobnom konzorcijumu u degradaciji nekih metala. Bakterije pokrivaju površinu ćelije slojem egzopolisaharida da bi se zaštitile od infiltracije toksičnih metala [3,5].

2.1.2. Biosinteza EPS-a

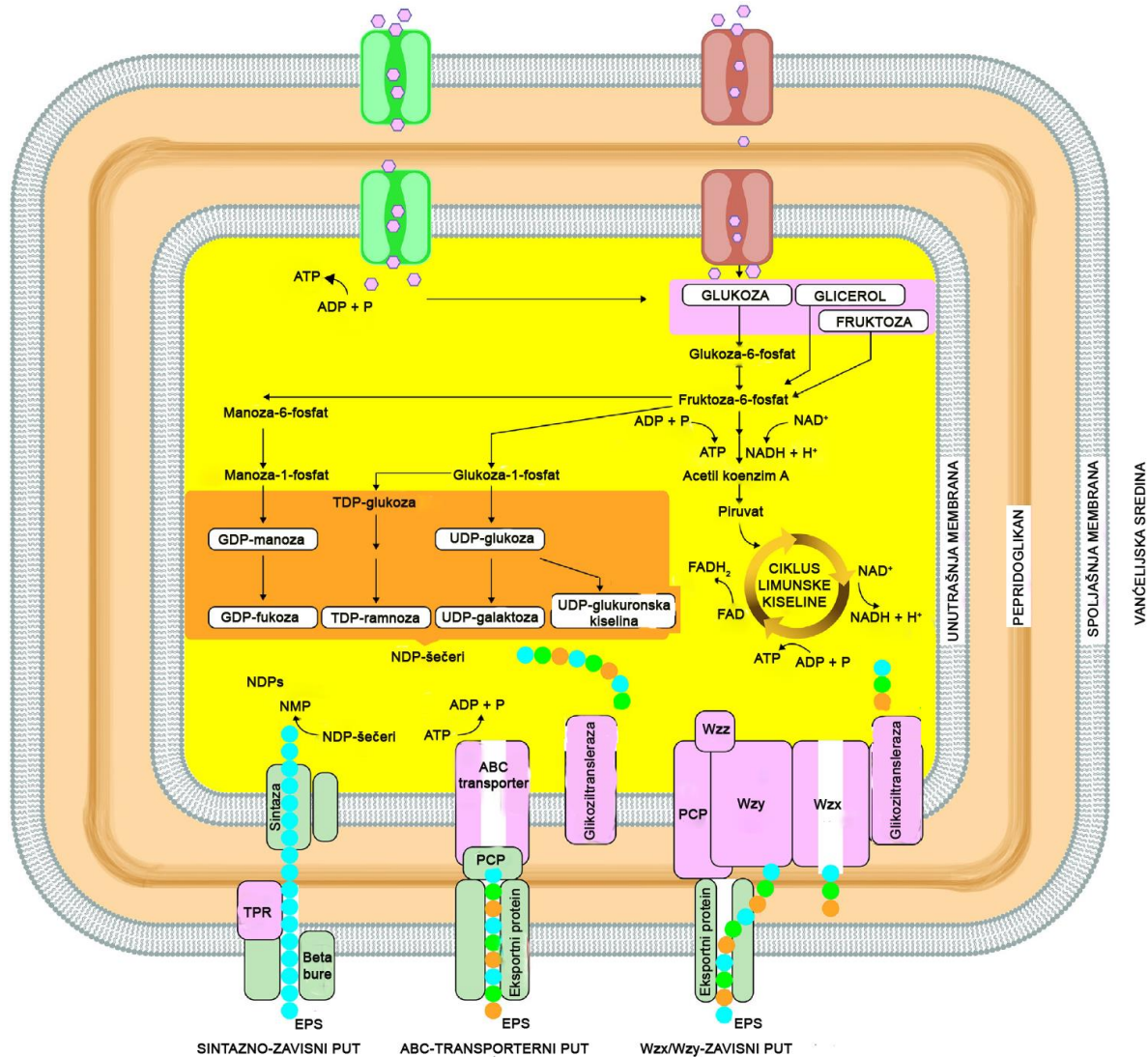
U zavisnosti od vrste organizma i uslova sredine, biosinteza EPS-a se odvija u različitim fazama mikrobnog rasta. Geni koji su uključeni u biosintezu egzopolisaharida se klasifikuju u dve grupe. U prvu grupu spadaju geni neophodni za sintezu nukleotida šećera, koji su nespecifični za egzopolisaharide i učestvuju u metabolizmu šećera, masnih kiselina i nukleotida. Druga grupa gena je specifična samo za mikroorganizme proizvođače EPS-a. Postoje dva načina biosinteze egzopolisaharida: unutarćelijska (intracelularna) i vanćelijska (ekstracelularna) [6].

Homopolisaharidi se generalno sintetišu *ekstracelularno*, kada enzimi prenose aktiviran prekursor monosaharida iz supstrata na rastući lanac polisaharida. Dekstran, levan i mutan su primeri za ovakav način biosinteze [5].

Intracelularna biosinteza polisaharida je kompleksan proces sa unutarćelijskim povezivanjem ugljenohidratnih nukleotidnih prekursora i njihovim transportom izvan ćelije. Ovaj biosintetički put se može podeliti na četiri reakcione sekvence: transport šećera u citoplazmu, sintezu šećer-1-fosfata, aktivaciju i kuplovanje šećera i eksport van ćelije [6].

Glavni izvori ugljenika za mikroorganizme su monosaharidi i disaharidi, a njihov ulazak u citoplazmu iz okolnog medijuma regulisan je brojnim kontrolnim proteinima i sprovodi se pomoću tri vrste transportnih sistema. Primarni transportni sistem kupluje

hidrolizu adenozin-trifosfata (ATP) i translokaciju šećera kroz transportnu ATP-azu (Slika 2.1). Drugi transportni sistem kupluje razmenu jona sa ulaskom šećera u ćeliju, a treći koristi fosfoenolpiruvat-fosfotransferazni sistem [6].



Slika 2.1. Pojednostavljen prikaz biosintetskih putanja EPS-a (ATP – adenozin-trifostat, ADP – adenozin-difosfat, P – fosfat, NAD^+ - nikotinamid adenindinukleotid, NADH – redukovani NAD^+ , FAD – flavin adenindinukleotid, FADH_2 – redukovani FAD, NDP – nukleozid-difosfati, NMP – nukleozid-monofosfati, GDP – guanozin-difosfat, UDP – uridin-difosfat, TDP – timidin-difosfat, TPR – tetraopeptid ponavljajući protein, ABC transporter- ATP vezujuća kasetna, PCP – polisaharidna kopolimeraza, Wzz – kisela fosfataza, Wzx – flipaza unutrašnje membrane, Wzy – polimeraza spoljašnje membrane) [1].

Molekuli šećera koji ulaze u citoplazmu bakterija fosforilišu se u šećer-6-fosfate i katabolišu glikolizom, a nastali primarni metaboliti koriste se za sintezu malih biomolekula (aminokiseline, monosaharidi). Deo šećer-6-fosfata se pomoću fosfoglukomutaza konvertuje u šećer-1-fosfate. Dobijeni šećer-1-fosfati su centralni metaboliti za formiranje nukleotida šećera, kao što su uridin-difosfat glukoza (UDP-glukoza) i timidin-difosfat glukoza (TDP-glukoza), pomoću enzima fosforilaza (Slika 2.1) [6,7].

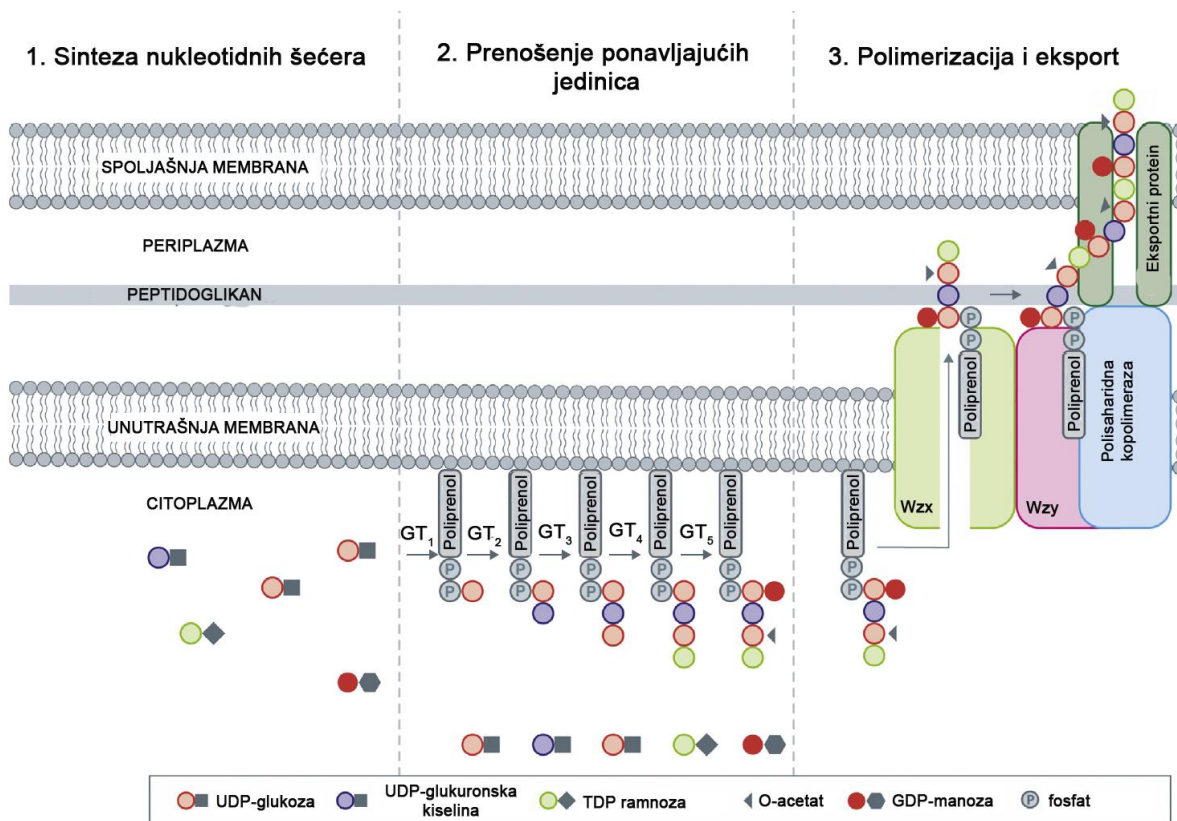
Povezivanje lanaca heteropolisaharida postepenim dodavanjem različitih aktiviranih šećernih monomera i njihovih derivata je kompleksan proces. Definisana su dva različita mehanizma ovog procesa u zavisnosti od krajnje lokalizacije polimera. Za prvi mehanizam je važna aktivnost ATP vezujuće kasete, odnosno ABC transportera, pa se naziva ABC zavisna putanja. Drugi mehanizam je Wzx/Wzy zavisan i obuhvata aktivnost flipaze unutrašnje membrane, odnosno aminofosfolipid-transportne ATP-aze (Wzx) i polimeraze spoljašnje membrane (Wzy). Intracelularna biosinteza većine homopolisaharida odvija se sintazno-zavisnim putem [1,7].

2.1.2.1. Intracelularna biosinteza Wzx/Wzy i ABC transporter zavisnim putanjama

Wzx/Wzy zavisna putanja je dobila naziv prema glavnim proteinima uključenim u transfer i polimerizaciju specifičnih ponavljajućih jedinica (Slika 2.2). Primeri EPS-ova sintetisanih na ovaj način su ksantan, sukcinoglukan i različiti sfingani [7].

Prvi korak obuhvata povezivanje ponavljajućih jedinica visokospecifičnim glikoziltransferazama, koje prenose monomere aktiviranih šećernih nukleotida prema undekaprenil-difosfatnom prenosioču koji se nalazi na citoplazmatskoj strani unutrašnje ćelijske membrane. Pre finalnog povezivanja polimera moguće je ugrađivanje supstituenata (glicerol, acetat, piruvat, sukcinat ili sulfat), ali je i dalje nerazjašnjeno u kom stadijumu se to dešava. Flipaza unutrašnje membrane (aminofosfolipid-transportna ATP-aza, Wzx) kodirana wxz genom, prenosi proton zavisnim mehanizmom ponavljajuće jedinice u periplazmatski prostor. Unutar periplazmatskog prostora ponavljajuće jedinice šećera prepoznaje polimeraza unutrašnje membrane (Wzy) i prenosi rastući polisaharid van ćelije.

Finalna sekrecija se odvija pomoću membranskog eksportnog proteina niske supstratne specifičnosti [7].



Slika 2.2. Shematski prikaz Wzx/Wzy zavisnog puta (UDP – uridin-difosfat, TDP – timidin-difosfat, GDP – guanozin-difosfat, Wzx – flipaza unutrašnje membrane, Wzy – polimeraza spoljašnje membrane, GT-glikoziltransferaza) [7].

Naziv ABC zavisnog puta potiče od ATP vezujućeg kasetnog transportera i glavna razlika u odnosu na Wzx/Wzy zavisni put sastoji se u tome što se polimerizacija polisaharda odvija na citoplazmatičnoj strani unutrašnje membrane. Kompletiranje strukture glikana se započinje na citoplazmatičnoj strani unutrašnje membrane dejstvom glikoziltransferaze i polimerizujućih enzima prenoseći se undekaprenil-difosfatnim transporterom, a potom se pomoću ABC transportera prebacuju kroz unutrašnju membranu i na kraju izlučuju eksportnim proteinom kroz spoljašnju membranu [7,8].

2.1.2.2. Intracelularna biosinteza sintazno zavisnom putanjom

Glavni primeri EPS-a sintetisanih sintazno zavisnim putem su bakterijska celuloza, kurdlan i alginati. Izlučivanje se može odvijati i u prisustvu i u odsustvu lipidnih akceptorskih molekula, a translokacija ponavljajućih jedinica ne zavisi od flipaza. Ključni protein ovog ekskretornog puta je glikoziltransferaza ugrađena u membranu (sintaza), koja simultano polimerizuje i transportuje rastući lanac polisaharida [1,7].

2.1.3. Uslovi za produkciju EPS-a

Iako je sastav i količina EPS-a genetički određena, na njih veoma utiče sastav podloge i uslovi kultivacije mikroorganizma. Ne postoje generalni uslovi pogodni za sve mikrobnе proizvođače egzopolisaharida, koji će garantovati visoku proizvodnju i prinose. U zavisnosti od vrste i uslova kultivacije bakterijski prinosi EPS-a za 0,5 - 7 dana mogu biti u opsegu od 0,29 g/L do 100 g/L, odnosno produktivnosti od 0,19 do 100 g/L po danu. Najviši prinosi dobijeni za levan iznosili su 59,5 - 100,0 g/L, kurdlan (65,3 g/L) i ksantan (25,0 g/L). Gljive uobičajeno imaju duži period kultivacije u odnosu na bakterije (2 – 32 dana). *A. pullulans* koji proizvodi pululan (18 - 13 g/L po danu) i proizvođač skleroglukana *S. rolfsii* (0,06 – 1,32 g/L po danu) izdvajaju se po visokoj produktivnosti, dok više gljive i mikroalge daju manje prinose [4,8].

Dostupnost izvora ugljenika zajedno sa ograničenom količinom izvora azota često favorizuju proizvodnju egzopolisaharida, međutim neophodno je definisati tačne opsege supstrata. Takođe, visoki prinosi biomase ne dovode uvek do optimalne produkcije EPS-a. Smanjenje ćelijskog rasta može da poveća dostupnost izoprenoidnog lipidnog nosača, čija funkcija nije vezana za rast, što stimuliše proizvodnju polisaharida. Suprotno tome, dostupnost azota stimuliše sintezu levana kod bakterija *B. subtilis* i *Paenibacillus sp.* $2H_2$, jer se enzimi neophodni za proizvodnju polimera sintetišu zajedno sa rastom ćelija. Glukoza i saharoza se najčešće koriste kao izvori ugljenika za mikrobni rast i produkciju EPS-a. Pošto cena podloge čini 30 % ukupne vrednosti fermentacije, intenzivno se traga za ekonomski isplativijim supstratima poreklom iz industrijskog i poljoprivrednog otpada.

Drugi elementi kao što su fosfor, kalijum i katjoni metala takođe su neophodni za mikrobnu sintezu egzopolisaharida. Fosfor je važan element sekundarnog metabolizma i reguliše unos lipida i ugljenih hidrata u ćeliju. Kalijum i magnezijum su kofaktori enzima važnih za metabolizam i transport ugljenih hidrata. Dodatak prekursora, kao što su nukleotidfosfatni šećeri, aminokiseline i vitamini stimulišu sintezu EPS-a [4,8].

Osnovna struktura egzopolisaharida ne menja se značajno sa promenom uslova koji utiču na rast mikroorganizama, ali sadržaj supstituenata veoma varira i menja osobine polimera. Smanjenje sinteze EPS-a može da izazove istovremeno skladištenje različitih molekula unutar ćelije (glikogen, polihidroksialkanoati), što se uočava kod mnogih mikroorganizama [8].

Promene u životnoj sredini mikroorganizama utiču na enzimsku aktivnost (inhibitorno ili stimulatивно), sintezu proteina (indukcija ili represija) i ćelijsku morfologiju. Da bi se omogućio stabilan i reproduktivan bioproces potrebno je da se u tačno definisanom opsegu održavaju parametri kultivacije, kao što su temperatura, pH i brzina mešanja. Mešanje i aeracija određuju dostupnost hranljivih supstanci i kiseonika. Previsok intenzitet mešanja može da ošteti ćelije ili promeni fizičko-hemijske osobine nastalog polimera [4].

2.1.4. Ekstrakcija, prečišćavanje i analiza EPS-a

Specifične metode za izolovanje EPS-a iz podloge za kultivaciju mogu biti hemijske, fizičke i kombinovane, a zavise od karakteristika organizama koji ih proizvode, vrste polisaharida i željenog stepena čistoće. Ne postoji jednostavna metoda kojim se izoluju svi EPS, već se najčešće poredi nekoliko metoda ekstrakcije i bira najpogodnija. Generalno, procedura se sastoji iz sledećih koraka:

- a) uklanjanje ćelija, najčešće centrifugiranjem ili filtracijom;
- b) taloženje polimera iz supernatanta oslobođenog ćelija dodavanjem nepolarnog rastvarača, koji se meša sa vodom (acetone, propanol, izopropanol);
- c) sušenje precipitiranog polimera.

Pomoću reprecipitacije razblaženih vodenih rastvora EPS-a, hemijske ili enzimske deproteinizacije moguće je ukloniti nečistoće, kao što su ostaci ćelija, soli i proteini [3,4].

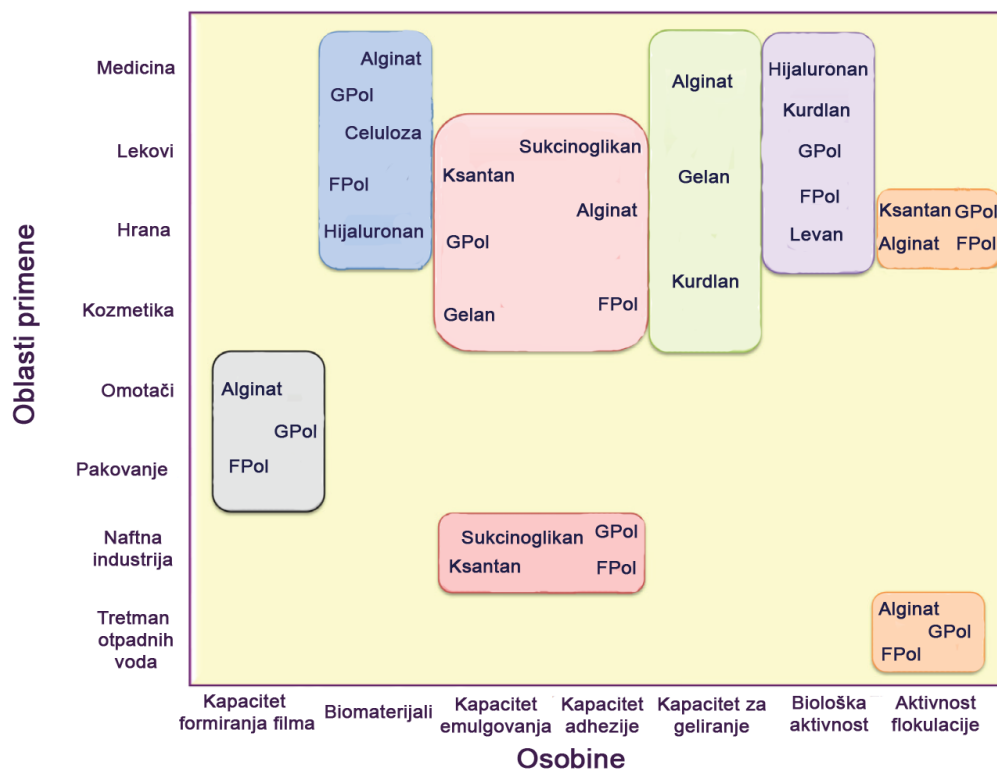
Za karakterizaciju biopolimera potrebna je analiza hemijskih, fizičkih i bioloških osobina, koje su ključni faktori za razumevanje ponašanja EPS u različitim sredinama. Molekulska masa, hemijska struktura i sastav polisaharida, posebno prisustvo jonizujućih grupa, utiču na ponašanje u vodenim rastvorima. Osobine povezane sa strukturnim karakteristikama biopolimera su: unutrašnji viskozitet, konformacija i fleksibilnost molekula i broj intra/intermolekulskih interakcija. Ispitivanja hemijskog sastava EPS obuhvataju identifikaciju monosaharidnih jedinica i supstituenata, a metode koje se uobičajeno koriste su: kisela hidroliza, derivatizacija u alditol acetate i analiza gasnom hromatografijom, jonoizmenjivačka hromatografija praćena pulsnom amperometrijskom detekcijom i kapilarna elektroforeza [8].

Usled mogućih brojnih kombinacija različitih monosaharidnih jedinica i stereospecifičnosti glikozidne veze (α - ili β - anomeri), hemijska struktura EPS-a veoma je kompleksna, što dodatno otežava njihovu strukturnu analizu. Određivanje vrsta glikozidnih veza između monomera ispituje se metilovanjem svih slobodnih hidroksilnih grupa, zatim hidrolizom metilovanog proizvoda pri čemu se dobija smeša parcijalno metilovanih monosaharida, redukcijom do alditola i njihovim acetilovanjem, pri čemu se dobijaju parcijalno metilovani alditol acetati, koji se finalno analiziraju gasno masenom hromatografijom (GC/MS). Smith-ovom degradacijom se mogu selektivno fragmentisati polisaharidi, a ova metoda obuhata oksidaciju perjodatom, redukciju u polialkohole i kiselu hidrolizu. Smanjenje molekulske mase i stepena grananja polisaharida postiže se na dva načina: kiselom ili enzimskom hidrolizom. Dobijene oligosaharidne fragmente nakon hidrolize moguće analizirati pomoću GC/MS, jonizacijom matriksom potpomognutom laserskom desorpcijom u analizatoru sa vremenom preleta i masenim detektorom (MALDI-TOF-MS) i nuklearnom magnetnom rezonancijom (NMR). Od NMR tehnika koriste se NMR spektroskopske metode čvrstog stanja, jednodimenzionalne, kao i napredne dvodimenzionalne NMR spektroskopije polisaharida u rastvorima, kojima se ispituje interakcija svakog ugljenika/vodonika sa susednim atomom ili hemijskom grupom i eventualno određuje njihov položaj u strukturi [8].

Različitim tehnikama određuje se srednja molekulska masa i polidisperzioni indeks polimera. Novija tehnika za detekciju apsolutne molekulske mase polisaharida, koja menja tradicionalnu gel propusnu hromatografiju, naziva se gel filtraciona hromatografija visokih performansi praćena višeučnom detekcijom rasipanja laserske svetlosti [8].

2.1.5. Primena EPS-a

EPS se koriste kao izvori hidrokoloida za farmaceutsku, hemijsku i prehrambenu industriju, a takođe, predstavljaju nove biomaterijale sa različitim primenama u industrijskim sektorima za tekstil, detergente, adhezive, tretmane otpadnih voda, kozmetologiju i aditive hrane (Slika 2.3). Zahvaljujući izuzetnim osobinama, značajno tržište imaju ksantan, dekstran i pululan. Međutim, najveće tržište hidrokoloida i dalje predstavljaju biljni i polisaharidi algi (skrob, galaktomanani, pektin, alginat) [1].



Slika 2.3. Dijagram korelacije između najvažnijih osobina egzopolisaharida i oblasti primene (GPol – GalaktoPol, glukon iz *Pseudomonas oleovorans*, FPol – FukoPol, fukan iz *Enterobacter A47*) [8].

Brzina produkcije i visoki prinosi mikrobnih egzopolisaharida predstavljaju prednost u odnosu na biljne i polisaharide algi, koja zavisi od klimatskih i geoloških uslova životne sredine. U odnosu na tradicionalne načine dobijanja polimera iz biljaka i algi, koji su manjeg stepena čistoće i manje se koriste za specifične namene, veći je potencijal upotrebe EPS u kozmetici, lekovima i biomedicini, jer na takvim tržištima cenu proizvodnje i niže prinose nadmašuje veoma specifična primena [1,8].

2.2. Optimizacija produkcije egzopolisaharida

Kada se unapređuje bioproces, optimizuju se parametri za kultivaciju mikrobnog proizvođača, pri čemu je fokus na redukciji sinteze neželjenih sporednih proizvoda i povećanju prinosa EPS-a. Radi postizanja maksimalnih prinosa EPS željene čistoće i svojstava, optimizuje se sastav podloge, uslovi kultivacije i dizajn bioreaktora [4].

U poredjenju sa konvencionalnim metodama, statistički pristupi su idealna alternativa za poboljšanje prinosa proizvoda tokom fermentacije. Primenom ovih metoda smanjuje se broj eksperimenata i ispituju interakcije. Jedan od najčešćih statističkih pristupa eksperimentima optimizacije je metoda površine odgovora (**Response Surface Methodology, RSM**), kojom se simultano ispituju efekti različitih ispitivanih faktora i dobijaju modeli koji predviđaju optimalne uslove procesa [4,9].

Drugi pristup optimizacije bioprocasa je upotreba veštačkih neuronskih mreža. Ova metoda inspirisana je postavkom cerebralne mreže i sastoji se iz grupa visoko međusobno povezanih elemenata - neurona. Omogućava modelovanje kompleksnih odnosa, naročito nelinearnih, koji se mogu istražiti bez komplikovanih jednačina. Prilično je fleksibilna u smislu broja i oblika eksperimentalnih podataka, što omogućava njenu upotrebu kod manje formalnih eksperimentalnih dizajnova [4,10].

2.2.1. Dizajn eksperimenata i optimizacija

Faktorom se definiše svaki aspekt eksperimentalnih uslova, koji utiče na dobijene rezultate. Postoje dve podele faktora, prva je na kontrolisane i nekontrolisane, a druga na

kvalitativne i kvantitativne. Klasičan dizajn eksperimenata ispituje odgovor svakog faktora dok se nivo ostalih faktora održava konstantnim. Ovakav pristup se naziva tehnika jedne promenljive u vremenu. Kompletnim faktorijalnim dizajnom se mere sve moguće kombinacije odabranih nivoa faktora i ovaj dizajn ima prednost u odnosu na tehniku jedne promenljive u vremenu jer:

- detektuje i procenjuje bilo koje interakcije;
- ako su efekti faktora aditivni, zahteva manji broj merenja.

Nasuprot aditivnim efektima, procenjuje se da na oko dve trećine procesa u hemijskoj industriji utiču interakcije između faktora [11].

Jedan od problema sa kompletnim faktorskim dizajnom je što broj eksperimenata raste sa brojem ispitivanih faktora. Za faktor k na dva nivoa sa dva replikata, za svaku kombinaciju nivoa neophodno je 2^{k+1} eksperimenata (za pet faktora ukupno 64 eksperimenta). U slučajevima sa više od tri faktora, pretpostavlja se da su zanemarljive trostruke ili interakcije višeg reda. Suma kvadrata koja odgovara ovim interakcijama se kombinuje da daje procenjenju sumu kvadrata ostataka i replikati u tom slučaju nisu potrebni. Eksperimentalni dizajn, u kome se pretpostavlja da su interakcije višeg reda zanemarljive i da su sve moguće kombinacije faktorskih nivoa dovoljne za procenu glavnog i interakcije dva faktora, naziva se nekompletni faktorijalni dizajn. Najpopularniji nekompletni faktorijalni dizajn je „Plackett-Burman”, koji obezbeđuje informacije o efektima faktora, ali ne i njihovim interakcijama [11].

Dodatni problem u korišćenju faktorijalnog dizajna za određivanje faktora koji imaju značajan uticaj na odgovor, uočava se kod faktora koji su kontinuirane promenljive, a njihovi efekti zavise od nivoa. Ako su visok i nizak nivo preblizu, efekat odgovarajućeg faktora se može pokazati kao nesignifikantan, iako unutar mogućeg opsega nivoa to nije. Suprotno, ako su nivoi predaleko mogu se nalaziti sa obe strane maksimuma i opet pokazati nesignifikantan odgovor. Rešenje ovog problema je upotreba dizajna sa tri nivoa, umesto sa dva, koji se naziva dizajn površine odgovora, jer se za model koristi kriva površine odgovora [11].

2.2.2. Metoda površine odgovora

Metodu površine odgovora razvio je Box zajedno sa saradnicima pedesetih godina prošlog veka. Termin potiče od grafičkog prikaza izračunatog matematičkog modela i široko je prihvaćen u tekstovima hemometrije. Sastoji se iz grupe matematičkih i statističkih tehnika koje se zasnivaju na uklapanju saglasnosti empirijskih modela i eksperimentalnih podataka dobijenih eksperimentalnim dizajnom. Za opisivanje proučavanog sistema i modelovanje eksperimentalnih uslova do optimizacije koriste se linearne ili kvadratne polinomne funkcije [10].

Neke strategije primene ove metode kao tehnike optimizacije obuhvataju:

- 1) selekciju nezavisnih promenljivih sa najvećim uticajem;
- 2) dizajn serije eksperimenata za adekvatna i pouzdana merenja odgovora od interesa;
- 3) matematičko-statističku obradu dobijenih eksperimentalnih podataka;
- 4) evaluaciju uklapanja modela;
- 5) verifikaciju neophodnosti i mogućnost premeštanja u pravcu optimalnog regiona;
- 6) pronalazak optimalnog seta eksperimentalnih parametara za svaku ispitivanu promenljivu [10].

2.2.2.1. Selekcija faktora koji utiču na sistem

Kada se identifikuju različiti faktori i interakcije koji utiču na rezultate eksperimenta, potrebne su posebne metode za određivanje kombinacije nivoa faktora koji obezbeđuju optimalni odgovor. Optimalni odgovor može da bude maksimalni signal merenja instrumenta (najviša apsorbancija ili intenzitet emisije), maksimalni odnos signala i šuma, najbolja rezolucija, ali i minimalni odgovor (ispitivanja interferirajućih signala). U praksi, veliki broj eksperimenata se završi bez uspeha, jer njihov cilj nije bio dovoljno razjašnjen i zato je neophodno da se unapred tačno predvidi cilj procesa optimizacije. Da se ne bi rasipalo vreme na nepotrebne eksperimente, pre procesa optimizacije potrebno je identifikovati značajne faktore i interakcije, kao i faktore sa malim, ili bez uticaja. Na

osnovu iskustva eksperimentatora i fizičkog ograničenja sistema bira se tačan nivo ispitivanih faktora [11].

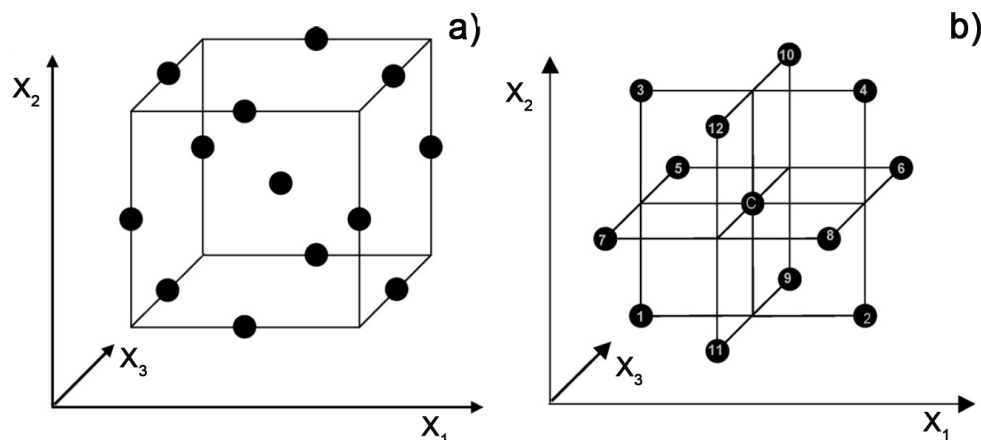
Preliminarni eksperimenti su korisni za određivanje nekoliko ključnih eksperimentalnih promenljivih i njihovih interakcija koje su signifikantne. U ove svrhe može se koristiti kompletni ili nekompletni faktorijalni dizajn, jer su efikasni i ekonomični. Nakon identifikacije glavnih parametara, važno je odrediti njihov opseg, jer on direktno utiče na uspešnost optimizacije [10].

2.2.2.2. Odabir eksperimentalnog dizajna

Pre primene RSM tehnike, prvo je neophodno izabrati eksperimentalni dizajn za definisanje eksperimenata koji će se sprovesti. Ako set podataka ne sadrži krivinu, koriste se modeli prvog reda, kao što je faktorijalni dizajn. Za evaluiranje krivine može da se koristi centralna tačka u faktorijalnom dizajnu sa dva nivoa. Kada se linearnom funkcijom ne može opisati odgovor na eksperimentalne podatke, koristi se dizajn kvadratne površine odgovora: faktorijalni dizajn sa tri nivoa, „Box-Behnken”, centralno kompozitni i „Doehlert” dizajn [10].

Kompletni faktorijalni dizajn sa tri nivoa je eksperimentalna matrica sa ograničenom primenom u RSM u slučaju kada je broj faktora veći od dva, jer je broj eksperimenata potrebnih za ovaj dizajn veoma veliki [10].

Box i Behnken predložili su kako da se izaberu tačke iz faktorijalnog aranžmana sa tri nivoa da bi se obezbedila efikasna procena koeficijenata prvog i drugog reda u matematičkom modelu. „**Box-Behnken**” je sferni dizajn koji može da se rotira i zasniva se na nekompletnom faktorijalnom dizajnu sa tri nivoa. Sastoji se iz jedne centralne tačke u sredini i eksperimentalnih tačaka koje su locirane na sferi i jednako udaljene od centralne (slika 2.4.a). Na slici 2.4.b prikazana su tri međusobno spojena 2^2 faktorijalna dizajna sa centralnom tačkom [10,12].



Slika 2.4. „Box-Behnken” eksperimentalni dizajn a) kocka sa centralnom tačkom i b) tri međusobno spojena 2^2 faktorijalna dizajna [12]

Centralno kompozitni dizajn predložili su Box i Wilson. Sastoji se iz sledećih delova: celokupnog faktorijalnog ili frakcionalnog faktorijalnog dizajna; dodatnog dizajna, često u obliku zvezde, čije eksperimentalne tačke su na α udaljenosti od njenog centra i centralne tačke [10].

„Doehlert” dizajn je praktična i ekonomična alternativa vezana za eksperimentalne matrice drugog reda. Dizajn opisuje cirkularni domen za dve, sferni za tri, hipersferni za više od tri promenljive. Iako njegove matrice ne mogu da se rotiraju kao kod prethodnih dizajna, njegove prednosti su visoka efikasnost i što ne zahteva mnogo eksperimentalnih tačaka [10].

Kodifikacijom nivoa promenljivih transformiše se svaka proučavana vrednost u koordinate unutar skale sa dvodimenzionalnim vrednostima, koje moraju biti proporcionalne i lokalizovane u eksperimentalnom prostoru. To omogućava istraživanje promenljivih različitog reda, bez većeg uticaja na evaluaciju [10].

2.2.2.3. Matematičko-statistički tretman podataka

Nakon dobijanja eksperimentalnih podataka, neophodno je uklapanje u matematičku jednačinu da bi se objasilo ponašanje odgovora prema nivou proučavanih vrednosti. Odnosno, važno je proračunati parametar b u jednačini 2.1:

$$y = X_{m \times n} b_{n \times 1} + e_{m \times 1} \quad (2.1)$$

gde je y vektor odgovora, X matrica odabranog eksperimentalnog dizajna, b vektor parametara modela, e ostatak, m linija, a n kolona matrica. Ova jednačina se rešava statističkim pristupom koji se zove metoda najmanjih kvadrata. Metoda najmanjih kvadrata se definiše kao tehnika višestruke regresije, koja se zasniva na pretpostavci da su nasumične greške identično distribuirane sa nultom srednjom vrednošću i zajedničkom nepoznatom varijacijom i da su međusobno zavisne. [10].

2.2.2.4. Evaluacija uklapanja modela

Nakon dobijanja regresionih koeficijenata, procenjeni odziv se jednostavno računa uz pomoć jednačine modela. Uobičajeno ponašanje sistema je nepoznato, stoga je neophodno dobro proveriti uklapanje modela sa eksperimentalnim podacima [13].

Najpouzdaniji način za evaluaciju uklapanja modela je primena analize varijanse (ANOVA). Glavna ideja analize varijanse je poređenje varijacija usled obrade (promene u kombinaciji nivoa promenljivih) sa promenama usled nasumičnih grešaka, koje su u vezi sa merenjima dobijenog odgovora. Na osnovu ovog poređenja, moguće je evaluirati signifikantnost regresije korišćene da predvidi odgovore uzimajući u obzir izvor eksperimentalne varijacije. Signifikantnost regresije može se proceniti upoređivanjem varijacija regresija i ostataka pomoću Fišerove distribucije (Fišerovog testa) [10].

Za verifikaciju adekvatnosti modela koristi se i predviđanje greške sume kvadrata (PRESS, „Prediction error sum of squares”) i testiranje nepodesnosti modela („lack of fit”). Potrebno je da test „lack of fit” bude nesignifikantan. Kvalitet predviđenog modela često se objašnjava koeficijentom determinacije (R^2), koji se računa iz predviđanja PRESS. Potrebno je da vrednost R^2 bude bliska 1.0, međutim visoke vrednosti se ponekad dobijaju i kod modela koji nisu dobri [13].

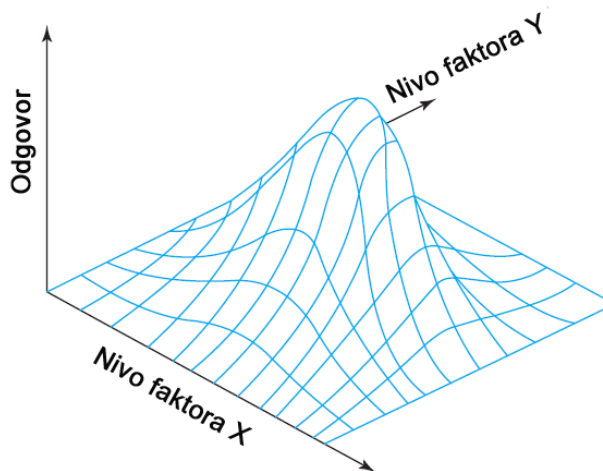
2.2.2.5. Određivanje optimalnih uslova

Kritična tačka u kvadratnom modelu je određena maksimumom, minimumom i prevojem, pa se njene koordinate mogu izračunati na osnovu matematičke funkcije koja opisuje odgovor površina i izjednačava je sa nulom. Primer kvadratne funkcije sa dve promenljive je sledeći (jednačina 2.2.):

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad (2.2.)$$

Kritična tačka se pronalazi računanjem $\partial y / \partial x_1$ i $\partial y / \partial x_2$ i izjednačavanjem sa nulom, a nakon rešavanja sistema jednačina dobiju se vrednosti za x_1 i x_2 , koje ukazuju na kodirane vrednosti nezavisnih parametara sa najvišim ili najnižim odgovorom [10,13].

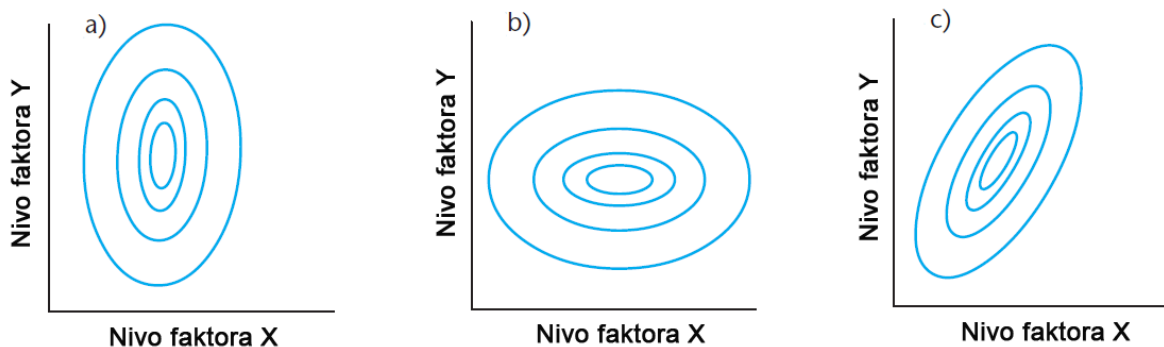
Vizuelizacija predviđene jednačine kvadratnog modela dobija se konturnim i trodimenzionalnim dijagramima. RSM dijagram teorijski je trodimenzionalni prikaz koji pokazuje vezu između odgovora i nivoa nezavisnih faktora (slika 2.5). Ciljni optimum na površini odgovora je vrh prevoja [10,11].



Slika 2.5. Površina odgovora dva faktora [11]

Dvodimenzionalni prikaz površine naziva se konturni dijagram u kome su linije konstantnog odgovora nacrtane u području nezavisnih promenljivih. Kada je oblik konturnih linija u obliku elipse ili kruga, centar sistema odgovara tački maksimuma ili minimuma odgovora. Kada nema interakcija između faktora površina odgovora je u obliku

prikazanom na slikama 2.6.a i 2.6.b. Ako postoji interakcija između dve promenljive površina odgovora je u obliku kao na slici 2.6.c [10,11].



Slika 2.6. Uprošćeni konturni dijagrami: a) i b) bez interakcije između X i Y i c) signifikantna interakcija između X i Y [11]

2.2.3. Primena RSM-a za optimizaciju produkcije EPS-a

Poslednjih godina metoda površine odgovora postala je veoma popularna u različitim istraživanjima, koja za cilj imaju dizajn i razvoj optimizacije. Uspešno se primenjuje za optimizaciju sastava podloga za produkciju EPS-a. Osim za optimizaciju, ova metoda se može koristiti u određivanju kinetičkih konstanti i istraživanju stabilnosti i kinetike enzima [14].

2.2.3.1. Optimizacija produkcije dekstrana primenom RSM-a

Za produkciju glukana komercijalno se koriste vrste roda *Leuconostoc*. U zavisnosti od glikozidnih veza u glavnom lancu glukana, ova vrsta proizvodi dekstran, mutan i/ili alternan. Glukani su potencijalni terapijski agensi, a koriste se i kao stabilizatori, emulgatori, zaslađivači i agensi za geliranje i vezivanje vode [15].

Majumder i saradnici (2009) su koristili soj *Leuconostoc dextranicum* NRRL B-1146 u istraživanju optimalnih uslova za proizvodnju α -1,6 glukana, odnosno, dekstrana [15]. Prvo je, upotrebom faktorskog dizajna sa dva nivoa, ispitivano 11 nezavisnih promenljivih koje potencijalno utiču na produkciju i dobijeno je da tri promenljive

(koncentracija saharoze, ekstrakta kvasca i peptona) signifikantno poboljšavaju proces. Potom su, pomoću „Box-Behnken” dizajna sa tri nivoa, ispitivane njihove interakcije, radi dobijanja maksimalnog prinosa polisaharida. Efikasnost modela proverena je koeficijentom determinacije (0,9865), što je objasnilo 98,65 % promenljivosti odgovora. Optimalni sastav podloge, kako je dobijeno modelom, sadržavao je 5,95 % saharoze, 0,52 % peptona i 2,9 % ekstrakta kvasca. Ovaj sastav predvideo prinos od 1063 mg/L glukana, što se slagalo eksperimentalno dobijenim 1015 ± 45 mg/L [15,16].

2.2.3.2. Optimizacija produkcije velan gume primenom RSM-a

Velan guma je anjonski egzopolisaharid koga proizvode pripadnici roda *Alcaligenes*. Glavni niz ovog polisaharida sastoji se od tetrasaharidnih ponavljajućih jedinica koje čine glukoza, glukuronska kiselina i ramnoza u odnosu 2:2:1, a bočni lanci su od ramnoze i manoze. Zahvaljujući velikom viskozitetu u vodenim rastvorima, čak i u širokom opsegu temperatura i pH vrednosti, ovaj polisaharid poseduje veliki komercijalni potencijal u industriji hrane [17].

Li i saradnici (2012) ispitivali su efekat tri promenljive: koncentracije aditiva (Tween-40), pH i temperature na produkciju velan gume soja *Alcaligenes sp.* CGMCC2428, koristeći centralno kompozitni dizajn i metodu površine odgovora. Razmatrani su modeli čiji je R^2 veći od 0,9 (0,9551), što je ukazivalo da se eksperimentalni podaci uklapaju sa modelom i objašnjavaju efekte ispitivanih promenljivih. Prema analizi metodom površine, dobili su da je maksimalni prinos velan gume (23,48 g/L) kada je pH 6,9, temperatura inkubacije 29,6 °C, a koncentracija Tween-40 0,94 g/L. Predviđena vrednost je bila u saglasnosti sa eksperimentalno dobijenom od 23,62 g/L [17].

2.2.3.3. Optimizacija produkcije pululana primenom RSM-a

Pululan je homopolimer koga proizvodi *A. pullulans* i sastoji se iz ponavljajućih maltotrioznih subjedinica. Može se koristiti za premazivanje i pakovanje hrane i kao

niskokalorijski dodatak ishrani. Takođe, istražuje se i njegova biomedicinska primena u distribuciji lekova, inženjeringu tkiva i zaceljivanju rana [9,18].

Jiang (2010) je pomoću RSM-a dokazao da su optimalni uslovi za maksimalno dobijanje pululana iz soja *A. pullulans* SK1002: temperatura 28 °C, vreme fermentacije 5 dana i inicijalno pH 5,5. Pri pomenutim uslovima predviđen je prinos od 30,28 g/L pululana, što je bilo u saglasnosti sa eksperimentalno dobijenim podacima (30,26 g/L) [19]. Iz rezultata istraživanja Chen-a sa saradnicima (2012) primenom RSM-a vidi se da na proizvodnju pululana soja *A. pullulans* CJ001, izolovanog iz morskog mulja u Istočnoj Kini, značajno utiču tri komponente podloge: NaCl, K₂HPO₄ i (NH₄)₂SO₄. Upotrebom modelom preporučenih koncentracija pomenutih komponenti dobijene su koncentracije pululana bliske maksimalnim predviđenim [18].

Istraživanje Choundhury-ja i saradnika (2012) u kojim je takođe korišćena RSM je pokazalo rezultate produkcije pululana, koji su bili znatno viši u odnosu na prethodno objavljene (70,43 g/L). Oni su koristili centralno kompozitni dizajn i ispitivali interakcije između različitih koncentracija glukoze, ekstrakta kvasca i peptona u podlozi. Pokazano je da se maksimalna proizvodnja polisaharida dobija upotrebom podloge sledećeg sastava: 15,5 % glukoze, 3,68 % ekstrakta kvasca i 1,75 % peptona. Dobijeni prinos je bio tri puta veći u poređenju sa neoptimizovanom podlogom, kada se koristila 5 % glukoza i 1,5 puta sa 10 % glukozom kao izvorom ugljenika [9].

2.2.3.4. Optimizacija produkcije levana primenom RSM-a

Levan je neutralni fruktan koga sintetišu mikroorganizmi rodova *Zymomonas*, *Streptococcus*, *Xanthomonas*, *Bacillus* i *Pseudomonas*. Jathore sa saradnicima (2012) je optimizovao podlogu za produkciju levana bakterije *Pseudomonas fluorescens*, tehnikom jedne promenljive u vremenu praćene „Plackett-Burman” statističkim dizajnom i RSM-om. Prinos levana je značajno porastao od 5,27 g/L do 15,42 g/L kada se fermentacija odvijala u optimizovanoj podlozi. Sastav optimizovane podloge je bio: 60 g/L saharoze, 1,5 g/L amonijum-hlorida i 2,0 g/L natrijum-nitrata [20].

Karthiga Devi i Alamu (2013) su ispitivali optimalne uslove za proizvodnju levana bakterije *Bacillus subtilis*. Kao značajni faktori koji utiču na produkciju levana *B. subtilis* pokazali su se: temperatura, pH vrednost i koncentracija nejonskog surfaktanta (Tween 80). Za određivanje maksimalnog prinosa levana i procenu optimalnih vrednosti ispitivanih faktora korišćen je centralno kompozitni dizajn. Optimalne vrednosti promenljivih bile su: 0,975 g/L Tween 80, pH=7,0 i temperatura od 37 °C, a predviđeni prinos levana 62,14 g/L. Eksperimentalno dobijen prinos levana pri optimalnim uslovima predviđenim modelom bio je 59,00 g/L [21].

Z. mobilis je Gram negativna bakterija koja proizvodi etanol, ali i druge proizvode kao što su levan, sorbitol, glukuronska kiselina i fruktooligosaharidi. Silbir sa saradnicima (2014) je ispitivao produkciju levana soja *Z. mobilis* B-14023 pomoću RSM. U finalnoj fermentaciji korišćena je podloga sa hidrolizovanim skrobom u kome su optimalni nivoi koncentracije inicijalnog supstrata, vremena inkubacije i pH bili: 299,1 g/L, 42,3 h i 6,0. Maksimalni prinos levana od $40,2 \pm 0,57$ g/L bio je veoma blizak modelom predviđenim (42,6 g/L) nakon trajanja fermentacije od 42,3 h [22].

2.3. Upotreba alternativnih izvora ugljenika za produkciju egzopolisaharida

Za kultivaciju većine mikroorganizama radi proizvodnje polisaharida najčešće korišćeni izvori ugljenika su glukoza i saharoza. Pošto cena podloge za fermentaciju čini 30 % ukupne vrednosti procesa, postoji potražnja za jeftinijim supstratima. Za proizvodnju različitih mikrobnih EPS-a predloženi su različiti otpadni proizvodi poljoprivrede i prerade hrane: surutka, otpad paste od paradajza, otpad voćne pulpe, šećerna trska [4].

Upotrebom hidrolizata pšenične slame za produkciju bakterijske celuloze pomoću *G. xylinis* dobija se viši prinos (8,3 g/L), nego u podlozi sa glukozom (4,5 g/L). Ostaci nakon mlevenja maslina su takođe korišćeni za proizvodnju bakterijske celuloze *G. xylinis*, ali je dobijeni prinos bio manji (0,81 g/L). Hidrolizat kuhinjskog otpada ispitivaj je kao supstrat za sintezu ksantana pomoću *X. Campestris* LRELP-1, a dobijeni prinos je bio 11,73 g/L [4].

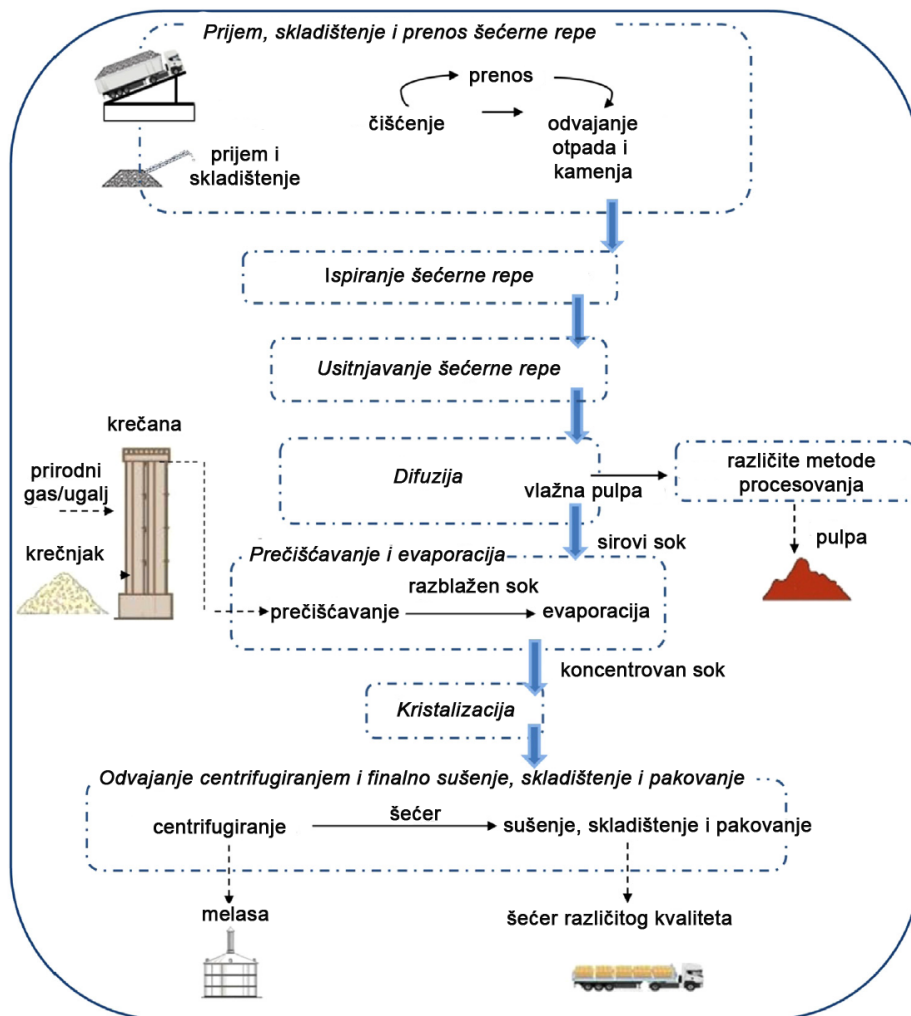
Pokazano je da neke vrste otpada iz stočarstva mogu da budu korisni za proizvodnju pululana (18 - 84 g/L), približno kao što je glukoza (22 - 89 g/L). Upotreba soka šećerne trske, melase od šećerne trske i vode iz kokosa se takođe pokazala pogodnom za proizvodnju skleroglukana (12 – 24 g/L), što je bilo blisko upotrebi saharoze (16 – 26 g/L) [4].

Upotreba otpadnih supstrata u bioprocima najčešće prvo zahteva specifične uslove pretretmana, što povećava cenu proizvodnje polimera. Takođe, upotreba alternativnih supstrata može da ima negativan efekat na prinos, produktivnost i sastav sintetisanih polisaharida. Upotreba jeftinijih supstrata u nekim slučajevima može povećati cenu procesa, jer se dobijaju manje čisti proizvodi [4].

2.3.1. Melasa

Melasa je bogati izvor ugljenika i nastaje kao sporedni proizvod industrije šećera, nakon prerade šećerne repe ili šećerne trske [23]. Pošto je poljoprivredni proizvod, njen sastav zavisi od kvaliteta šećerne repe ili trske, klimatskih uslova, sastava zemljišta, kao i tehnologije prerade šećerne repe ili trske [24].

Najvažniji cilj industrije šećera je odvajanje šećera maksimalne čistoće od nešećernih materijala kroz niz uzastopnih operacija (slika 2.7.). Najveći gubitak tokom fabričke proizvodnje šećera je stvaranje melase u koraku kristalizacije. Usled visokog viskoziteta i prisustva dodatnih komponenti koje nisu šećeri, melasa slabo kristališe i zbog toga se odvaja iz sistema kao sekundarni proizvod fabrike. Međutim, dobijena melasa se može primeniti u fermentaciji kvasaca, u farmaceutskoj i industriji stočne hrane [25].



Slika 2.7. Shema proizvodnje šećera iz šećerne repe [25]

2.3.2. Upotreba melase za produkciju levana

Levan se generalno produkuje korišćenjem supstrata koji se baziraju na saharozi, a rađeni su eksperimenti dobijanja ovog polisaharida i upotrebom fruktoznih disaharida, melase i soka šećerne trske [20].

Küçükaşık i saradnici (2011) su ispitivali sintezu levana pomoću *Halomonas sp.* koristeći melasu šećerne repe i melasu skroba kao izvor ugljenika. Različiti pretretmani i njihove kombinacije su primenjeni na oba tipa ispitivane melase: tretman kiselinom, podešavanje pH, tretmani trikalcijum-fosfatom i aktivnim ugljem. Prinos levana koji su dobili je iznosio 12,4 g/L. Ovi autori su dali i pregled još dva proizvođača levana u

sistemima sa alternativnim izvorom ugljenika *Paenibacillus polymyxa* i *Zymomonas mobilis* (Tabela 2.1). U slučaju *P. polymyxa* NRRL B-18475 prinos levana u prisustvu šećerne repe i sirupa šećerne trske je bio veoma nizak, pa je pepton dodavan u sirup šećerne trske, a melasa je pretretirana kroz gel-filtracione i jonoizmenjivačke kolone. Melasa i sirup šećerne trske za proizvodnju levana *Zymomonas mobilis* su tretirani centrifugiranjem i filtracijom, ali su teorijski prinosi bili niži nego kod ostala dva soja [26].

Tabela 2.1. Mikrobnii sistemi koji proizvode levane iz alternativnih izvora ugljenika [26]

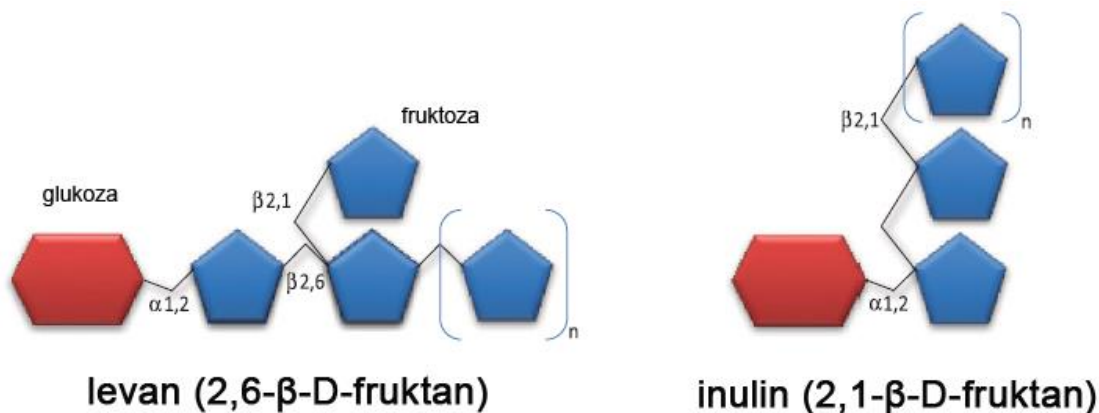
Mikroorganizam	Supstrat	Prinos levana (g/L)	Produktivnost levana (g/L/dan)	Teorijski prinos (%)	Referenca
<i>Halomonas sp.</i> AAD6	melasa šećerne repe (30 g/L)	12,4	1,42	79	Küçükaşık et al. (2011)
	saharoza (50 g/L)	1,84	1,08	7	Poli et al. (2009)
<i>Paenibacillus polymyxa</i> EJS-3	saharoza (188,2 g/L)	35,3	14,1	36	Liu et al. (2010)
<i>P. polymyxa</i> NRRL B-18475	melasa šećerne repe (150 g/L)	38,0	3,80	48	Han i Watson (1992)
	sirup šećerne trske (150 g/L)	19,6	1,96	25	Han i Watson (1992)
	saharoza (150 g/L)	36,0	3,60	46	Han i Watson (1992)
<i>Zymomonas mobilis</i> ATCC 31821	melasa šećerne trske (250 g/L)	2,53	2,53	2	Oliveira et al. (2007)
	sirup šećerne trske (250 g/L)	15,5	15,5	5	Oliveira et al. (2007)
	saharoza (250 g/L)	21,7	21,7	16	Oliveira et al. (2007)

2.4. Fruktani

Fruktani su oligo- ili polisaharidi koji se sastoje od fruktoznih monosaharidnih jedinica, a proizvode ih različite vrste biljaka, bakterija, gljiva i algi. Osnovna podela polifruktozida se zasniva na vrsti glikozidne veze koju grade monomerne komponente (slika 2.8): inulini (β -(D)-fruktofuranozni polimeri povezani β -(2 \rightarrow 1) vezom i grananjima kroz β -(2 \rightarrow 6) vezu) i levani (β -(D)-fruktofuranozni polimeri povezani β -(2 \rightarrow 6) vezom i grananjima kroz β -(2 \rightarrow 1) vezu) [27,28].

Fruktooligosaharidi (FOS) privlače veliku pažnju kao funkcionalni zaslađivači, zbog niske kalorijske vrednosti, sposobnosti da stimulišu rast/aktivnost korisnih

mlečnokiselinskih bakterija u crevu i stimulišu intestinalni imuni odgovor. Prebiotska aktivnost FOS-a zavisi od njihove strukture, odnosno nivoa polimerizacije i vrste glikozidne veze. Trenutno komercijalno dostupni fruktooligosaharidi su inulinskog tipa, ali postoji veliki interes za razvoj fruktooligosaharida levanskog tipa [27,28].



Slika 2.8. Struktura levana i inulina [30]

Fruktopolisaharidi su rezervni ugljeni hidrati kod biljnih proizvođača, dok je kod mikrobnih biološka uloga FOS-a kao protektivni agens. Međutim, fruktopolisaharidi izolovani iz prirodnih izvora mogu se primeniti u industriji biodegradabilne plastike, kozmetike, lepkova, tekstila i detergenata. Za razliku od glukana, kao što su skrob i celuloza, fruktani nisu digestibilni, odnosno u gastrointestinalnom traktu ne postoje enzimi koji ih hidrolizuju, što ih čini odličnim kandidatima za prebiotike [29,30].

Inulin je široko dostupan decenijama i komercijalno se proizvodi ekstrakcijom iz biljaka, kao što je cikorija. Najveće tržište za inulin je industrija hrane, a tržište levana je daleko manje, ali u usponu. Početkom sedamdesetih godina prošlog veka u Sjedinjenim Američkim Državama kompanija „Economics Laboratory Inc.” je prva započela komercijalnu proizvodnju levana. Danas levan proizvode mnoge kompanije uključujući: „Natural Polymers Inc.” iz u Sjedinjenih Američkih Država pomoću *Bacillus subtilis*, „Real Biotech Co. Ltd.” iz Koreje koristeći *Zymomonas mobilis* i japanski „Advances Co. Ltd.” Pomoću bakterije *Streptococcus salivarius*. Kineska kompanije „Shadong Jinmei Biotechnology” dobija fermentacijom brojne biopolimere i nedavno je dodala levan u listu

proizvoda, a „Shaanxi Wuzhiyuan Biotech Co.” prodaje levan čiji je producent *Serratia levanicum* [30,31].

2.5. *Levan*

Za više od sto godina istraživanja identifikovane su brojne primene polisaharida levana, ali je komercijalno realizovano samo nekoliko, jer se još uvek ne proizvodi na industrijskom nivou. Prva identifikacija levana pripisuje se Lipmanu, jer je u periodu od 1870. godine do 1881. godine koristio termin „lävulan” da bi opisao gumu koja se dobija iz melase u industriji šećerne repe. Australijski bakteriolozi Greig-Smith i Steel su 1901. godine prvi predložili termin levan za levorotatorni analog dekstrana koji je izolovan iz *Eucalyptus stuarina*. U periodu od 1870. do 1940. godine polje istraživačkog interesovanja bilo je fokusirano na biosintezu, proizvodnju i dobijanje levana, posebno u Nemačkoj, gde je privukao pažnju istraživača i otvorio nove horizonte u primeni polimera, dok je u Sjedinjenim Američkim Državama počelo da se razvija komercijalno tržište za polisaharide [31,32].

Levan proizvodi širok spektar mikroorganizama u vidu egzopolisaharida i ograničen broj biljnih vrsta, kao nestrukturani ugljeni hidrat. Glavni biljni izvori levana su: stabljika i kora lišća češljaste pirovine (*Agropyron cristatum*), ježevice (*Dactylis glomerata*) i pacifičke plave trave (*Poa secunda*). Levan se nalazi i u mekoj pšenici (*Triticum aestivum*) i japanskoj mlečiki (*Pachysandra terminalis*). Mikroorganizmi koji proizvode levan su Gram pozitivne i Gram negativne bakterije, kvasci i gljive. Najpoznatiji mikrobnih proizvođači levana spadaju u rodove: *Zymomonas*, *Bacillus*, *Acetobacter*, *Aerobacter*, *Pseudomonas*, *Ervinia*, *Gluconobacter*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* [32,33].

Levan proizveden u različitim organizmima se razlikuje i u molekularnoj masi i stepenu grananja. Biljni levani obično imaju relativno nizak nivo polimerizacije, odnosno sadrže manje od sto fruktofuranosnih ostataka sa molekularnim masama reda veličine od 10^4 Da. Sa druge strane, mikrobnih levani uglavnom imaju viši stepen polimerizacije (više od 10 000 monomernih ostataka) i molekularne mase u opsegu između 10^5 i 10^7 Da [34,35].

2.3.1. Mikrobni proizvođači levana

Kao i kod drugih EPS na produkciju levana veoma utiče vrsta mikroorganizma, ali i uslovi fermentacije kao što su: temperatura, pH, koncentracija kiseonika, konfiguracija bioreaktora i podloga [31].

2.3.1.1. *Bacillus licheniformis*

Vrsta mikroorganizma koja je korišćena u ovom radu, *Bacillus licheniformis*, pripada Gram pozitivnom rodu bakterija *Bacillus*. Rod *Bacillus* je prvi član familije *Bacillaceae*, koja je deo reda *Bacillales*. U rodu *Bacillus*, grupa *B. subtilis* obuhvata, pored vrsta *B. subtilis* i *B. licheniformis*, još tri fiziološki slične vrste: *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus* i *B. pumilus*. Ime *licheniformis* poreklom je od grčke reči „lichen”, koja znači lišaj i sufiksa „formis”, što znači u obliku nečega, tako da se ova složenica može prevesti: u obliku lišaja [36,37].

Bacillus licheniformis je sporogeni fakultativni anaerob i pokretni štapić. Široko je rasprostranjen u zemljištu i drugim sredinama, uključujući mleko, hranu, perje, unutrašnje tkivo biljaka, kožu, papir, karton, površine kamenja, antičke spomenike itd. Čelije se pojavljuju samostalno, u parovima ili lancima. Kao i kod vrste *Bacillus subtilis*, morfologija je promenljiva u okviru soja i između njih, pa može dati izgled mešanih kolonija. Kolonije su okrugle ili nepravilnog oblika i umerenog (2 - 4 mm) prečnika sa talasastim ili fimbrijalnim ivicama. Boja im je beličasta, a može da postane krem ili braon. Opseg tekstura je od vlažne, puteraste ili mukoidne, preko membranozne sa mukoidnim matriksom, do suve i neravne sa pokoricom. Ove kolonije, koje podsećaju na lišajeve, jako adheriraju na agar [36].

Minimalna temperatura rasta je 15 °C, a maksimalna 50 – 55 °C, međutim detektovani su i izolati iz geotermalnih uslova koji rastu na 68 °C. Opseg pH vrednosti na kojima raste ovaj mikroorganizam je 5,7 – 6,8, a raste pri koncentraciji natrijum-hlorida do 7 %. Daje pozitivan test na katalazu i arginin-hidrolazu, dok je na oksidazu promenljiv. Iz saharoze *B. licheniformis* ekstracelularno sintetise dekstran i levan. Većina sojeva koristi

citrat i propionat kao jedini izvor ugljenika, a može da redukuje nitrat u nitrit i da proizvodi kiseline bez gasa iz glukoze i širokog spektra drugih ugljenih hidrata. Na površini ćelija akumulira jone metala neenzimskim putem pomoću adsorpcije, što može biti od važnosti za tretiranje otpada [36,38].

B. licheniformis je 1981. godine naveden u trećem izdanju „Food Chemical Codex”-a, kao izvor karbohidraze i proteaze u preparatima enzima koje se koriste u obradi hrane. Ovako dobijene proteaze se takođe upotrebljavaju u industriji detergenata. Još od 1972. godine ovaj mikroorganizam koristi se u fermentaciji na industrijskom nivou za proizvodnju tekstila i papira, kao i amilaze za hidrolizu skroba. Osim pomenutih, dobijaju se i industrijske penicilinaze, pentozanaze, cikloglikoziltransferaze, β -manaze i neki pektinolitički enzimi. Zbog toga je *B. licheniformis* atraktivan domaćin za ekspresiju kloniranih genskih produkata u industrijskim razmerama. Specifični sojevi se koriste za dobijanje peptidnih antibiotika, kao što su bacitracin i proticin, zatim za brojna specijalna jedinjenja: inozin, inozinsku, limunsku i poli- γ -glutaminsku kiselinu. Neki izolati *B. licheniformis* mogu ublažiti efekte gljivične patogeneze na kukuruzu, travama i povrtnim usevima. Potencijalno se može iskoristiti kao prirodni agens biokontrola, pošto poseduje sposobnost preživljavanja u nepovoljnim uslovima okoline zahvaljujući formiranju endospora [37,38].

2.3.1.2. Ostali Gram pozitivni proizvođači levana

U Gram pozitivne proizvođače levana spadaju rodovi *Bacillus*, *Paenibacillus* i *Geobacillus* [31].

Komercijalni *Bacillus subtilis* (natto) Takashi je dugo vremena ispitivan za produkciju većih količina levana. Visoki prinosi levana su dobijeni nakon optimizacije uslova fermentacije u šaržnoj kulturi sa mešanjem (49,4 g/L), imobilizovanim ćelijama u alginatu (70,6 g/L) i različitim uslovima bioreaktora (61 g/L i 100 g/L). Pokazano je da *B. subtilis* CCT 7712 proizvodi 111,6 g/L levana u podlozi sa 400 g saharoze, a *Bacillus methylotrophicus* SK 21.002 do 100 g/L levana na 300 g saharoze. *Bacillus lentus* V8 proizvodi 57,95 g/L levana u podlozi sa saharozom, a 49,86 g/L koristeći melasu [31].

Prva vrsta roda *Paenibacillus* za koju je pokazano da sintetiše levan je *Paenibacillus polymyxa*. Soj *P. polymyxa* EJS-3 proizvodi dva EPS levanskog tipa, od kojih jedan ima strukturu sa fruktoznim i manoznim ostacima na granama, a na optimizovanoj podlozi prinos levana je iznosio 35,26 g/L [31].

Microbacterium laevaniformans je još jedan proizvođač levana koji fermentacijom na saharoznoj podlozi dostiže prinos levana od 48,9 g/L. Rodovi mlečnokiselinskih bakterija *Streptococcus*, *Leuconostoc* i *Lactobacillus* takođe sintetišu levan, ali su studije na njima više fokusirane na dobijanje enzima, nego produkciju levana kultivacijom intaktnih bakterija [31].

2.3.1.3. Gram negativni proizvođači levana

Iako je 1990. godine za rod *Acetobacter* pokazano da proizvodi levan, tek 5 godina kasnije objavljena je prva detaljna studija o biosintezi levana pomoću endofitskog azotofiksatora *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Soj *G. diazotrophicus* PAI 5 proizvodi 24,7 g/L levana na 100 g saharoze i bez suplementacije azotom. Takođe, još dva soja *Gluconacetobacter xylinus* NCI 1005 i I2281, koji proizvode različite egzopolisaharide, produkuju i levan na podlogama sa saharozom. Ostale acetobakterije koje proizvode levan su: *Acetobacter xylinum* NCIM 2526, *Gluconacetobacter frateurii* TMW 2,767, *Gluconacetobacter cerinus* DSM 9533T, *Neoasaia chiangmaiensis* NBRC 101099 i *Kozakia baliensis* DSM 14400 [31].

Aerobna, Gram negativna bakterija *Halomonas smyrnensis* AAD6T pored levana, proizvodi i katjonske EPS-ove sa parcijalno acetilovanim N-acetilgalaktozaminskim i N-acetilglukozaminskim ostacima, a ima i genetički kapacitet za akumuliranje polihidroksialkanoata i osmoprotektanata [31].

Prvi put je pokazana proizvodnja levana pomoću bakterije *Zymomonas mobilis* 1966. godine. Statističkom optimizacijom u prisustvu saharoze dobijen je prinos levana od 14,67 g/L soja *Z. mobilis* ZAG-12, a 21,69 g/L soja ATCC 31821. Kao što je pomenuto u odeljku 2.3.2, *Z. mobilis* ATCC 31821 je korišćen i u eksperimentima optimizacije na alternativnim izvorima ugljenika (melasa, sirup šećerne trske). U optimalnim uslovima

šaržne kultivacije *Z. mobilis* B-14023 dobijeno je 40,2 g/L levana, a rađena je i imobilizacija ovog soja u alginatu. Imobilizacijom *Z. mobilis* CCT 4494 postižu se koncentracije levana u opsegu od 18,84 do 112,53 g/L [31].

Pod anaerobim uslovima, Gram negativna, denitrifikaciona bakterija *Pseudomonas fluorescens* sintetise razgranati levan. Bakterija *Serratia sp.* izolovana iz zemljišta proizvodi levan niskog stepena grananja. Jedna studija je pokazala da *Ervinia herbicola* SRI403 takođe produkuje linearni levan. U drugoj studiji koncentracije komponenti podloge (azot, ugljenik i fosfor), kao i parametri fermentacije (pH, vreme indubacije) su optimizovani za proizvodnju levana soja *E. herbicola* ATCC 15552. Slično tome, *P. pastoris* je korišćen za ekspresiju levansaharaze *G. diazotrophicus* i *L. mesenteroides* [31].

2.3.1.3. Rekombinantna produkcija levana

Bakterija *Escherichia coli* je dominantni domaćin za sintezu levansaharaza. Suprotno *E. coli*, kvasci *Saccharomyces cerevisiae* i *Pichia pastoris* imaju GRAS status i mogućnost da izlučuju rekombinantne proteine u podlogu za kultivaciju. Nedavno je objavljena prva uspešna studija rekombinantnog kvasca sa produkcijom levana u kojoj je ili gen za saharoznu sintazu krompira ili saharozni transporter spanaća integrisan u genom *S. cerevisiae* sa deficitom za invertazu. Kvasac *Hansenula polymorpha* korišćen je za ekspresiju enzima levansaharaze iz *Z. mobilis* [31].

Alternativni domaćini za proizvodnju levana su transgene biljke. Ideja *in vivo* konverzije biljne saharoze u visokomolekulski levan je prvo ispitivana u krompiru i duvanu, koji ekspimiraju gen za levansaharazu iz *B. subtilis*. Generalno, biljke koje ekspimiraju bakterijske fruktoziltransferaze imaju nenormalan fenotip sa bledim i zakrčljanim listovima, što ih čini lošim kandidatima za biotehnošku aplikaciju. Da bi se dobile zdrave transgene biljke, smatra se da je pogodniji pristup proizvodnja niskomolekulskih levana [31].

2.3.2. Fiziološka uloga levana

U biološkim sistemima, levan je multifunkcionalni molekul koji ima različite uloge. Tokom perioda izgladnjavanja levan ima ulogu kao rezerva energije, može biti adheziv, a uključen je i u signalizaciju i rezistenciju od biotičkog i abiotičkog stresa. Zbog osobine da apsorbuje vodu, levan pomaže biljkama i mikroorganizmima da prežive u uslovima ograničene količine vode. Takođe, povećava dostupnost vode u sredinama sa hipersalinitetom. Levan je strukturna komponenta biofilma, koja interaguje sa biološkim membranama i stabilizuje ih mnogo efikasnije od glukana. Furanozni lanci levana su fleksibilniji i manje veličine u odnosu na rigidne piranozne prstenove glukana [30].

Levan kao komponenta biofilma doprinosi virulenciji biljnih patogena *Erwinia amylovora* i *Pseudomonas syringae*. U slučaju *Gluconacetobacter diazotrophicus* levan u okviru biofilma deluje kao barijera za difuziju kiseonika, omogućavajući stvaranje mikroaerobnih uslova potrebnih za fiksaciju azota [31].

2.3.3. Mikrobna biosinteza levana

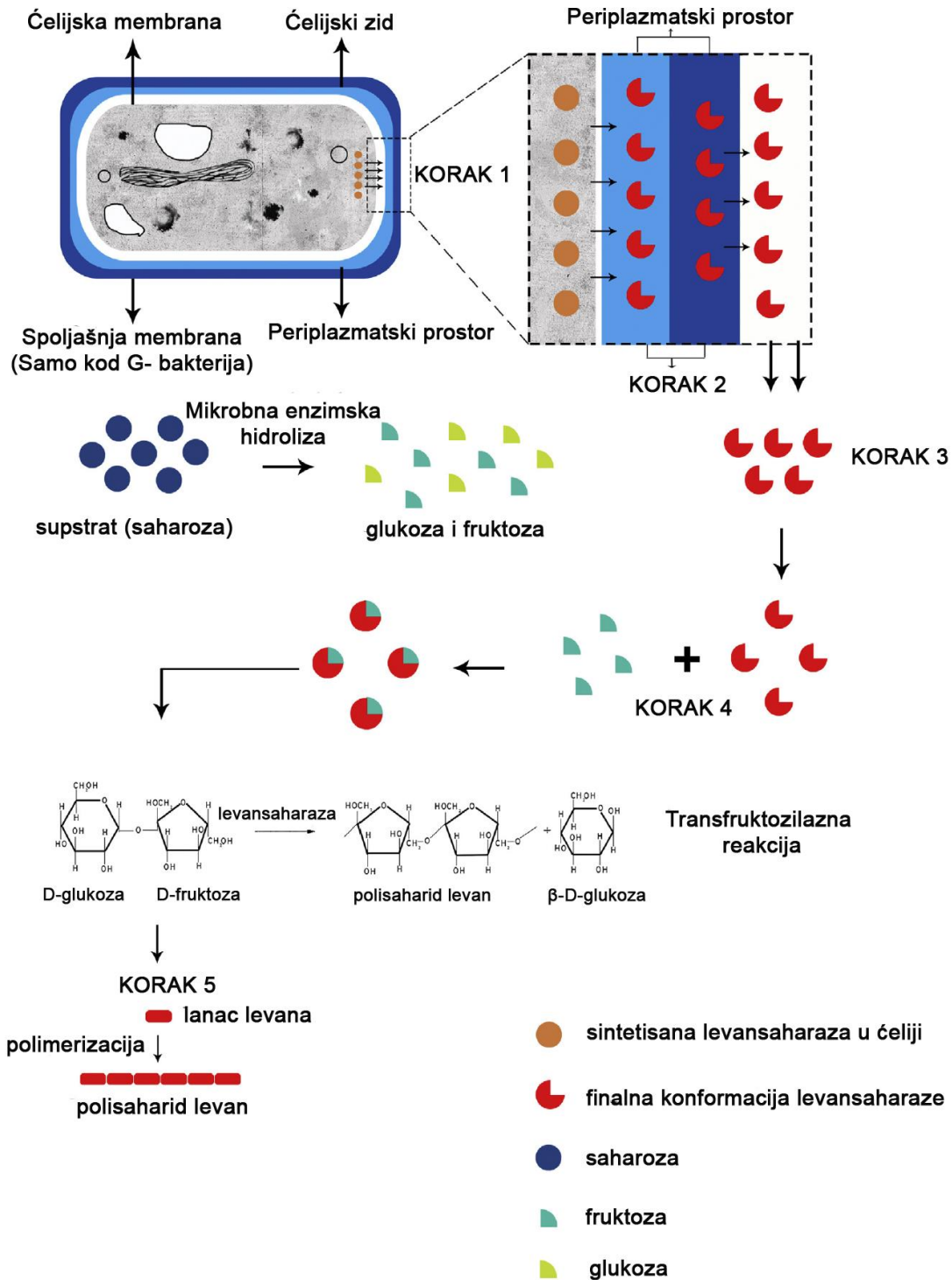
Veoma važnu ulogu u biosintezi fruktana imaju fruktoziltransferaze, grupa enzima sa hidrolitičkom i transfruktozilaznom aktivnošću. Transfruktozilacijom se iseca $\beta(2\rightarrow1)$ veza saharoze i prenosi fruktoza na fruktozilnu grupu akceptorskog molekula, kao što je saharoza, uz oslobađanje glukoze. Fruktoziltransferaza koja katalizuje sintezu levana i levanskog tipa FOS-a, naziva se levansaharaza (E.C.2.4.1.9) i pripada familiji 68 glikozid hidrolaza [39,40].

Većina bakterijskih vrsta ima jedinstven gen za levansaharazu, koji je često prva komponenta hromozomskog operona. Generalno, saharoza je neophodna da indukuje transkripciju levansaharaze rodova *Bacillus*, *Paenibacillus* i *Geobacillus*. Konstitutivna ekspresija enzima je karakteristična za bakterije, koje žive u staništima bogatim saharozom: *Streptococcus salivarius*, *Actinomyces naeslundii*, *Zymomonas mobilis*, *Erwinia amylovora* i *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Studije genske ekspresije i evolutivna analiza su pokazale da su sinteza i degradacija levana isključivi, ali komplementarni procesi vezani za

stanište bakterije domaćina. Kontrola transkripcije enzima levanaze, koji hidrolizuje levan, strogo je kontrolisana i u prisustvu saharoze, nasuprot degradaciji, favorizovana je sinteza levana [31,41].

Mikrobna biosinteza levana je višestepeni proces (Slika 2.8.). Levansaharaza se prvo akumulira u periplazmi, gde dobija finalnu konformaciju, a potom se ekskretuje u spoljašnju sredinu. Generalno, postoje dva mehanizma ekskrecije mikrobne levansaharaze. Kod Gram pozitivnih bakterija, levansaharaza se ekskretuje dvostepenim mehanizmom, koji zavisi od isecanja signalnog peptida i uvijanja proteina. Potom prisustvo eksternih efektor, kao što su joni kalcijuma i gvožđa i/ili pH daju kompletan signal za sekreciju. Ovaj mehanizam je karakterističan za bakterije: *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens* i *B. subtilis*. U slučaju nekih Gram negativnih bakterija, uključujući *Z. mobilis*, *Erwinia amylovora*, *Rahnella aquatilis*, *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* i *P. syringae* pv. *phaseolicola*, izlučivanje levansaharaze je aktivirano mehanizmom nezavisnim od signalnog peptida. Levansaharaza se formira i sekretuje na kiselim pH uslovima ekstracelularne sredine. Aktivnost enzima može biti inhibirana na temperaturama iznad 45 °C i/ili u prisustvu glukoze i polietilen-glikola [3,33].

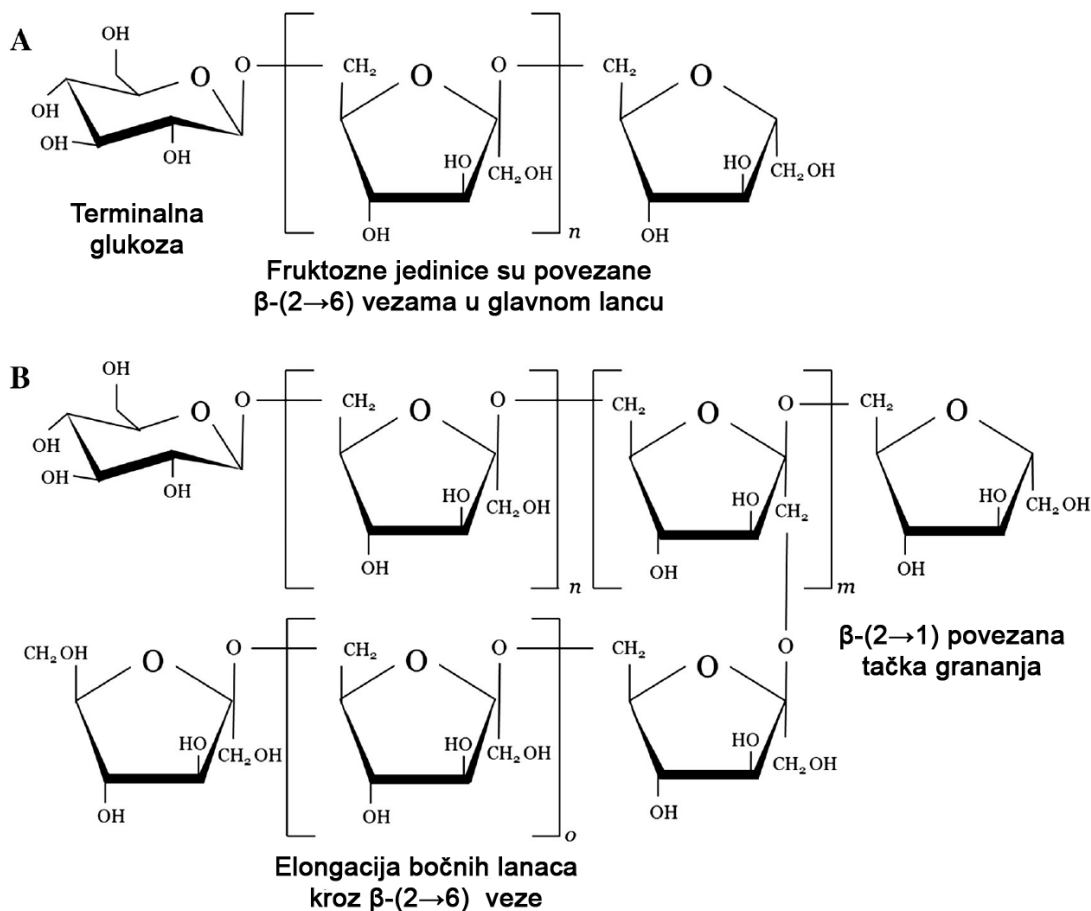
Sve levansaharaze katalizuju prenos fruktoznog ostatka iz saharoze na različite akceptorske molekule: vodu (oslobađajući glukozu i fruktozu), saharozu (sinteza 1-kestoze ili 6-kestoze) i sintetisan β -(2→6) oligofruktan (formiranje i elongacija levana), oslobađajući glukozu (sinteza saharoze ili blastoze) i fruktozu (sinteza inulobioze ili levanbioze). Gram pozitivne bakterije (*Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* i *Streptococcus salivarius*) najčešće sintetišu polimer bez nagomilavanja oligofruktoznih intermedijera, dok Gram negativne (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Zymomonas mobilis*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae*) izlučuju visoku koncentraciju oligofruktana uz posledično niži prinos levana. Visok nivo polimerizacije bakterijskih levana potiče od povezanosti lanca sa enzimom i progresivne elongacije procesivnim mehanizmom. Kada se supstrat saharoza potroši, sintetisan polimer deluje kao fruktozil donor za levansaharazu koja počinje isecanje β -(2→6) veza do tačke grananja, koja zaustavlja reakciju [31].



Slika 2.8. Shematski prikaz biosinteze levana: korak 1 – biosinteza levansaharaze u ćeliji; korak 2 – akumulacija levansaharaze u periplazmatskom prostoru i formiranje finalne konformacije; korak 3 – ekskrecija levansaharaze u spoljašnju sredinu; korak 4 – povezivanje enzima sa supstratom i transfruktozilaciona reakcija i korak 5 – dodavanje fruktoze na rastući lanac levana [33].

2.3.4. Struktura i fizičko-hemijske osobine levana

Tokom godina, hemijska struktura i fizičke osobine levana su veoma dobro proučene. Empirijska formula levana je $(C_6O_{10}H_5)_n$, a na slici 2.9. je prikazana struktura razgranatog i linearnog levana [31,32].



Slika 2.8. Shematski prikaz (a) linearnog i (b) razgranatog levana [31]

Levan je neutralni homopolisaharid koji se sastoji iz D-fruktofuranozil ostataka međusobno povezanih β -(2→6) glikozidnim vezama u glavnom lancu, grananja preko β -(2→1) veza i jednog D-glukoznog ostatka na kraju osnovnog niza. Kada levane proizvode enzimski sistemi, lanci polimera se najčešće sastoje iz 10 do 12 monomera, a u slučaju celih ćelija mogu dostići veličinu i do nekoliko miliona ostataka. Stepenn polimerizacije i

nivo grananja levana zavisi od organizma koji ga sintetiše. Furanozna struktura monosaharidnih jedinica levana povećava fleksibilnost molekula, koji gradi konformaciju leve zavojnice. Levan je takođe poznat kao 2,6- β -D-fruktan, (2,6- β -D-fruktozil)_n, (2,6- β -D-fruktozil)_{n+1}, 2,6- β - δ -fruktan, (2,6- β - δ -fruktozil)_n, (2,6- β - δ -fruktozil)_{n+1} i polifruktan nazivom prema IUPAC nomenklaturi (2R,3S,4S,5R)-5-[[[(2R,3S,4S,5R)-5-[[[(2R,3S,4S,5R)-3,4-dihidroksi-2,5-bis(hidroksimetil)oksolan-2-il]oksimetil]-3,4-dihidroksi-2-(hidroksimetil)oksolan-2-il]oksimetil]-2-(hidroksimetil)oksolane-2,3,4-triol [33].

Levan je netoksična supstanca koja ne iritira oči, a LD₅₀ (letalna doza za 50 % jedinki) je 7,5 ± 0,5 g/kg telesne mase i nivo bez vidljivog efekta (NOEL, „no observed effect level”) iznosi 1,5 g/kg/danu. Bezbednost levana izolovanog iz *B. subtilis* određena je opštim toksikološkim i testovima za mutagenost 2000. godine od strane Odeljenja za hemiju hrane, Ministarstva zdravlja Japana i od tada se koristi u Japanu kao aditiv u prehrambenoj industriji. Levan izolovan iz *Z. mobilis* je Koreanska administracija za hranu i lekove odobrila kao hranu, a levan pod tržišnim imenom „Fructan” je dozvoljen kao prehrambeni aditiv u Sjedinjenim Američkim državama, Evropskoj Uniji, Japanu, Australiji i Novom Zelandu [42].

Ugljenohidratni polimer levan je kompletno rastvoran u vreloj vodi, a nije rastvoran u većini organskih rastvarača: metanolu, etanolu, izopropanolu, *n*-propanolu, acetonu, metiletilketonu, toluenu, etil laktatu, D-limonenu, propilen karbonatu, etilen karbonatu, 1-vinil-2-pirolidonu, polietilen glikolu, kerozinu, dimetil-formamidu, etoksietil acetatu, anhidridu sirćetne kiseline i furfuralu. Za razliku od drugih polimera levan ne bubri u vodi. Isprepletane grane doprinose kohezivnosti levana, a veliki broj hidroksilnih grupa omogućava adhezivne veze sa različitim supstratima. Unutrašnji viskozitet levana je neobično nizak u poređenju sa drugim visokomolekulskim polisaharidima. Levan je prilično toplotno stabilan sa temperaturom topljenja na 225 °C i striktno neredukujući i nehidrolizabilan od strane amilaza i invertaza kvasaca [33].

2.3.5. Primena levana

Jedinstvena kombinacija osobina levana dugo privlači pažnju i izdvaja ga od drugih polisaharida. Iako je komercijalna upotreba ograničena, očekuje se da povećanje dostupnosti levana, zajedno sa porastom broja kompanija na listi proizvođača, doprinese većem broju različitih proizvoda ovog polisaharida na tržištu [21].

2.3.5.1. *Levan u industriji hrane i pića*

Zbog visoke molekulske mase i niskog viskoziteta, levan se smatra potencijalnim funkcionalnim biopolimerom u industriji hrane, a najviše se za proizvodnju koriste bakterije *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutants*, *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH 2590 i *Lactobacillus reuteri* LB121 [33].

Fosfat levana se može koristiti kao zamena za masti, a takođe poboljšava ukus mlečnih proizvoda. Prednost levana je što se njegova velika molekulska masa ne detektuje sensorima ukusa, a isparljivost je previše niska da bi se detektovao miris. Još jedan način da se poboljšaju karakteristike mlečnih proizvoda je dodatak stabilizatora, gde levan takođe pronalazi primenu kao odličan stabilizator, emulgator i pojačivač ukusa. Zbog toga ovaj polisaharid može da se koristi kao dodatak fermentisanim ceralijama, mleku i sokovima. [31,33].

Kada se upotrebljava kao dodatak u proizvodnji hleba, levan produžava rok trajanja, a dobijeni proizvodi su mekši od kontrolnih. Enzimski ili hemijski proizvodi hidrolize levana mogu da se koriste u industriji hrane kao zaslađivači i dijetetska vlakna. Komercijalno su dostupne zdrave poslastice koje po preporuci proizvođača deluju povoljno na rad srca i digestivnog sistema, a sadrže fruktane, uključujući i levan. Razvijaju se i sistemi za efikasnu dostavu esencijalnih hranljivih mikronutritijenata oblaganjem nanočestica selena, kobalta ili gvožđa levanom [31,33].

2.3.5.2. *Levan u kozmetičkoj industriji*

Fokus na upotrebi bezbednih proizvoda za ličnu negu doprinosi interesovanju za primenu levana, s obzirom da ne iritira kožu i oči, ne izaziva kontaktne alergije i nije citotoksičan. Ovaj polisaharid deluje protiv iritacija i inflamacija kože i stimuliše proliferaciju fibroblasta i keratinocita. Levan takođe inhibira aktivnost tirozin-kinaze, pa dolazi do sprečavanja sinteze melanina, što posledično izbeljuje tačke hiperpigmentacije na koži [44].

Hidrogel levana pokazuje bolje *in vitro* i *in vivo* rezultate u odnosu na hijaluronsku kiselinu, kao dermalni filer za estetske tretmane [43].

Glavna primena levana u proizvodima za negu kose (gelovi i pene) je kao učvršćivač kose i sastojak koji formira film, a zbog niskog unutrašnjeg viskoziteta ne menja fizička svojstva proizvoda. Kompanija „Rhodia Inc.” razvila je surfaktant na bazi levana sa katjonskim supstituentima u balzamu za kosu [31].

2.3.5.3. *Levan kao antioksidativni, antitumorni i antiinflamatorni agens*

Reaktivne kiseonične vrste (superoksidni anjon radikal, vodonik-peroksid, hidroksil radikal) izazivaju funkcionalne abnormalnosti i patološka stanja koja dovode do srčanih oboljenja, infarkta, ateroskleroze, gastričnog ulcera i kancera. Iako većina organizama ima sisteme odbrane protiv oksidativnih oštećenja, ona su nedovoljna da ih potpuno spreče, stoga veliku pažnju privlače ispitivanja neutralnih polisaharida kao potentnih antioksidativnih i antitumornih agenasa, posebno jer sintetički antioksidansi često dovode do neželjenih dejstava [35,46].

Osamdesetih i devedesetih godina prošlog veka, ispitivanja antitumornog dejstva levana dobijenih iz kultura *Aerobacter* i *Microbacterium* pokazala su da povećanje stepena grananja polisaharidnog molekula pojačava njegovu biološku aktivnost [33].

Abdel-Fattah i koautori (2012) ispitivali su levan iz soja *Bacillus subtilis* NRC-aza i pokazali su da, u odnosu na nativni fruktan, sulfonovani ester ovog glikana pokazuje veću

in vitro antioksidativnu aktivnost. Ispitivani levan sulfat imao je i visoko selektivnu citotoksičnu aktivnost prema humanim ćelijama hepatocelularnog karcinoma [35].

Liu i saradnici (2012), ispitivali su antioksidativnu aktivnost derivata levana bakterije *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. Sintetisali su tri vrste derivata (acetilovan, fosforilovan i benzilovan) i nakon *in vitro* testova svi derivati su pokazali sposobnost hvatanja superoksidnih i hidroksil radikala. Antitumorna aktivnost dobijenih derivata levana potvrđena je na ćelijama kancera želuca [46].

Potencijalni antioksidativni efekti mogu da štite organizam od ateroskleroze povezane sa oksidativnim stresom. Dahech i saradnici (2013) suplementirali su pacove levanom i dobili porast antioksidativnih enzima (superoksid-dismutaze i katalaze) i smanjenje holesterola i triglicerida u tretiranim životinjama [47].

Preterana manifestacija imunog odgovora može da dovede do adhezije ćelija unutar krvnih sudova, a kao posledica stvaraju se inflamatorne lezije. Pokazano je da levan signifikantno deluje na leukocite i redukuje njihovu adheziju na zidove krvnih sudova [31]. Ako se upoređi antiinflamatorno dejstvo levana sa komercijalnim lekom natrijum-diklofenakom, dobija se 71 % aktivnosti levana u odnosu na lek (100 %) [41]. Levan iz *Paenibacillus bovis* (Xu i saradnici, 2016) doveo je do poboljšanja proliferacije limfocita jetre i produkcije različitih citokina [48].

2.3.5.4. Levan kao agens protiv hiperholesterolemije, hiperglikemije i gojaznosti

Rađene su opsežne studije ispitivanja efekata visokomolekuskog levana na nivo holesterola u krvi. Kada se u toku mesec dana levan koristi kao dodatak ishrani pacovima na režimu ishrane bez holesterola, opada im nivo holesterola u serumu krvi. Povećana fekalna ekskrecija sterola i lipida kod pacova na ishrani sa dodatkom levana ukazuje da on sprečava apsorpciju sterola. Agensi na bazi levana takođe snižavaju lipide u krvi i u slučaju unosa visokokalorijske hrane. Ispitani su efekti levana na pacovima sa ishranom bogatom holesterolima. Korisni efekti na pacovima su demonstrirani pojavom porasta nivoa lipoproteina visoke gustine (HDL, „High-density lipoprotein”), a sniženom koncentracijom

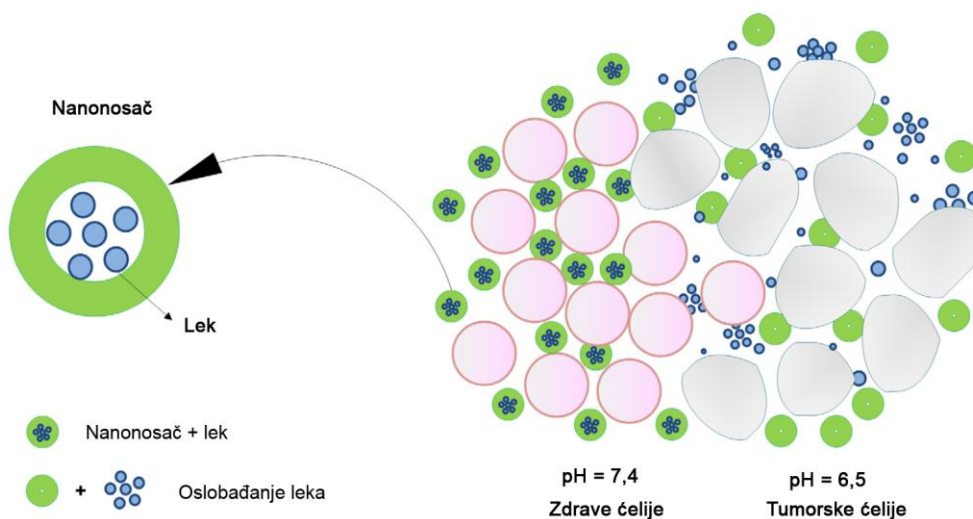
ukupnih holesterola, triglicerida i lipoproteina niske gustine (LDL, „Low-density lipoprotein”) kod tretiranih životinja [31].

Pored snižavanja holesterola u krvi, pokazano je da levan efikasno inhibira hiperglikemiju i indukciju oksidativnog stresa u odraslim pacovima sa dijabetesom. Nakon dodavanja levana u ishranu pacova sa indukovanom gojaznošću, dolazi do supresije gojaznosti i hiperlipidemije [31,33].

2.3.5.5. Levan kao biomaterijal

Levan se može koristiti za održavanje volumena krvne plazme, jer uspešno zamenjuje proteine koji obezbeđuju normalan osmotski pritisak. Ovakav tretman koristan je u prevenciji šoka usled hemoragije, opekotina, operacija, kao i redukciji rizika od tromboze i embolije [33].

Sistemi za dostavu lekova obično se sastoje iz nosača (polimera) i leka koji se oslobađa u kontrolisanim uslovima. Ovakvi sistemi moraju da budu biokompatibilni i biodegradabilni, a pored polimlečne i poliglikolne kiseline, koriste se polisaharidi hitozan i alginati. Trenutno, levan je glavni fruktopolisaharid za produkciju sistema za dostavu lekova sa brojnim prednostima u odnosu na polimere sa piranoznim prstenovima u strukturi, jer fruktozni polimeri mogu da targetuju fruktozni transpoter koji je preterano ekspimiran u ćelijama tumora jetre, dojke i creva [41].



Slika 2.9. Nosači za antitumorne sisteme za dostavu lekova [50]

Levan ima veliki potencijal za upotrebu kao agens za inkapsulaciju, jer se može koristiti za sintezu nanočestica. Levan je korišćen za inkapsulaciju goveđeg seruma albumina, a sintetisan je i sistem sa glikopeptidnim antibiotikom vankomicinom i levanom. Još jedan pristup primeni sistema za dostavu lekova je modifikacija površine levana perjodatnom oksidacijom, radi dobijanja reaktivnijih aldehidnih grupa, koje bi se povezivale sa lekom [41,49].

Usled stimulatornog efekta na proliferaciju ćelija, formiranje filma i zalečivanje rana, levan ima potencijal za primenu u regenerativnoj medicini, kao materijal za sintezu skeleta i komponenata koje se ugrađuju u ćelije. Heparin je visoko sulfatni glikozaminoglikan i služi kao antikoagulans i antitrombički lek, a redukuje inflamatorni odgovor, olakšava angiogenezu i proliferaciju glatkih mišića. Sulfatni estar levana se pokazao kao mimetik heparina (Erginer i saradnici, 2016) i može se koristiti za sintezu funkcionalnih filmova, pametnih skeletnih materijala i inženjering srčanog tkiva. Fosforilovani levan je korišćen za sintezu filmova sa hitozanom, koji se mogu koristiti za tkivni ili regenerativni inženjering [41,51].

Levan može da se koristi za oblaganje metala. Nanočestice cerijuma obložene levanom pokazuju poboljšanu antioksidativnu aktivnost, a različitim tehnikama su oblagane i čestice gvožđa, selena i kobalta. Sinteza nanočestica zlata i srebra rađena je pomoću levana iz *Acetobacter xylinum* [33,41]. Montomorilonit-levan nanočestice imaju poboljšane termalne i mehaničke osobine [34]. Gonzáles-Garcinuño i saradnici (2019) su sintetisali nanočestice srebra obložene levanom koje imaju baktericidni efekat na *E. coli* i *B. subtilis* [52].

Za proizvodnju bioloških adhezivnih membrana često se koristi tehnika izlivanja filmova. Pomenutom tehnikom dobijen je multikomponentni film levana iz *Halomonas* i polietilen-oksida hitozana, u kojem levan ne poboljšava samo biokompatibilnost, već i termalna i mehanička svojstva filma. U studiji Gomesa i saradnika (2018) levan iz *Halomonas smyrnesis* AAD6 je prvo sulfonovan, zatim korišćen u sintezi adhezivnih mešanih filmova sa hitozanom i alginatom za biomedicinske primene [28,53].

Najraniji pokušaj umrežavanja levana za sintezu hidrogelova bio je 1969. godine. Levan je umrežavan sa anhidridom maleinske kiseline i diizocijanatom. Stabilni

hidrogelovi koji mogu da se zamrzavaju i zagrevaju do 100 °C dobijani su uvođenjem fosfatnih grupa u strukturu levana. Fosforilovani levani formiraju gelove u vodi, ali i različitim organskim rastvaračima. Aldehidna grupa oksidovanog levana može da reaguje sa amino grupama različitih oligomera ili polimera formirajući hidrogelove sa potencijalnom primenom kao tkivni adhezivi. Za potencijalne medicinske svrhe sintetisani su i termoreaktivni hidrogelovi sa karboksimetilovanim i metakrilisanim levanom. Nedavno su sintetisani (Berg i saradnici, 2018) biokompatibilni hidrogelovi sa fotohemijski umreženim levanom i metakrilnim grupama [54].

Vlakna na mikro i nano skalama imaju veliku primenu u inženjeringu skeletnih materijala, regenerativnoj medicini, nanokatalizi, zaštiti odeće, farmaciji, biotehnologiji, optičkoj elektronici, kozmetičkoj industriji i hrani. Mikro/nano vlakna se efikasno prave pomoću elektrospinoavanja i od prirodnih polimera koriste se kolagen, hitozan, svila i natrijum-alginat. Asvar i saradnici (2018) koristili su levan za sintezu vlakana tehnikama elektrospinoavanja sa jednom iglom i koaksijalno. U procesima su koristili hidrolizovan i sulfonovan levan iz *Halomonas*, polikaprolakton i polietilenoksid [55].

Rigidni tip elektronike sastoji se od poluprovodnih materijala kao što su silikon i neorganski materijali tipova II-IV i III-V, a meka elektronika zahteva konstrukciju različitih materijala za poboljšanje sistema. Tehnologija privremene elektronike bi mogla da se razvija za primenu proizvodnji flastera za kožu, pametnih tekstilnih materijala, robota i privremenih medicinskih implanata. Trenutna restrikcija dostupnih materijala motiviše ispitivanje alternativnih kandidata, kao što su organski i neorganski poluprovodnici, rastvorljivi metali i degradabilni polimeri za supstratne materijale (celuloza, polikaprolakton, polivinilalkohol) i zaštitni sloj. Kwon i saradnici (2018) koristili su levan kao novi supstrat za privremenu elektroniku i pokazali rastvorljivost i *in vivo* biokompatibilnost dobijenog sistema [56].

2.3.5.7. Prebiotsko dejstvo levana

U prethodnih petnaest godina povećavaju se istraživanja potencijalne koristi prebiotika na zdravlje, sa posebnim osvrtom na efekte po imuni sistem, sposobnost

domaćina da se bori protiv infekcije i procese inflamacije. Fruktani, uključujući inulin i FOS-ove ispunjavaju kriterijume za prebiotike i zbog toga se najviše proučavaju. Drugi ugljeni hidrati, uključujući galaktooligosaharide, glukooligosaharide, izomaltooligosaharide, laktulozu, mananoligosaharide, rafinozu, β -glukane, transgalaktooligosaharide i ksilooligosaharide, razmatraju se takođe kao kandidati za prebiotike [57,58].

Da bi se neki molekul klasifikovao kao prebiotik mora da zadovolji tri uslova, odnosno potrebno je da bude rezistentan na hidrolizu i apsorpciju u gornjem gastrointestinalnom traktu, fermentabilan od strane intestinalnog mikrobioma i selektivno stimuliše rast i aktivnost korisnih intestinalnih bakterija. Kao rezultat ovoga, prebiotici utiču na odbranu domaćina, poboljšavajući svojstva autohtone mikroflore. Oni povećavaju broj bifidobakterija, koje smanjuju broj patogenih sojeva, jer kompetiraju za hranljive supstance i vezivanje za intestinalni epitel, a proizvode i antibakterijske supstance. Osim toga, bifidobakterije proizvode kratkolančane masne kiseline (SCFA, „Short chain fatty acids”) koje imaju različite uloge, kao što je acidifikacija uslova u crevima, što je nepovoljno za neke patogene sojeve i favorizuje proizvodnju mucina i vezivanje za SCFA receptore na imunim ćelijama unutar limfoidnog tkiva gastrointestinalnog sistema (GALT, „Gut-associated lymphoid tissue”) [58,59].

Nekoliko studija je ispitivalo različite aspekti levana i levanskog tipa fruktooligosaharida na probiotske bakterije i kompleksni intestinalni mikrobiom, u kojima je pokazano da prisustvo ovog polisaharida poboljšava rast bakterija rodova *Bacteroides*, *Escherichia*, *Streptococcus* i *Faecalibacterium*. Definisana je i metabolička šema konverzije levana u kooperativnom metabolizmu crevnih bakterija [31,41].

Potvrđeno je i da levan ima uticaja na intestinalnu mikrobnu zajednicu životinja, koje se uzgajaju za ishranu ljudi. Nakon upotrebe levana umesto profilaktičkih antibiotika u trajanju od 24 dana, došlo je do porasta digestibilnosti crevnog trakta i dobijanja na težini mladih domaćih svinja. Kod odraslih svinja da nakon četrdesetdvodnevne ishrane sa levanom životinje dobijaju na težini i broj bakterija *Lactobacillus* raste, a *E. coli* opada. Dodatak levana u ishranu pilića povećava težinu i broj korisnih bakterija (*Lactobacillus* i

Bifidobacterium), a smanjuje broj štetnih bakterija (*E. coli* i *Clostridium perfringens*) u crevima [31].

Levan je dodavan u ishranu šarana (*Cyprinus carpio*) u trajanju od 75 dana, a potom su ribe izlagane intraperitonealno sa *Aeromonas hydrophila*. Preživljavanje riba suplementiranih levanom je bilo 100 %, što je sugerisalo mogućnost interakcije levana sa mikrobnom populacijom u gastrointestinalnom traktu [31].

2.3.5.8. Levan kao adsorptivi agens i nemedicinski adheziv

Bisfenol A se nalazi u polikarbonatnoj plastici i klasifikovan je kao jedinjenje koje ometa funkcionisanje endokrinog sistema. Zbog prisutnosti bisfenola A u površinskim i otpadnim vodama i sedimentu razvijaju se različite metode za njegovo uklanjanje iz vodenih sredina. Haciosmonglu i saradnici (2019) koristili su fosforilovani levan iz bakterije *Halomonas smyrnensis* za adsorpciju bisfenola A sa maksimalnim kapacitetom od 126,6 mg/g [60].

U Sjedinjenim Američkim Državama sproveden je pre dvadeset godina projekat ispitivanja novih adheziva koji ne deluju štetno po životnu sredinu. Od 350 mikrobnih izolata, bakterija koja je proizvodila najveće količine biopolimera sa najvišom adhezivnom moći za aluminijum bila je *B. subtilis*, a biopolimer levan. Na adheziju levana za plastične materijale, utiče polarnost supstrata. Levan se umereno jako vezuje za epoksi staklo, plastiku od dialil-ftalata, akrilonitril butadiena i svih polarnih materijala. Kada je supstrat nepolarni plastični materijal, kao što su polifenilen-sulfid, polietar-etarketon i uretanom presvučen aluminijum, levan se ne vezuje [30].

Peščani kalupi u topionicama metala prave se pomoću adheziva sa nekim tipovima fenolnih uretana koji su toksični. Kao alternativa postojećim toksičnim adhezivima, levan ima potencijal za primenu kao nova i bezbednija komponenta za pravljenje kalupa. Osim za lepljenje peska, levan se može koristiti kao netoksična zamena adheziva u industriji drveta, što je veoma korisno za pravljenje iverice [30].

Usled toksičnosti formaldehida postoji potreba za zamenom tradicionalnog povezivanja plastike i stakla sa fenol-formaldehidnim smolama u kojima je moguće

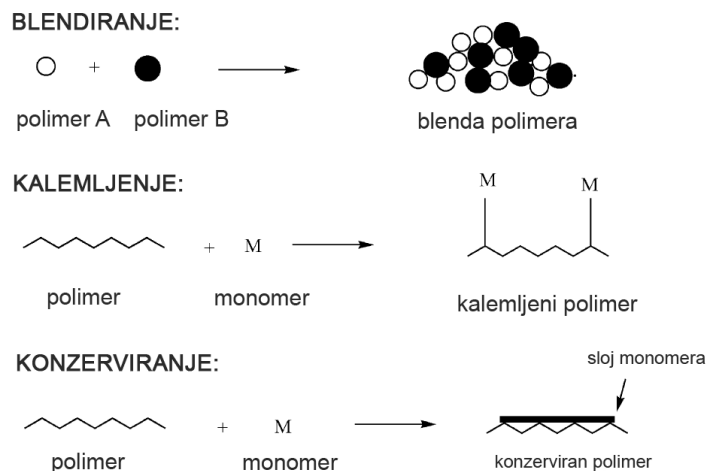
koristiti levan kao netoksičnu adhezivnu komponentu. Uobičajeni adheziv za lepljenje cigareta je etilen-vinil acetat, koji nije opasan, međutim njegovi proizvodi sagorevanja mogu da budu toksični. Zbog toga je pokazana mogućnost upotrebe levana i pululana, umesto etilen-vinil acetata, u proizvodnji cigareta [30].

2.3.5.9. Perspektive primene levana

Biokompatibilnost, biorazgradivost, kao i antioksidativna, antiinflamatorna, antitumorna i aktivnost inibicije hiperglikemije mikrobnog levana, ukazuju da bi ovaj polisaharid mogao da bude efikasna zamena za komercijalne sintetičke polimere. Istraživan je potencijal za primenu levana u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji i medicini. Uprkos mnogim industrijskim primenama, strategija proizvodnje levana je još uvek nedovoljna. Radi smanjenja troškova proizvodnje i povećanja stabilnosti biopolimera, konstantno se uvode nove strategije za proizvodnju i prečišćavanje EPS. Podstiče se i upotreba rekombinantnih mikroorganizama, kao i otpadnih proizvoda prehrambene industrije za proizvodnju levana, jer u velikoj meri utiču na povećanje efektivnog prinosa i smanjenje troškova proizvodnje. Efikasne i ekonomične strategije za proizvodnju i prečišćavanje levana povećavaju opseg njegove upotrebe u industrijskim, medicinskim i komercijalnim kozmetičkim sektorima, koji su ekološki prihvatljivi, ne utiču negativno na životnu sredinu i ne izazivaju zdravstvene probleme biljaka, životinja i ljudi [33].

2.6. Kalemljeni kopolimeri sa polisaharidima

Poslednjih godina veliki interes je posvećen modifikaciji sintetičkih polimera u cilju povećanja njihove biodegradabilnosti. Brojna ograničenja sintetičkih polimera, koja nepovoljno deluju na životnu sredinu su: nedostatak biodegradabilnosti i obnovljivosti, ugradnja toksičnih aditiva u sintetičke proizvode i ograničena dostupnost fosilnih goriva kao izvora za dobijanje polimera. Najveća količina čvrstog otpada u životnoj sredini upravo potiče od sintetičkih polimera, usled njihove rezistencije na hemijsku i fizičku degradaciju [61-63].

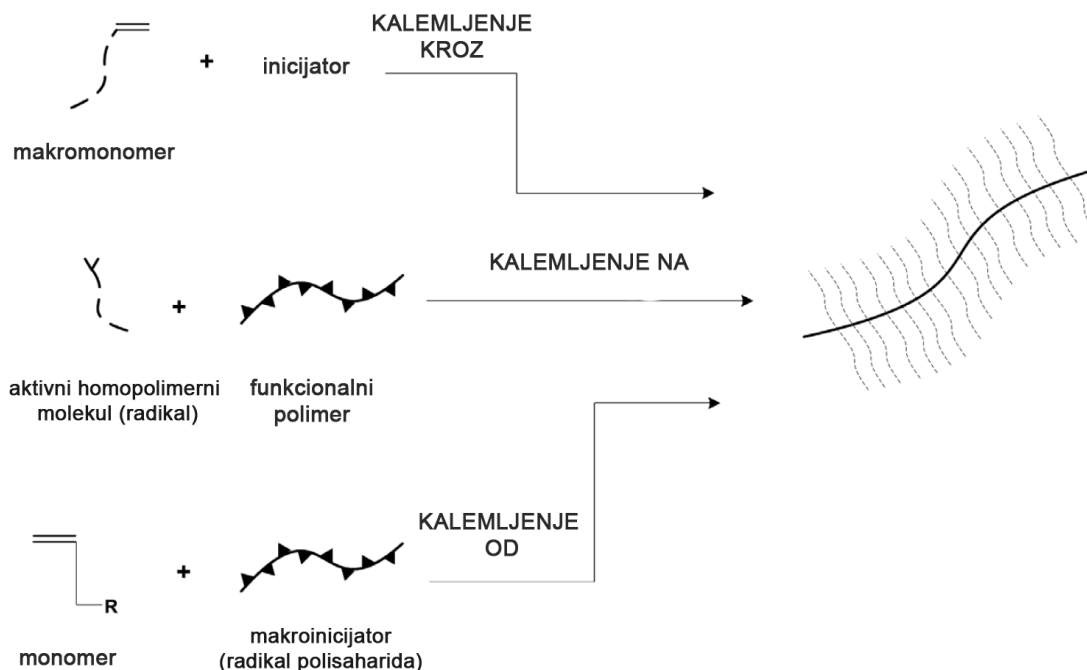


Slika 2.10. Shematski prikaz metoda za modifikaciju polimera [66]

Postoji nekoliko tehnika za modifikaciju polimera (slika 2.10):

- blendiranje – fizičko mešanje dva ili više polimera da bi se dobile željene osobine;
- kalemljenje – kovalentno vezivanje monomera, ili homopolimera koji nastaje od datog monomera, na lanac polimera;
- konzerviranje – adhezija polimerizovane smeše oligomera na supstrat [64].

Kalemljena kopolimerizacija je poznata tehnika za uvođenje novih ili poboljšanje postojećih osobina „roditeljskog” polimera sa minimalnim negativnim uticajem na originalna svojstva. Priroda promene svojstava zavisi od tipa monomera koji se kalemi, procenta kalemljenja, metode kalemljenja i distribucije kalemljenog lanca kroz „roditeljski” polimer [65]. Kalemljenim kopolimerom se definiše makromolekul koji se sastoji iz glavnog lanca povezanog sa jednim ili više vrsta sporednih lanaca (blokova). Generalno, strukturu kalemljenog kopolimera čini glavni polimer u osnovnom nizu, koji na različitim mestima ima grananja poreklom od drugog polimera [66].



Slika 2.11. Različite strategije za sintezu kalemljenih kopolimera [50]

Površinske hemijske modifikacije upotrebom polimera mogu se implementirati upotrebom metoda: kalemljenja na („grafting-to”) ili kalemljenja od („grafting-from”). Prva metoda predstavlja direktno kalemljenje organskih molekula kroz reakciju sa dostupnim hidroksilnim grupama na površini polisaharida. Glavni nedostatak ove metode su sterne smetnje reaktivnih mesta i niski prinosi reakcije, do kojih dolazi kada se kaleme veliki molekuli, kao što su veliki polimerni molekuli. Zbog toga se drugi, „kalemljenja od” pristup, mnogo više koristi i obuhvata dvostepeni proces: prvo kalemljenje monomera na aktivirani funkcionalni polimer (polisaharid), pa zatim nastavak reakcije polimerizacije [67]. Postoji i treći način modifikacije polimera koji se naziva kalemljenja kroz („grafting-through”) i uključuje kopolimerizaciju makromonomera i komonomera. Različite strategije hemijskih modifikacija (Slika 2.11) omogućavaju kontrolu strukturnih parametara: gustine i sastava kalemljenja, molekulske mase sporednih lanaca i osnove polimera. Kontrola pomenutih parametara predstavlja izazov usled sternih smetnji na glavnom lancu polimera prouzrokovanim gustinom kalemljenja [50].

Na osnovu načina inicijacije reakcije tehnike kalemljenja se dele na: hemijske, radijacijske, fotohemijske, plazma-indukovane i enzimske. Dva glavna puta hemijskih

tehnika kalemljenja su slobodnoradikaliski i jonski. U hemijskom procesu uloga inicijatora veoma je važna, jer određuje put procesa kalemljenja. Osim generalnog slobodnoradikaliskog mehanizma, kalemljenje topljenjem i atom-transferna radikaliska polimerizacija su takođe interesantne tehnike za sprovođenje kalemljenja [64].

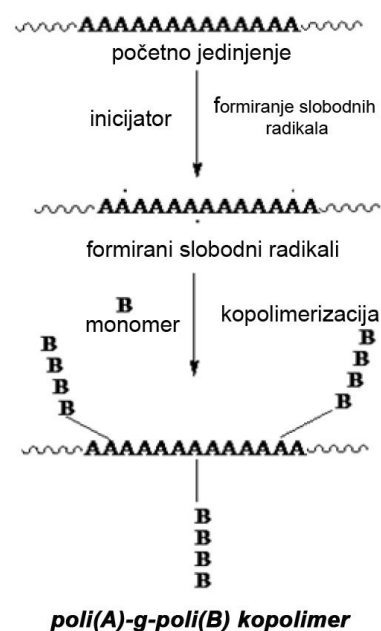
Uz korišćenje različitih tehnika kalemljenja moguće je sintetisati amfifilične kopolimere poliestara, kao što su polilaktid ili poli(ϵ -kaprolakton) i polisaharida (dekstrana, celuloze, alginata, hitozana i hijaluronana). Takođe, u literaturi postoje brojni primeri kalemljenih kopolimera polisaharida i sintetičkih vinil monomera uključujući stiren, metil metakrilat, vinil acetat i N-izopropilakrilamid [68].

2.6.1. Slobodnoradikalisko kalemljenje

U hemijskom procesu „kalemljenja od” slobodni radikali nastaju iz inicijatora i prenose se na supstrat da bi reagovali sa monomerom gradeći kalemljeni kopolimer (Slika 2.12). Kalemljena kopolimerizacija se može dobiti upotrebom različitih inicijatorskih sistema, kao što su amonijum-persulfat, kalijum-persulfat (KPS), azobisisobutironitril, cerijum(IV) amonijum-nitrat, koji se široko koriste za sintezu kopolimera [64,66].

2.6.1.1. Persulfatna inicijacija polimerizacije

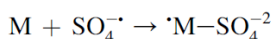
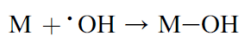
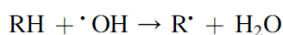
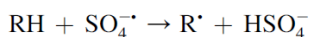
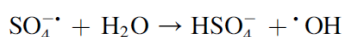
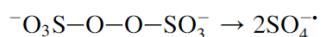
Za kalemljenu kopolimerizaciju, od persulfata, koriste se amonijum-persulfat, kalijum-persulfat i gvožđe(II)-sulfat. Kada se u vodenom rastvoru zagreva persulfat se razlaže na sulfatni radikal anjon zajedno sa slobodnoradikaliskim vrstama. Mehanizam kopolimerizacije (inicijacija, propagacija i terminacija) inicirane persulfatom prikazan je na slici 2.13, u kojoj je sa M' označena reakciona vrsta poreklom od



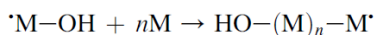
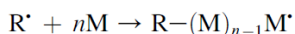
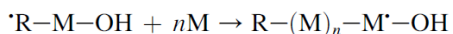
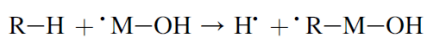
Slika 2.12. Generalni slobodnoradikaliski mehanizam kalemljene kopolimerizacije vinil monomera B na polimer A [66]

monomera, R^{\cdot} slobodnoradikalska vrsta poreklom iz osnovnog polimera slobodnoradikalska vrsta [66,71].

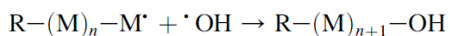
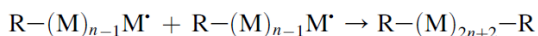
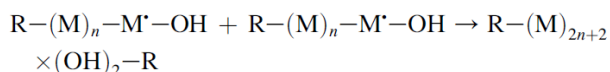
Inicijacija



Propagacija



Terminacija



Slika 2.13. Mehanizam reakcije kalemljene kopolimerizacije persulfatnom inicijacijom (M^{\cdot} - slobodnoradikalska vrsta poreklom od monomera, R^{\cdot} - slobodnoradikalska vrsta poreklom iz osnovnog polimera) [71]

U literaturi je pokazano da povećanjem koncentracije persulfatnog inicijatora raste i procenat i efikasnost kalemljenja, ali do određenog limita. Ovo se može objasniti činjenicom da porast persulfatnog inicijatora dovodi do porasta broja nastalih radikala koji napadaju polisaharidni lanac. Takođe, gradi se više makroradikala sposobnih za kalemljenje vinil monomera na njih. Daljim povećanjem persulfatnog inicijatora iznad granične vrednosti ekvivalentne maksimalnom procentu kalemljenja, formira se veliki broj slobodnih radikala. Dobijeni slobodni radikali mogu na račun kalemljenja inicirati homopolimerizaciju vinilnih monomera, koji će se zbog sternih smetnji teže kalemiti na polisaharid, što će usloviti niži stepen kalemljenja [66].

2.6.1.2. Askorbinska kiselina za inicijaciju polimerizacije

Različiti redoks sistemi uspešno su primenjeni za polimerizaciju organskih monomera u vodenoj sredini. Redoks polimerizacija ima sledeće prednosti: veoma kratak period indukcije, relativno niska energija aktivacije, produkcija visokomolekulskih polimera sa visokim prinosom, jednostavna kontrola reakcije polimerizacije na nižim temperaturama usled smanjenja sporednih reakcija i direktni eksperimentalni dokaz prelaznih radikalskih intermedijera. Oksidanti koji se često upotrebljavaju su peroksidi, persulfati, permanganati i soli prelaznih metala. Oni formiraju potencijalne redoks sisteme sa različitim redukcionim agensima, kao što su alkoholi, aldehidi, amini, amidi, ketoni, kiseline i tioli. Askorbinska kiselina (AK) privlači veliku pažnju istraživača zbog biološke aktivnosti i primena u sintezama [69].

Reakcija između persulfata i AK uključuje lančani mehanizam u kome dolazi do stvaranja poznatog nosača jonskih lanaca - sulfatnog jonskog radikala. Primarni radikali formirani u nizu redoks reakcija su: sulfatni radikalski anjon, OH^\cdot i radikal askorbata. Dobijeni primarni radikali otpočinju reakciju kalemljenja [70].

2.6.2. Faktori koji utiču na kalemljenje

Faktori koji kontrolišu kalemljenje su priroda polimera u osnovi kopolimera, vrsta monomera, rastvarača, inicijatora, aditiva i temperatura.

Kako kalemljenje predstavlja kovalentno povezivanje monomera na formiranu polimernu osnovu, fizička priroda i hemijski sastav osnovnog polimera igra veliku ulogu u procesu.

Reaktivnost monomera je takođe važna za kalemljenje i zavisi od njegove koncentracije, polarnosti, sterne prirode i bubrenja osnovnog polimera u prisustvu monomera.

U mehanizmu kalemljenja rastvarač služi kao nosač kojim se monomeri prenose u blizinu osnovnog polimera. Izbor rastvarača zavisi od rastvorljivosti monomera, bubrenja osnovnog polimera, generisanja slobodnih radikala u prisustvu rastvarača i mešljivosti rastvarača u slučaju upotrebe više od jednog.

Osim radijacijske tehnike, sve hemijske reakcije kalemljenja zahtevaju upotrebu inicijatora, stoga je pri odabiru neophodno uzeti u obzir njegovu koncentraciju, rastvorljivost i funkciju. Prinos kalemljenja zavisi i od prisustva aditiva, kao što su soli metala, kiseline i neorganske soli. Aditivi pospešuju reakciju između monomera i osnovnog polimera, a potrebno je voditi računa da pritom reakcija između aditiva i monomera ne bude dominantna. Od mineralnih kiselina sumporna se pokazala efikasnom, upotreba azotne kiseline je ograničena, a hlorovodonična kiselina deluje negativno na kalemljenje. Ustanovljeno je i poboljšanje kalemljenja particionim fenomenom uz prisustvo neorganskih soli (litijum-karbonat, litijum-perhlorat) i redukovanje formiranja homopolimera dejstvom metalnih jona (Fe^{2+} , Cu^{2+}). Uticaj amina na kalemljenje zavisi od njihove nukleofilnosti, baznosti i sternih zahteva.

Temperatura reakcije je važan faktor koji utiče na kinetiku kalemljene kopolimerizacije i generalno prinos kalemljenja raste sa povišenjem temperature do određenog limita [64].

2.6.3. Modifikacije polistirena sa polisaharidima

Zbog odličnih fizičkih osobina, niske cene i jednostavne prerade, polistiren (PS) se široko koristi za sintezu termoplastike. Međutim, pošto je veoma hidrofoban i hemijski inertan, zadržava se u prirodi bez deformacija veoma dug vremenski period i izaziva zagađenje životne sredine. Modifikacija polistirena prirodnim polimerima omogućava bolju dostupnost za mikrobiološku degradaciju. Zbog toga je poželjan pristup kalemljenje polistirena polisaharidima kao što su lignin, hitin, hitozan, skrob i dekstran [71].

Hilburg i saradnici (2014) sintetisali su nanočestice od kalemljenog kopolimera lignina i polistirena atom-transfernom radikalskom polimerizacijom [72].

Uspešno je optimizovana sinteza kalemljenog kopolimera polistirena i hitina slobodnoradikalnim mehanizmom i upotrebom amonijum-persulfata kao inicijatora reakcije (Naim i saradnici 2011) [73].

Drugi predloženi način za sintezu kalemljenog kopolimera polistirena i hitozana je površinski indukovana atom-transferna radikalna polimerizacija iz bromoacetilovanog hitozana. Takođe, moguće je postići kontrolisanu kalemljenu modifikaciju hitozana sa

polistirenom pomoću polimerizacije posredovane nitroksidom [50]. Fransis i saradnici (2015) dobili su amfifilični kalemljeni kopolimer polistirena i hitozana, koristeći tehniku „kalemljenja na” sa toluen diizocijanatom [74].

Kalemljena kopolimerizacija sa skrobom može da poboljša različita svojstva polimera, kao što su: elastičnost, apsorptivnost, kapacitet jonske izmene i termalna rezistencija [75]. Do sada su publikovane brojne studije o sintezama kopolimera skroba i polistirena u kojima su korišćene različiti inicijatori slobodnoradikalskog kalemljenja: amonijum-persulfat, cerijum (IV) amonijum-nitrata, KPS i benzol-peroksid. Sheikh i saradnici (2013) su sintetisali kopolimer pšeničnog skroba i polistirena pomoću gama-zraka [76]. Nikolić i saradnici (2014) sintetisali su kopolimer kukuruznog skroba i polistirena emulzionom polimerizacijom uz upotrebu natrijum-dodecilsulfata kao emulgatora i KPS-a kao inicijatora [77].

Houga i saradnici (2007) sintetisali su kopolimer polistirena i dekstrana atom-transfernom radikalskom polimerizacijom [78].

2.6.4. Primena kalemljenih kopolimera sa polisaharidima

Kalemljeni kopolimeri se koriste u poljoprivredi, industriji papira i tekstila, medicini i naftnoj industriji kao flokulanti i adhezivi [66]. Takođe, našli su primenu u razvoju novih selektivnih membrana i agenasa za sorpciju i kao stabilizatori između kalemljenih i nekalemljenih polimera [65].

Širok spektar kalemljenih prirodnih polisaharida koriste se za sintezu sistema za dostavu lekova. Nakon poređenja antimikrobne aktivnosti hitozana i kalemljenih kopolimera sa hitozanom, pokazano je da kalemljeni polimeri imaju veću aktivnost [66].

Skrob i modifikovani skrob imaju široku primenu u različitim industrijskim sektorima, uključujući i prehrambenu industriju. U Evropi 2002. godine je zabeleženo da ukupna konzumacija skroba i njegovih derivata iznosi oko 7,9 miliona tona, od kojih je 54 % primenjeno za proizvodnju hrane. Primena termoplastičnih kopolimera sa skrobom obuhvata materijale za pakovanje, torbe za kupovinu, omotače za sanitarne proizvode i kese za mamce za ribu. Postoji potencijal u primeni za zaštitna pakovanja sprečavaju pomeranje

i oštećivanje proizvoda tokom transporta, kao i za produkte koji se prave tehnologijom ubrizgavanja u kalupe [61]. Kalemljeni kopolimeri stirena, metil metakrilata i butil metakrilata se mogu koristiti u tekstilnoj industriji [79].

Prisustvo kalemljenih lanaca poboljšava svojstva nativnih polisaharida kod primene za uklanjanje boja u otpadnim vodama. Pokazano je da kalemljeni kopolimer hitozana i polimetakrilata efikasno uklanja strukturno različite azo boje [80].

Za upotrebu u tehnologijama odvajanja, membrane se smatraju kao barijera koja kontroliše selektivni transfer molekula ili jona. Za razvoj membrana željenih separacionih osobina koriste se različite polimerne supstance, međutim u nekim slučajevima nemaju adekvatnu sposobnost separacije i mehanička svojstva. Kalemljenje je popularna metoda za modifikaciju polimernih membrana kojom se prevazilaze njihovi nedostaci. Separacije smeša vode i etanola veoma je važna u industrijskim primenama i postoje brojne studije u kojima se koriste membrane sintetisane tehnikom kalemljenja. Jedan od načina za dobijanje takvih membrana je kalemljenje polistirena na membranu od acetata celuloze [64].

Pošto su prirodna guma i ekspanzirani polistiren nemešnjivi, Sekharan i saradnici (2012) su sintetisali kalemljene kopolimere obe komponente sa anhidridom maleinske kiseline i time im poboljšali kompatibilnost [81].

3. MATERIЈAL I METODE

3.1. *Supstance i rastvarači*

U ovom radu sve upotrebljene hemikalije su bile p.a. čistoće, ako drugačije nije naglašeno: saharoza (za podloge prehrambeni kvalitet, Crvenka, Srbija; za standard hromatografska čistoća, MERCK, Nemačka), kalijum-dihidrogenfosfat, oksalna kiselina, natrijum-bikarbonat (svi Kemika, Hrvatska), magnezijum-sulfat-heptahidrat (Alkaloid, Makedonija), gvožđe(II)-sulfat-heptahidrat, natrijum-hlorid, barijum-karbonat, anhidrid sirćetne kiseline, piridin, metanol (svi MERCK, Nemačka), D-glukopiranoza, D-fruktofuranosa, D-galaktopiranoza i D-manopiranoza, glicerol, eritritol (hromatografska čistoća, svi MERCK, Nemačka), etanol, amonijum-hlorid, amonijum-sulfat, askorbinska kiselina, dikalijum-hidrogenfosfat-trihidrat, natrijum-nitrat, anhidrovani natrijum-sulfat, sumporna kiselina, kalijum-hidroksid, hlorovodonična kiselina (svi Zorka, Srbija), melasa (Fabrika šećera Senta, Srbija) metil-jodid, natrijum dodecil sulfat (SDS), stiren, kalijum-persulfat, *n*-propilamin, izobutilamin, *n*-pentilamin, *n*-heksilamin, dietanolamin, dibutilamin, 4-(2-hidroksietil)morfolin, *N,N*-dimetiletanolamin (DMEA), *N,N*-dietiletanolamin (svi Fluka, Švajcarska), mesni ekstrakt, ekstrakt kvasca, pepton, hranljivi agar (svi Torlak, Srbija), komercijalni levan L8647, azotna kiselina, trifluorsirćetna kiselina, bortrifluorideterat, trietilsilan, natrijum-nitrat, natrijum-azid, natrijum-perjodat, natrijum-arsenit, kalijum-jodid, jod, natrijum-tiosulfat, 1,2-etandiol, natrijum-borhidrid, dimetil-sulfoksid, sprašeni natrijum-hidroksid (svi Sigma, Sjedinjene Američke Države), deuterisana voda, 4,4-dimetil-4-silapentan-1-sulfonska kiselina, dimetilformamid (spektroskopska čistoća, Sigma, Sjedinjene Američke Države), natrijum-perjodat (Carlo-Erba, Francuska), sirćetna kiselina (NRK inženjering, Srbija), hloroform, metilen-hlorid (hromatografska čistoća, J.T. Baker, Sjedinjene Američke Države).

3.2. *Mikroorganizam*

Za produkciju levana korišćena je bakterija *Bacillus licheniformis* NS032. Taksonomska pripadnost potvrđena je 16S rDNK analizom (Genbank sekvenca JF826527) [82].

3.3. Podloge

Podloge su pripremane suspendovanjem komponenti u destilovanoj vodi, a potom su sterilisane u autoklavu 20 minuta na temperaturi od 121 °C.

3.3.1. Hranljivi agar

Za održavanje soja i brojanje mikroorganizama korišćen je Hranljivi agar Instituta Torlak sledećeg sastava (g/L):

Pepton 1 Torlak	15,0
Mesni ekstrakt Torlak	3,0
Natrijum-hlorid	5,0
Dikalijum-hidrogenfosfat	0,3
Agar	18,0

3.3.2. Osnovna podloga sa saharozom (OPS)

Osnovna podloga za ispitivanje produkcije levana pri različitim uslovima bila je sledećeg sastava (g/L) [83]:

Saharoza	100,0
Mesni ekstrakt	1,0
Ekstrakt kvasca	0,6
Dikalijum-hidrogenfosfat-trihidrat	3,0
Kalijum-dihidrogenfosfat	3,0
Natrijum-hlorid	1,0
Magnezijum-sulfat-heptahidrat	0,2
Gvožđe(II)-sulfat-heptahidrat	0,001

Pre sterilizacije pH vrednost podloge je bila u opsegu 6,5 - 7,0 (poglavlje 4.1). Ostale podloge za produkciju levana dobijene su variranjem sadržaja i vrste saharoze kao izvora ugljenika, ali i upotrebom različitih (organskih i neorganskih) izvora azota, a početna pH vrednost im je podešavana da bude opsegu od 5,5 do 7,5 (poglavlja 3.5, 3.6 i 3.8).

3.4. Produkcija, izolovanje i određivanje prinosa levana

Uticaoj različitih faktora sredine na produkciju polisaharida ispitivan je fermentacijom soja *B. licheniformis* na različitim podlogama (OPS i modifikovane OPS) u trajanju od 3 - 5 dana. Podloge su zasejavane istim inokulumom *B. licheniformis* (1 mL, 10^6 CFU/mL) i inkubirane u termostatu bez mešanja. Da bi se odredio broj ćelija u zasejanom inokulumima, mikroorganizmi su brojani metodom serijskog razblaženja.

3.4.1. Izolovanje, prečišćavanje i određivanje prinosa levana za eksperimente optimizacije sa saharozom

Nakon fermentacije, biomasa je odvajana centrifugiranjem na 10 000 obrt/min, pri temperaturi od 8 °C tokom 10 minuta. Levana je taložen iz supernatanta postepenim dodavanjem dvostruke zapremine hladnog 96 % etanola, pri konstantnom mešanju. Dobijena smeša je ostavljena preko noći u frižideru na 4 °C, a nakon toga bistri supernatant je odbacivan dok je talog rastvaran u vreloj destilovanoj vodi. Nakon hlađenja, rastvoreni talog je dijalizovan (Sigma D9402 crevo sa veličinom pora od 14 000 Da) prema tekućoj vodi 3 dana, a potom liofilizovan. Sadržaj polisaharida određivan je kolorimetrijskom metodom [84], a kao standard korišćena je fruktoza

3.4.2. Izolovanje, prečišćavanje i određivanje prinosa levana za eksperimente optimizacije sa melasom

Fermentaciona tečnost (8 mL) centrifugirana je na 5 000 g tokom 10 minuta. Nakon odvajanja biomase, 2 mL supernatanta je taloženo sa dvostrukom zapreminom hladnog etanola. Dobijena smeša je ostavljena preko noći u frižideru na 4 °C, da bi se polisaharid kvantitativno istaložio. Sadržaj levana određivan je nakon hidrolize 0,1 % rastvorom oksalne kiseline, pomoću „Megazyme” enzimskog kita za određivanje fruktana, koji se zasniva na kuplovanim reakcijama i čiji se poslednji formirani proizvod detektuje spektrofotometrijski.

3.4.3. Izolovanje i prečišćavanje levana za strukturnu karakterizaciju

Posle odvajanja biomase centrifugiranjem na 10 000 obrt/min, pri temperaturi od 8 °C tokom 10 minuta, iz supernatanta taložen je levan postepenim dodavanjem dvostruke zapremine hladnog etanola. Dobijena smeša je ostavljena preko noći u frižideru na 4 °C, a potom je bistri supernatant odbacivan, dok je talog rastvaran u vreloj destilovanoj vodi i ponovo taložen dvostrukom zapreminom hladnog etanola. Smeša je ponovo hlađena preko noći, zatim je dobijeni talog, nakon odvajanja supernatanta, rastvaran u vreloj destilovanoj vodi. Kada je ohlađen, rastvoreni talog je dijalizovan (Sigma D9402 crevo sa veličinom pora od 14 000 Da) prema tekućoj vodi najmanje 3 dana i liofilizovan.

3.5. Optimizacija produkcije levana tehnikom jedne promenljive u vremenu u OPS-u

Tehnikom jedne promenljive u vremenu ispitivan je uticaj temperature inkubacije, mešanja, izvora ugljenika i azota na produkciju levana. Svi eksperimenti su rađeni u erlenmajerima zapremina po 250 mL sa po 100 mL sterilne OPS i/ili modifikovane OPS, a trajali su četiri dana.

Uticaj temperature na produkciju levana ispitivan je na 28 °C, 37 °C i 45 °C fermentacijom u OPS-u koristeći termostat bez mešanja. Pošto je inkubacija na 37 °C dala najveći prinos polisaharida, svi naredni eksperimenti rađeni su na pomenutoj temperaturi.

Uticaj mešanja na produkciju ispitivan je fermentacijom u OPS-u: u termostatu bez mešanja i na rotacionoj mućkalici na 100 i 200 rpm.

U eksperimentima ispitivanja uticaja koncentracije izvora ugljenika u podlozi na produkciju levana korišćen je OPS i modifikovani OPS (60 g/L, 200 g/L, 300 g/L, 400 g/L i 500 g/L saharoze).

Uticaj vrste izvora azota na produkciju levana ispitivan je upotrebom i organskih i neorganskih izvora. Sadržaj ugljenika i azota u ovim podlogama je bio jednak kao u OPS-u. Ekstrakt kvasca (EK), mesni ekstrakt (ME) i pepton korišćeni su u podlogama sa saharozom i organskim izvorom azota (NoPS). Tačan sadržaj azota u komercijalnim organskim izvorima azota izračunat je prema rezultatima mikroanalize koja je rađena na

automatskom analizatoru Vario EL III CHNS/O Elementar analize firme Elementar. Amonijum-sulfat, amonijum-hlorid i natrijum-nitrat upotrebljavani su za podloge sa saharozom i neorganskim izvorom azota (NnPS).

3.6. Optimizacija produkcije levana upotrebom RSM-a u NnPS-u

Ispitivan je istovremeni uticaj različitih koncentracija saharoze (izvor ugljenika), amonijum-hlorida (izvor azota) i početne pH vrednosti podloga na produkciju levana. U ovim eksperimentima korišćen je NnPS, odnosno, organski izvor azota (kombinacija mesnog ekstrakta i ekstrakta kvasca) zamenjen je amonijum-hloridom.

Za dizajniranje eksperimenata i regresionu analizu dobijenih rezultata korišćen je „Design Expert” softver verzije 8.0.6 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA). Ponašanje ovakvog sistema može da se objasni jednačinom 3.1. polinoma drugog reda:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ii} X_i^2 \quad (3.1.)$$

gde je Y predviđeni odgovor, β_0 član prekida, β_i linearni član, β_{ii} kvadratni član, β_{ij} član interakcije, a X_i i X_j su kodirani nivoi nezavisnih promenljivih.

RSM je korišćena za postavku dve fermentacije: sistem sa nižom i sistem sa višom koncentracijom saharoze. U prvoj je opseg koncentracije saharoze bio od 60 - 200 g/L, a amonijum-hlorida 1 - 5 g/L, dok je pH vrednost bila u rasponu od 5,5 do 7,5. Eksperimentalni uslovi za drugu fermentaciju bili su u sledećim opsezima vrednosti: saharoza 300 - 400 g/L, amonijum-hlorid 1-5 g/L i pH 6,0 - 7,5. Za svaku fermentaciju pripremano je po 17 proba (erlenmajeri zapremina 250 mL sa po 50 mL podloge) koje su uključivale 5 replikata. Nakon zasejavanja, erlenmajeri sa NnOPS su inkubirani na 37 °C u termostatu bez mešanja tri i četiri dana kod sistema sa nižom i višom koncentracijom saharoze, redom.

3.7. Hemijska analiza i pretretman melase

Sadržaj vlage u melasi određen je sušenjem na 105 °C do konstantne mase, a sadržaj pepela nakon žarenja isušene melase u peći na 550 °C.

Sadržaj ugljenika, azota i sumpora u melasi dobijen je nakon elementalne organske mikroanalize na aparatu Vario EL III CHNS/O Elementar analize firme Elementar.

Minerali u melasi određeni su nakon digestije azotnom kiselinom pomoću Induktivno kuplovane plazme sa atomskim emisionim spektrometrom (ICP-AES) koristeći iCAP 65000 Duo.

Jon-selektivna elektroda Orion 9617NWP korišćena je za određivanje hlorida u melasi.

Količina betaina u melasi određena je metodom po Focht-u [85].

Koncentracija saharoze u melasi određena je pomoću „Megazyme” enzimskog kita za određivanje saharoze.

Pretretman melase prvo je obavljen sumpornom kiselinom, a zatim aktivnim ugljem. Nakon odmeravanja 400 g melase i rastvaranja u 500 mL destilovane vode, sumpornom kiselinom (4 mol/L) je podešeno pH na 3,5 i rastvor je ostavljen preko noći. Formirani talog je odbačen nakon odvajanja filtracijom, a filtrat je neutralisan kalijum-hidroksidom do pH 7, a zatim tretiran aktivnim ugljem (3 % m/V) tokom jednočasovnog mešanja i zagrevanja na 60 °C. Smeša je filtrirana kroz filter papir i rastvorena do ukupne koncentracije saharoze od 200 g/L.

Da bi se dobila optimalna koncentracija pretretirane melase za produkciju levana, pripremljene su serije razblaženja sa sadržajem saharoze od 100 g/L do 200 g/L, sa i bez dodavanja komercijalne saharoze, 3 g/L K_2HPO_4 i 1,6 g/L EK.

3.8. Optimizacija produkcije levana na podlozi sa melasom pomoću RSM-a

Ispitivan je istovremeni uticaj tri različita faktora: procenat saharoze u melasi (% melase) u odnosu na ukupnu koncentraciju saharoze (200 g/L), početna pH vrednost i koncentracija KH_2PO_4 . Opsezi ispitivanih faktora bili su: 50 – 75 % melase, 6,0 – 7,5 pH i 3 – 9 g/L KH_2PO_4 . Za dizajniranje eksperimenata i regresionu analizu dobijenih rezultata korišćen je „Design Expert” softver verzije 7.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA). Upotrebljen je Box-Behnken dizajn sa 17 proba, koje su uključivale 5 replikata. Nakon zasejavanja, erlenmajeri su inkubirani na 37 °C u termostatu bez mešanja pet dana.

3.9. Metode korišćene za strukturnu karakterizaciju polisaharida

3.9.1. Elementalna organska mikroanaliza

Sadržaj ugljenika, vodonika, azota i sumpora je analizirana na automatskom analizatoru Vario EL III CHNS/O Elementar analyze firme Elementar.

3.9.2. Optička rotacija

Optička rotacija određena je na aparatu Rudolph Research Analytical Autopol IV na temperaturi od 25 °C. Uzorci polisaharida za analizu (0,1 g) su rastvarani u 100 mL destilovane vode.

3.9.3. Hidroliza i papirna hromatografija

Čisti uzorci polisaharida (5 mg) su totalno hidrolizovani pomoću 4 M trifluorosirćetne kiseline (1 mL) u zatopljenoj ampuli u toku 3 h na temperaturi od 105 °C. Nakon hidrolize, uzorci su koncentrovani do suva pod sniženim pritiskom.

Dobijeni hidrolizati ispitivani su silaznom hromatografijom na hartiji (Whatman No.1). Kao standardi, za poređenje, korišćeni su D-glukopiranoza, D-fruktofuranosa, D-galaktopiranoza i D-manopiranoza.

Hromatografija je rađena preko noći, silaznom metodom, u razvijaču etilacetat : piridin : voda (10 : 4 : 3, v/v/v). Hromatogram je izazivan acetonskim rastvorom srebro-nitrata, zatim alkoholnim ratvorom natrijum-hidroksida [86].

3.9.4. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)

FTIR spektri svih uzoraka polisaharida snimljeni su na aparatu Nicolet 6700 FT u tehnici snimanja ATR („Infrared attenuated total reflectance”).

3.9.5. Merenje viskoziteta

Unutrašnji viskozitet, $[\eta]$, računat je na osnovu vremena protoka (t) na 25 ± 1 °C različitih koncentracija levana, pomoću kapilarnog Ubbelohde viskozimetra dužine 86,05 mm i prečnika 1 mm. Levana je rastvaran u destilovanoj vodi u opsegu koncentracija od 0,6 do 1,0 g/dL. Za računanje relativnog viskoziteta (η_r), korišćena je srednja vrednost tri merenja vremena (t_{sr}), prema jednačini 3.2:

$$\eta_r = t_{sr}/t_0, \quad (3.2.)$$

gde je t_0 vreme protoka rastvarača. Na osnovu η_r računa se specifični viskozitet (η_{sp}) na osnovu jednačine 3.3:

$$\eta_{sp} = \eta_r - 1, \quad (3.3.)$$

a redukovani viskozitet (η_{red}) ili viskozitetni broj pomoću jednačine 3.4:

$$\eta_{red} = \eta_{sp}/c, \quad (3.4.)$$

gde je c koncentracija rastvora uzorka u g/dL.

Unutrašnji viskozitet, $[\eta]$ dobijen je nakon ekstrapolacije ravne linije η_{red} u funkciji koncentracije rastvora levana do nulte koncentracije.

3.9.6. Određivanje molekulske mase

Molekulska masa je određivana gel hromatografijom („Size Exclusive Chromatography”, SEC) na instrumentu Agilent Technologies 1260 Infinity from PSS (Mainz, Germany), koji je opremljen detektorom za merenje indeksa refrakcije (G1362A 1260 RID Agilent Technologies), viskozimetrom (ETA-2010 PSS, Mainz) and MALLS (SLD 7000 PSS, Mainz) [87]. Uzorci polisaharida koncentracije 2 mg/mL su injektovani na pretkolonu Suprema i tri Suprema SEC kolone 100, 3000 i 3000 (PSS, Mainz) sa protokom od 0,5 mL/min. Tokom eksperimenta kolone i detektori su održavani na 50 °C, mobilna faza je bila 0,05 natrijum-nitrat sa 0,02 % natrijum-azidom. Kalibracija je rađena standardnim kitom pululana (PSS, Mainz, Nemačka) sa molekulskim masama u opsegu od 342 do 805 000 Da.

3.9.7. Perjodatna oksidacija levana i Smith-ova degradacija

Vrsta glikozidne veze levana izolovanog iz *B. licheniformis* određen je perjodatnom oksidacijom praćenom Smith-ovom degradacijom i karakterizacijom dobijenih proizvoda gasnom hromatografijom sa masenim detektorom (GC/MS).

Odmereno je 100 mg levana u šlifovan erlenmajer i dodato je 50 mL destilovane vode i 50 mL 0,1 M natrijum-perjodata. Pripremana je i slepa proba, koja je sadržavala vodu i natrijum-perjodat, ali ne i polisaharid. Erlenmajeri su ostavljeni u mraku na temperaturi od 5 °C. Na svakih 6 h odmeravane su probe od po 5,00 mL za određivanje perjodata i mravlje kiseline arsenitnom metodom i jodometrijskom titracijom [88].

Za ispitivanje potrošnje perjodata pripremljena su dva erlenmajera sa šlifovanim zatvaračem u koje je odmereno po 1,7 g natrijum-bikarbonata, 5 mL uzorka ili slepe probe i 10 mL 0,1 N natrijum-arsenita. Erlenmajeri su zatvoreni i ostavljeni u mraku 20 minuta, uz povremeno mućkanje. Nakon toga je u svaku probu dodato po 1 mL 5 M rastvora kalijum-jodida i 1 mL 0,5 % skroba, kao indikatora. Rastvori su titrovani 0,02 N rastvorom joda do pojave plave boje. Oksidacija je trajala 18 h i utrošak perjodata po molu anhidropentozne jedinice određen je konstruisanjem grafika potrošnje perjodata u funkciji vremena i ekstrapolacijom do nulte tačke.

Oslobodena mravlja kiselina nakon oksidacije polisaharida perjodatnom određivana je titrovanjem sa 0,01 M rastvorom natrijum-tiosulfata uz kalijum-jodid i skrob kao indikator, uz poređenje sa slepom probom koja je sadržavala sve komponente, osim polisaharida umesto koga je korišćena destilovana voda. U jedan šlifovan erlenmajer odmereno je 5 mL uzorka, a u drugi 5 mL slepe probe. U oba erlenmajera dodato je po šest kapi 1,2-etandiola da bi se razorio višak perjodata, pa su ostavljeni u mraku uz povremeno mućkanje. Posle 30 minuta, probama je dodato po 1 mL 5 M rastvora kalijum-jodida i 1 mL 0,5 % rastvora skroba, pa je titrovano 0,01 M rastvorom natrijum-tiosulfata do obezbojavanja. Oslobodena mravlja kiselina po molu anhidropentozne jedinice određena je konstruisanjem grafika oslobođene mravlje kiseline u funkciji vremena i ekstrapolacijom do nulte tačke.

Nakon oksidacije perjodatom u trajanju od 18 h, oksidovani levan podvrgnut je Smith-ovoj degradaciji [88]. Preostalom rastvoru polialdehida je dodato 30 kapi 1,2-etandiola da bi se razorio višak perjodata. Nakon 2,5 h rastvor je dijalizovan (Sigma D9402 crevo sa veličinom pora od 14 000 Da) naspram tekuće vode u toku 2 dana i koncentrovan na malu zapreminu, posle čega je redukovan dodatkom 0,3 g natrijum-borhidrida. Nakon 24 h, rastvor je neutralisan dodatkom 2 M sirćetne kiseline do pH 6,0 i potom dijalizovan i koncentrovan do suva.

Dobijeni polialkohol je hidrolizovan po metodi autora Dacheh [40]. Redukovani polialdehid rastvoren je u 3 mL 0,25 % oksalne kiseline i refluktovan 10 min na 100 °C. Nakon hlađenja rastvor je neutralisan dodatkom čvrstog barijum-karbonata. Nastali talog barijum-oksalata odvojen je centrifugiranjem (10 000 obrt/min, 20 °C, 5 min), a supernatant je uparen na malu zapreminu i korišćen za dalju analizu.

Analiza proizvoda hidrolize Smith-ove degradacije je rađena hromatografijom na tankom sloju (DC-Alufolien Kieselgel 60, Merck & Co. Inc., Darmstadt, Nemačka) u razvijaču hloroform : sirćetna kiselina : voda (6 : 7 : 1, v/v/v) [40]. Kao standardi za poređenje korišćeni su: saharoza, glukoza, glicerol, eritritol i fruktoza (1 % rastvori). Hromatogram je izazivan prskanjem 50 % sumpornom kiselinom i zagrevanjem na 100 °C. Poređenjem sa standardima, na osnovu hromatografske pokretljivosti, kao rezultat perjodatne oksidacije i Smith-ove degradacije u uzorku ispitivanog levana identifikovan je samo glicerol.

Proizvodi Smith-ove degradacije levana i standard glicerola acetilovani su prema metodi koju je opisao Tanaka [89] pomoću smeše anhidrida sirćetne kiseline i piridina (1:1), u aparaturi za refluktovanje, zastićenoj od vlage, na ključalom vodenom kupatilu u toku 2 h. Reakcija je prekinuta dodatkom hladne destilovane vode i rastvor je ostavljen preko noći da bi se razorio anhidrid sirćetne kiseline. Potom su dobijeni acetilovani proizvodi ekstrahovani dvaput, a hloroformski sloj je ispiran jednom 20 % rastvorom natrijum-bikarbonata, dvaput destilovanom vodom, zatim je sušen anhidrovanim natrijum-sulfatom i uparen pod sniženim pritiskom. Standard glicerola i acetilovani hidrolizat prethodno perjodatom oksidovanog i redukovanog levana analizirani su pomoću GC/MS.

3.9.7.1. Gasna hromatografija sa masenim spektrometrom

GC/MS analiza rađena je na instrumentu Agilent 7890A opremljenim sa HP-5MS kolonom dimenzija 30 m x 250 μm x 0,25 μm . Temperatura kolone je bila linearno programirana od 40 °C do 315 °C sa brzinom promene temperature od 10 °C/min i inicijalnim jednominutnim i krajnjim zadržavanjem od 16,5 min. Ceo proces je trajao 45 min. Maseni spektar je dobijen jonizacijom elektrona sa energijom od 70 eV.

3.9.8. Metilovanje polisaharida i reduktivno raskidanje glikozidnih veza

Vrsta glikozidnih veza i stepen grananja levana određen je per-O-metilovanjem, a potom reduktivnim raskidanjem svih glikozidnih veza i acetilovanjem. Levani su metilovani po metodi koju je predložio Cuciano [90]. Rađeno je na sobnoj temperaturi u atmosferi inertnog gasa u staklenim vijalama zapremine 20 mL zatvorenim silikonskim zaptivačem i poklopcem sa navojem. U vijale je odmeravano po 60 mg levana, prethodno osušenog na 50 °C preko noći. Odmereni levan je rastvaran u 6 mL dimetil sulfoksida mešanjem 1 h na magnetnoj mešalici, zatim je u rastvor dodato 0,6 g sitno sprasenog NaOH i mešanje je nastavljeno još jedan čas. Nakon toga, u smešu je dodato 0,8 mL metil-jodida i smeša je ostavljena da se meša preko noći zaštićena od svetlosti. Sutradan je dodato još 0,4 g NaOH i posle jednočasovnog mešanja 0,6 mL metil-jodida. Smeša je ponovo ostavljena preko noći, a sledeći dan reakcija je prekinuta dodavanjem hladne destilovane vode uz eksterno hlađenje ledom. Uzorak je dijalizovan dva dana naspram tekuće vode, ekstrahovan dva puta hloroformom i sušen preko noći anhidrovanim natrijum-sulfatom. Nakon sušenja rastvor metilovanog levana je uparen do suva, a stepen metilovanja proveren pomoću FTIR spektroskopije. FTIR spektar metilovanih levana je sniman u ATR tehnici na Thermo Nicolet 6700 aparatu. Odsustvo pika na 3200 – 3600 cm^{-1} je dokaz da je metilovanje uspešno urađeno.

Reduktivno raskidanje svih glikozidnih veza u permetilovanom levanu je rađeno po metodi koju su opisali Rolf i Gray [91] u staklenim vijalama zatvorenim silikonskim zaptivačem i poklopcem sa navojem. Reduktivni agens je pravljen neposredno pre upotrebe

i sadržavao je: 310 μL bortrifluorideterata, 400 μL trietilsilana, 64 μL TFA i 226 μL metilen-hlorida. Na jedan miligram metilovanog levana dodavano je po 550 μL reduktivnog agensa, posle čega je vijala zatvorena i reakciona smeša je ostavljena 24 h na temperaturi od 0 $^{\circ}\text{C}$. Acetilovanje je rađeno na sobnoj temperaturi u vremenskom periodu od 24 h, dodatkom 50 μL anhidrida sirćetne kiseline po jednom miligramu metilovanog uzorka [92]. Nakon acetilovanja, uzorak je neutralisan dodatkom 10 % rastvora natrijum-bikarbonata. Dobijeni acetilovani i metilovani anhidroalditoli su ekstrahovani dva puta metilen-hloridom. Organski ekstrakt je nakon spajanja tri puta ispran destilovanom vodom, osušen anhidrovanim natrijum-sulfatom i skoncentrovan na vakuum uparivaču [93].

Na ovaj način dobijeni 2,5-anhidroalditol derivati su analizirani pomoću GC/MS.

3.9.8.1. GC/MS 2,5 anhidroalditol derivata

Gasna hromatografija rađena je na sveobuhvatnom dvodimenzionalnom gasnom hromatografu sa masenim detektorom, GCxGC/MS (Shimadzu, Japan) i isključenim termalnim modulatorom. Razdvajanje je rađeno na Rtx® koloni (Restek, 30 m \times 0,25 mm i.d., 0,25 μm) sa helijumom kao nosećim gasom. Temperatura kolone je bila linearno programirana od 40 $^{\circ}\text{C}$ do 310 $^{\circ}\text{C}$ sa brzinom promene temperature od 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ i inicijalnim jednominutnim i krajnjim sedmominutnim zadržavanjem. Pikovi su identifikovani poređenjem sa obrascima fragmentacije masenih spektara u literaturi [94,95], a kvantitativna evaluacija rađena je integraljenjem površine pikova.

3.9.9. Nuklearna magnetna rezonancija (NMR)

Svi NMR spektri snimljeni su na instrumentu Bruker AVANCE III 500 spektrometru na 500,26 MHz (^1H) i 125,80 MHz (^{13}C). Spektri su dobijeni na 298 K u deuterisanoj vodi (15 mg/mL) sa 4,4-dimetil-4-silapentan-1-sulfonskom kiselinom (DSS) kao internim standardom (0 ppm).

Za detaljniju analizu signala korišćena je jedna homonuklearna i dve heteronuklearne korelisane dvodimenzionalne NMR tehnike: H-H Korelisana

spektroskopija („Correlated spectroscopy”, COSY), H-C Heteronuklearna koherentnost jednog kvanta („Heteronuclear Single Quantum Coherence”, HSQC), H-C Heteronuklearna korelacija više veza („Heteronuclear Multiple Bond Correlation ”, HMBC). Za poređenje signala korišćen je komercijalni levan, koji je dobijen pomoću *Erwinia herbicola*.

3.10. Sinteza, prečišćavanje i stepen kalemljenja kopolimera levana i polistirena

U troglom balonu opremljenim refluks kondenzatorom i termometrom rastvoreno je 1,25 g levana u destilovanoj vodi, tako da se dobije 20 % rastvor. Nakon rastvaranja dodato je 0,0253 g SDS-a kao emulgatora i stiren u masenom odnosu 1:1 prema levanu. Komponente su mešane 30 minuta do dostizanja željenih temperatura reakcije (u opsegu od 35 °C do 75 °C, sa intervalima od 5 °C). Po dostizanju temperature reakcije dodavano je $1,5 \times 10^{-4}$ mola termalnog inicijatora reakcije kalijum-persulfata (KPS-a) i uz konstantno mešanje održavana je temperatura dodatnih 15-210 minuta. Pored variranja temperature i dužine reakcije, u nekim sintezama korišćeni su:

- koaktivatori reakcije – amini (0,02 mola), odnosno, *n*-propilamin, izobutilamin, *n*-pentilamin, *n*-heksilamin, dietanolamin, dibutilamin, 4-(2-hidroksietil)morfolin, N,N-dimetiletanolamin i N,N-dietiletanolamin;
- redoks inicijator – askorbinska kiselina ($0,75 \times 10^{-4}$ – $2,25 \times 10^{-4}$ mola) i
- atmosfera azota [96].

Nakon reakcije kalemljenja dobijena smeša je prenetu u čašu sa 20 mL metanola i ostavljena da stoji 18 h na sobnoj temperaturi, da bi se obezbedilo što bolje uklanjanje neizreagovanog monomera stirena, koji je rastvoran u metanolu. Nakon toga, uklanjanje homopolimera polistirena rađeno je ekstrakcijom u hloroformu (15 mL). Ekstrakcija je ponavljana sve dok je u hloroformskoj fazi precipitirao PS homopolimer nakon dodatka metanola. Kada je PS homopolimer odvojen, kao krajnji proizvod dobijen je kalemljen kopolimer levana i polistirena (Lev-g-PS).

Odnos PS i levana u dobijenom kopolimeru određen je pomoću hidrolize 1 M HCl. Hidroliza svakog uzorka kopolimera rađena je u balonu sa refluks kondenzatorom, a smeša je zagrevana u kaloti. U zavisnosti od procenta stepena kalemljenja (G (%)) hidroliza je

trajala između 1 h i 1,5 h na temperaturi od 200 °C. Nehidrolizovani PS je po hlađenju smeše odvojen filtriranjem i sušen u sušnici na 50 °C do konstantne mase [77,97].

Stepen kalemljenja, G (%) dobijenih Lev-g-PS kopolimera računat je prema jednačini 3.5:

$$G(\%) = (m_1 / m_2) * 100 \quad (3.5.)$$

u kojoj je m_1 masa nehidrolizovanog polistirena, a m_2 masa Lev-g-PS kopolimera.

Sve sinteze su rađene u triplikatu i dobijeni rezultati su prikazani kao srednje vrednosti.

3.11. Metode korišćene za strukturnu karakterizaciju kopolimera levana i polistirena

3.11.1. FTIR spektroskopija

FTIR spektroskopija korišćena je za poređenje uzoraka levana, polistirena nakon hidrolize i Lev-g-PS kopolimera. FTIR spektri su snimljeni pomoću Thermo Nicolet 6700 spektrofotometra, a uzorci su prethodno sprášeni i homogenizovani sa KBr-om u formu diska.

3.11.2. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Skenirajućom elektronskom mikroskopijom analizirana je morfologija levana i Lev-g-PS kopolimera. Uzorci Lev-g-PS su postavljeni na bakar i metalizirani sa zlatopaladijumom na raspršivaču tipa Polaron SC 502 i snimani pomoću SEM-a (Joel JSM 6610 LV) sa filamentom koji je radio na 20 keV. Mikrostrukturalna analiza levana rađena je pomoću SEM-a (Joel JSM 6390 LV) i uzorci su oblagani zlatom na raspršivaču tipa BALTEC SCD 005.

3.11.3. Simultana termogravimetrijska/diferencijalnotermička analiza (TG/DTA)

Ispitivanje termičkih osobina uzoraka levana, polistirena i tri Lev-g-PS kopolimera različitog stepena grananja urađeno je na instrumentu SDT Q600 (TA Instruments) za

TG/DTA analizu u intervalu od sobne temperature do oko 600 °C, u platinskim posudama i dinamičkoj atmosferi azota sa protokom od 100 cm³/min. Brzina zagrevanja iznosila je 20 °C/min, a masa uzoraka bila je između 4 i 8 mg.

3.11.4. Difrakcija X-zraka (XRD)

Difrakciona analiza X-zracima korišćena je za određivanje i praćenje faznog sastava uzoraka: levana, polistirena i Lev-g-PS kopolimera. Uzorci su analizirani na rendgenskom difraktometru marke "PHILIPS", model PW-1710, sa zakrivljenim grafitnim monohromatorom i scintilacionim brojačem. Intenziteti difraktovanog CuK α rendgenskog zračenja ($\lambda=1,54178 \text{ \AA}$) mereni su na sobnoj temperaturi u intervalima 0,02 °2 θ i vremenu od 1 s, a u opsegu od 3 ° do 65 °2 θ . Rendgenska cev je bila opterećena naponom od 40 kV i strujom 30 mA, dok su prorezi za usmeravanje primarnog i difraktovanog snopa bili 1° i 0,1 mm.

3.11.5. ¹³C NMR spektroskopija

Uzorak Lev-g-PS rastvoren je u dimetilformamidu (25 mg/mL) i analiziran pomoću NMR sa ¹³C atomom. ¹³C-NMR spektar kopolimera je snimljen na Bruker AVANCE III 500 spektrometru na 298 K, pri jačini polja od 125,80 MHz.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

Bakterija *B. licheniformis* NS032 je izolovana iz naftnog mulja, a pored sposobnosti za degradaciju različitih ugljovodonika proizvodi i egzopolisaharide. U okviru ove teze proučavan je uticaj različitih uslova fermentacije na produkciju levana ove bakterije, ispitivana je struktura polisaharida dobijenih u različitim uslovima fermentacije, a dobijeni polisaharid je korišćen za sinteze kopolimera levana i polistirena.

U prvoj seriji eksperimenata ispitivani su faktori sredine, kao što su temperatura, mešanje, koncentracije izvora ugljenika i azota u podlozi, tehnikom jedne promenljive u vremenu, da bi se utvrdilo koji faktori su ključni za dobijanje visokog prinosa levana. Pošto ovakav pristup istraživanja ne obuhvata interakcije između faktora, koje takođe mogu da doprinesu produkciji, efekti ključnih faktora ispitivani su metodom površine odgovora. Zatim, u narednoj seriji eksperimenata optimizacije produkcije levana, RSM-om ispitivana je mogućnost zamene saharoze, kao izvora ugljenika u podlogama, melasom koja nastaje kao nusproizvod proizvodnje šećera saharoze i samim tim je finansijski pristupačnija.

Nakon eksperimenata optimizacije produkcije levana, poseban deo rada bio je fokusiran na ispitivanje strukture dobijenog fruktana sledećim metodama: hidrolizom i papirnom hromatografijom hidrolizata, elementalnom organskom analizom, FTIR i NMR spektroskopijama, određivanjem optičke rotacije, viskoziteta i molekulske mase, perjodatnom oksidacijom i Smith-ovom degradacijom i metilacionom analizom.

U poslednjoj seriji eksperimenata ispitivan je uticaj temperature, atmosfere, reakcionog vremena, vrste aminoaktivatora i odnosa KPS/AK na stepen kalemljenja Lev-g-PS kopolimera. Dobijeni kopolimer je strukturno okarakterisan FTIR i ¹³C NMR spektroskopijom, SEM mikroskopijom, TG/DTA i XRD analizom.

4.1. Ispitivanje ključnih promenljivih koje utiču na produkciju levana

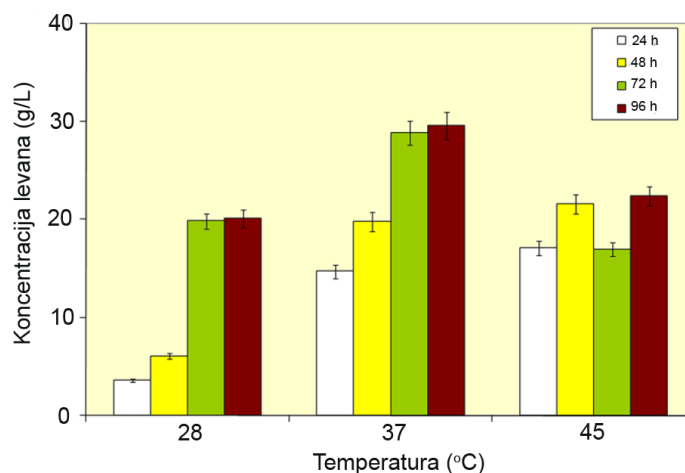
Mikrobna produkcija polisaharida levana i levansaharaze, ključnog enzima za njegovu biosintezu, veoma zavise od uslova fermentacije, kao i mikroorganizma koji se koristi. Brojni autori su identifikovali različite faktore koji utiču na prinos polisaharida kao što su koncentracija saharoze, temperatura, mešanje, vrsta izvora azota, pH podloge i

koncentracija mikroelemenata [14,20,35,39,98]. Međutim, svaki mikrobní soj pokazuje drugačiji odgovor na pomenute faktore sredine.

Tehnikom jedne promenljive u vremenu ispitivan je uticaj temperature, aeracije i koncentracije izvora ugljenika i azota u podlozi, tako što je u svakom eksperimentu jedan faktor menjan, dok su ostali održavani konstantnim. Iako se ovakvim pristupom ne ispituju interakcije između faktora, on je koristan za početnu selekciju faktora za naredne eksperimente.

Efekat ispitivanih faktora na produkciju levana pomoću bakterije *B. licheniformis* NS032 prikazan je na slikama 4.1. – 4.4. Prinos levana je meren nakon fermentacije u OPS-u, koja je trajala četiri dana. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti triplicate sa standardnim devijacijama.

Na slici 4.1. uočava se da je optimalna temperatura za produkciju levana ovog soja 37 °C, jer se dobijene vrednosti na osnovu t testa sparenih promenljivih statistički razlikuju od vrednosti dobijenih i na 28 i na 45 °C ($P < 0,05$). Uobičajene optimalne temperature za većinu mikrobnih producenata levana



Slika 4.1. Efekat temperature na produkciju levana

su ispod 30 °C, dok se najviši rast ovih sojeva dostiže u opsegu od 34 - 37 °C [20,22,35,45,99,100]. Uzimajući u obzir da su autori Liu (2009) i Kumar (2007), zaključili da bakterije, u odnosu na optimalnu temperaturu za ćelijski rast, favorizuju niže temperature za produkciju [101,102] i da *B. licheniformis* može da raste na temperaturama iznad 50 °C, nije neobičan temperaturni optimum koji je dobijen za NS032 soj.

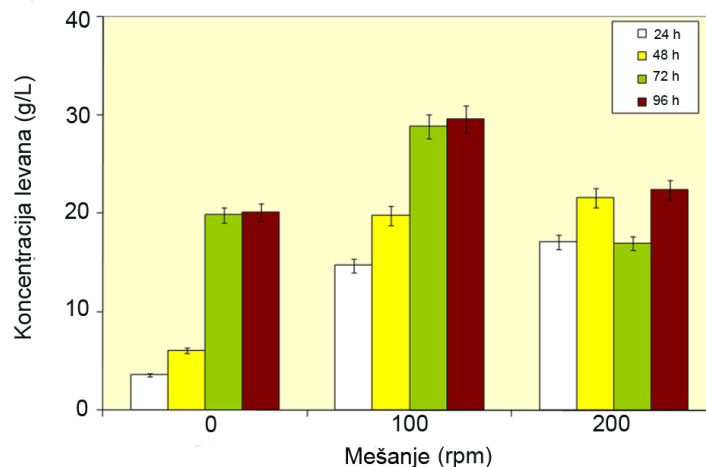
Slika 4.2. prikazuje uticaj aeracije podloge mešanjem na rotacionoj mućkalici na 37 °C. Aeracija podloge nije imala signifikantan efekat ($P=0,42$) na produkciju levana soja NS032. Na osnovu ovih rezultata, svi naredni eksperimenti rađeni su na istoj temperaturi i bez mešanja.

Radi postizanja balansa između mikrobnog rasta i produkcije polisaharida, fermentacija većine bakterija koje proizvode levansaharazu se uz umereno mešanje [99,101,103]. Abdel Fattah i koautori [35] pokazali su da mešanje ne utiče na produkciju levansaharaze, već

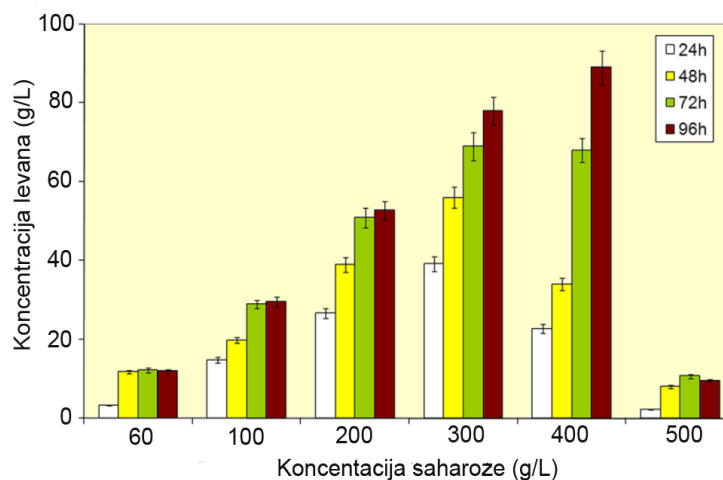
samo na prinos levana koga proizvodi *P. polymyxa* EKS-3. Ovo je u skladu sa činjenicom da maksimalni mikrobni rast ne mora obavezno da bude u korelaciji i sa maksimalnom proizvodnjom metabolita. Neki autori su takođe pokazali efikasnu produkciju levana tokom bioprocasa bez mešanja [20,22].

Produkcija levana bakterije *B. licheniformis* NS032 zavisi od koncentracije saharoze u medijumu za fermentaciju (slika 4.3.). Maksimalni prinos (0,26 – 0,29 g levana/g saharoze) dostiže se u modifikovanoj OPS podlozi sa inicijalnom koncentracijom saharoze u opsegu od 100 – 200 g/L.

Kada je koncentracija saharoze iznad 400 g/L, produkcija levana značajno opada. Visok prinos levana, sa neznatno nižom produktivnošću (0,22 – 0,23 g levana/g saharoze), uočava se sa inicijalnom koncentracijom saharoze od 300 – 400 g/L. Takođe, vreme neophodno za dobijanje maksimalnog



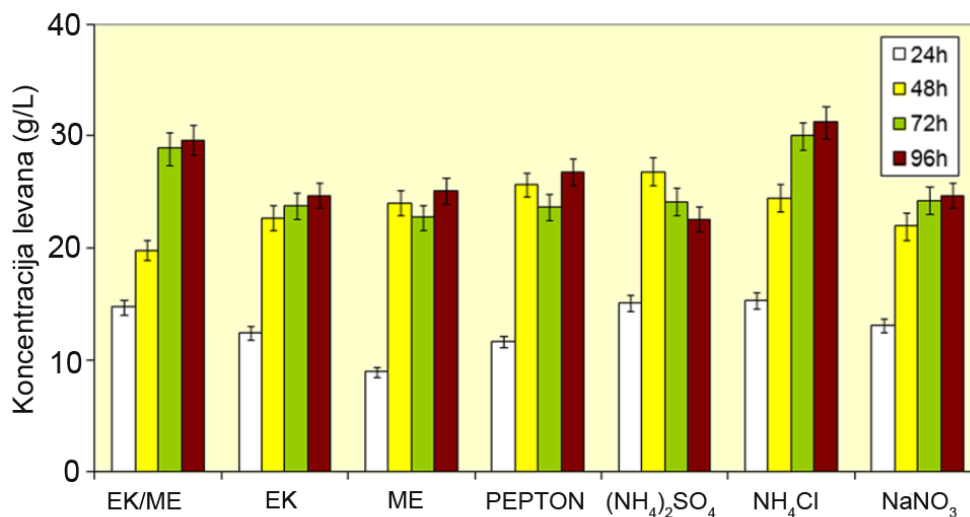
Slika 4.2. Efekat mešanja na produkciju levana



Slika 4.3. Uticaj inicijalne koncentracije saharoze na produkciju levana

prinosa levana zavisi od koncentracije saharoze, jer pri koncentracijama saharoze nižim od 200 g/L maksimalni prinos se postiže nakon 72 h, dok na koncentracijama iznad pomenute, prinos levana kontinuirano raste. Kod različitih bakterijskih producenata levana najviši prinosi u šaržnoj fermentaciji suspendovanih ćelija bili su od 30 g/L do 60 g/L levana [104]. Fermentacije se uobičajeno izvode na koncentracijama saharoze između 100 i 200 g/L, dok su uglavnom oskudni podaci o toleranciji na visoke koncentracije saharoze. Izuzeci su studije sa visokom produkcijom levana: bakterije *Bacillus subtilis* (natto) na podlozi sa koncentracijom saharoze od 400 g/L [105] i *Zymomonas mobilis* sa optimalnom koncentracijom saharoze od 300 g/L [22,106].

Najbolji izvor azota, od ispitivanih organskih, za produkciju levana *B. licheniformis* je bio kombinacija EK i ME (EK/ME), a neorganskih amonijum-hlorid (slika 4.4.). Suprotno prethodnim istraživanjima sa drugim levan produkujućim mikroorganizmima, u odnosu na OPS podlogu u kojoj je prisutno EK/ME, ne uočavaju se velike razlike u prinosima levana kada se u podlozi koristi amonijum-hlorid. Za većinu mikroorganizama, upotreba neorganskog izvora azota dovodi do sniženja ćelijske biomase i produkcije egzopolisaharida, zbog čega se koristi organski azot: ekstrakt kvasca [22,101], pekarski kvasac [100] ili kombinacija ekstrakta kvasca i peptona [99].



Slika 4.4. Uticaj izvora azota na produkciju levana (EK-ekstrakt kvasca, ME-mesni ekstrakt)

Takođe, praćena je pH vrednost podloge, pre i tokom fermentacije na različitim izvorima azota, a dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Promena pH vrednosti podloge tokom fermentacije na različitim izvorima azota (EK-ekstrakt kvasca, ME-mesni ekstrakt)

Izvor azota	Vreme (h)			
	24	48	72	96
EK/ME	6,08	5,78	5,33	5,49
EK	6,21	5,48	5,31	5,32
ME	6,35	5,65	5,37	5,42
Pepton	6,42	5,91	5,42	5,59
(NH ₄) ₂ SO ₄	6,02	5,4	4, 3	4,75
NH ₄ Cl	5,94	5,00	4,90	4,57
NaNO ₃	6,80	6,59	6,21	6,26

Tokom fermentacije pH vrednosti su opadale u odnosu na inicijalnu, koja je iznosila 6,5 - 7,0, do opsega između 4,6 i 6,3. Inicijalna pH podloge se smatra važnim faktorom sa uticajem na ćelijsku membranu, unos hranljivih supstanci i biosintezu egzopolisaharida. Osim toga, za polisaharid *P. polymyxa* EJS-3 dobijen je različit pH optimum za proizvodnju biomase i polisaharida, gde je optimalni inicijalni pH za produkciju egzopolisaharida bio 8,0, a za rast ćelija 6,0 [101]. Sintaza levana počinje iz saharoze, na koju se nastavlja ugrađivanje fruktoznih jedinica [33], ostatak glukoze se metaboliše i koristi za produkciju biomase, a količina i vrsta organskih kiselina, kao krajnjih proizvoda metabolizma, zavisi od vrste mikroorganizma i količine korišćenog supstrata.

4.2. Primena RSM-a za optimizaciju produkcije levana

Nakon eksperimenata ispitivanja ključnih promenljivih koje utiču na produkciju levana, postavljena su dva sistema fermentacija u kojima je korišćena RSM. Ovom metodom ispitivane su interakcije između tri ključna faktora: koncentracije amonijum-hlorida, kao pogodnog neorganskog izvora azota, koncentracije saharoze i početnog pH podloge. Sve fermentacije rađene su na 37 °C i bez mešanja. Sistemi fermentacija su se razlikovali po opsegu koncentracija izvora ugljenika u podlogama: NnPS za nižom

koncentracijom saharoze (60-200 g/L) i NnPS sa višom koncentracijom saharoze (300 – 400 g/L).

4.2.1. Ispitivanje sistema fermentacije sa nižom koncentracijom saharoze

Dizajn promenljivih u sistemu sa nižom koncentracijom saharoze, zajedno sa predviđenim i dobijenim prinosom levana, prikazani su u tabeli 4.2.

Koncentracija saharoze je bila od 60 do 200 g/L, amonijum-hlorida u opsegu od 1 – 5 g/L, dok je pH vrednost varirana između 5,5 i 7,5. U zavisnosti od uslova fermentacije, uočava se znatna razlika u prinosu levana, sa maksimumom od 43,81 g/L levana (uzorak 14) i minimumom od 3,52 g/L levana (uzorak 2). Najviša produktivnost levana od 0,30 g levana/g saharoze postignuta je u uzorku 11, dok je najniža u uzorku 6 (0,03 g levana/g saharoze).

Tabela 4.2. Dizajn eksperimenta i rezultati Box-Behnken optimizacije u sistemu sa nižom koncentracijom saharoze (X_1 - koncentracija saharoze (g/L), X_2 - koncentracija amonijum-hlorida (g/L) i X_3 - inicijalna pH vrednost podloge)

Broj uzorka	X_1 (g/L)	X_2 (g/L)	X_3	Dobijena koncentracija levana (g/L)	Predviđena koncentracija levana (g/L)
1	130,0	5,0	5,5	7,27	8,31
2	60,0	3,0	5,5	3,52	1,01
3	130,0	5,0	7,5	30,07	27,37
4	130,0	3,0	6,5	36,62	36,52
5	60,0	3,0	7,5	9,58	10,81
6	130,0	1,0	5,5	3,78	6,48
7	130,0	3,0	6,5	35,66	36,52
8	200,0	5,0	6,5	37,28	37,47
9	200,0	3,0	7,5	41,90	44,41
10	130,0	3,0	6,5	34,10	36,52
11	60,0	5,0	6,5	18,36	19,83
12	130,0	3,0	6,5	37,42	36,52
13	60,0	1,0	6,5	16,09	15,90
14	200,0	1,0	6,5	43,81	42,34
15	130,0	3,0	6,5	38,80	36,52
16	200,0	3,0	5,5	12,74	11,50
17	130,0	1,0	7,5	31,19	30,40

Predviđeni odgovor produkcije polisaharida dobijen je prema jednačini 4.1:

$$Y = 36,52 + 11,0X_1 - 0,24X_2 + 10,68X_3 - 2,2X_1X_2 - 5,7 X_1X_3 - 1,15X_2X_3 - 4,39X_1^2 - 3,25X_2^2 - 15,2X_3^2, \quad (4.1.)$$

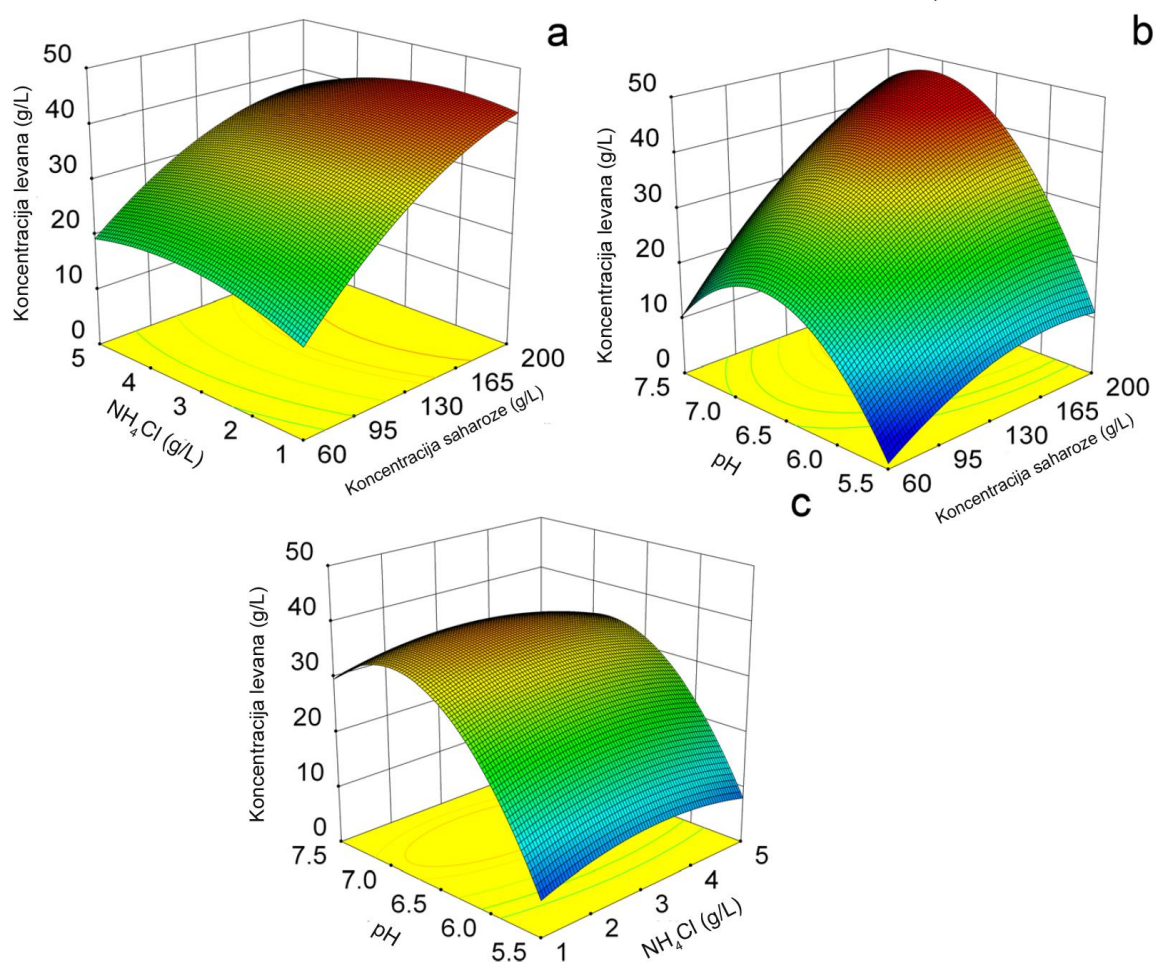
gde je Y predviđeni prinos levana u g/L, X_1 koncentracija saharoze, X_2 koncentracija amonijum-hlorida i X_3 inicijalna pH vrednost podloge. Statistička signifikantnost jednačine 4.1. za površinu odgovora kvadratnog modela, potvrđena je Fišerovim testom (F test) i Analizom varijanse i prikazana u tabeli 4.3.

ANOVA kvadratnog regresionog modela pokazala je signifikantnost modela, sa F vrednošću od 50,46 i P vrednošću manjom od 0,0001. Test nepodesnosti modela („lack of fit”) nije bio signifikantan u odnosu na grešku (P vrednost viša od 0,05), što pokazuje visok nivo tačnosti i konzistentnost eksperimentalnih rezultata. Kvalitet modela procenjen je pomoću koeficijenta determinacije (R^2), jer što je ova vrednost bliža broju 1, to je veća korelacija između eksperimentalnih i predviđenih vrednosti.

Tabela 4.3. Analiza varijanse (ANOVA) za kvadratni model polinoma u sistemu sa nižom koncentracijom saharoze

Izvor	Suma kvadrata odstupanja (SS)	Broj stepeni slobode (dF)	Srednji kvadrat odstupanja (MS)	F-vrednost	P-vrednost
Model	3208,32	9	356,48	50,46	<0,0001
X_1 - saharoza	971,96	1	971,96	137,59	<0,0001
X_2 - NH_4Cl	0,45	1	0,45	0,063	0,8087
X_3 - pH	912,29	1	912,29	129,15	<0,0001
X_1X_2	19,36	1	19,36	2,74	0,1418
X_1X_3	133,40	1	133,40	18,88	0,0034
X_2X_3	5,31	1	5,31	0,75	0,4145
X_1^2	81,10	1	81,10	11,48	0,0116
X_2^2	44,37	1	44,37	6,28	0,0406
X_3^2	972,32	1	972,32	137,65	<0,0001
Ostatak	49,45	7	7,06	49,45	7
„Lack of fit”	36,83	3	12,28	3,89	0,1111
Greška	12,61	4	3,15		
Ukupno	3257,77	16			

Dobijena vrednost R^2 od 0,9848 znači da modelom ne može da se objasni samo oko 1,52 % ukupnih varijacija. Predviđen R^2 od 0,8129 se umereno slaže sa prilagođenim R^2 od 0,9653. Adekvatna preciznost meri odnos signala i šuma i poželjno je da bude veća od četiri [111], a pošto je dobijeni odnos 20,292, može se zaključiti da je signal adekvatan. Da bi se proverila signifikantnost svakog koeficijenta korišćena je P vrednost, odnosno, sve vrednosti manje od 0,05 dokazuju signifikantnost. Iz tabele 4.3. se može zapaziti da su signifikantni dva linearna koeficijenta (koncentracija saharoze i pH), svi kvadratni koeficijenti i jedan koeficijent interakcije (saharozna x pH).



Slika 4.4. Trodimenzionalni dijagrami uticaja: (a) koncentracija saharoze i NH_4Cl (b) koncentracije saharoze i pH (c) koncentracije NH_4Cl i pH podloge na produkciju levana *B. licheniformis* u sistemu sa nižom koncentracijom saharoze

Trodimenzionalni dijagrami površine odgovora, prikazani na slici 4.4. omogućavaju vizuelnu interpretaciju odgovora sa površinom ispitivanog faktora i vrstom interakcija između ispitivanih promenljivih. Slika 4.4.a pokazuje da porast koncentracije saharoze dovodi do porasta koncentracije levana, dok povećanje koncentracije amonijum-hlorida nema uticaja na prinos levana. Porastom inicijalne pH vrednosti do oko 6,8, zajedno sa povećanjem koncentracije saharoze, postiže se maksimalni prinos levana, ali daljim porastom pH snižava se produkcija polisaharida (slika 4.4.b). Na slici 4.4.c se uočava da pomenuta maksimalna produkcija levana na pH 6,8, ne zavisi od koncentracije amonijum-hlorida.

Da bi se odredile optimalne vrednosti za ispitivane promenljive, korišćena je numerička funkcija za optimizaciju „Design Expert” softvera. Optimalni uslovi za produkciju levana bili su podlozi sa 196,75 g/L saharoze, 2,44 g/L amonijum-hlorida i inicijalnog pH od 6,97 (NH₄Cl-PS200), a maksimalna predviđena vrednost za prinos levana bila je 47,84 g/L. Da bi se eksperimentalno potvrdili predviđeni optimalni uslovi, izvedene su tri dodatne fermentacije, u kojima je prinos levana iznosio $46,3 \pm 1,9$ g/L, što se slaže sa modelom predviđenom vrednošću.

4.2.2. Ispitivanje sistema fermentacije sa višom koncentracijom saharoze

U sistemu sa višom koncentracijom saharoze dizajn promenljivih, zajedno sa predviđenim i dobijenim prinosom levana, prikazani su u tabeli 4.4. Koncentracija saharoze bila je u opsegu od 300 - 400 g/L, koncentracija amonijum-hlorida od 1 – 5 g/L, dok je pH vrednost varirana između 6,5 i 7,5. Poredeći sa sistemom sa nižom koncentracijom saharoze, u ovom setu eksperimenata opseg ispitivanih koncentracija amonijum-hlorida je bio jednak, dok je pH opseg proširen ka višim vrednostima. Maksimalne vrednosti za prinos i za produktivnost levana (g levana/g saharoze) dobijene su u uzorku broj 5, a minimalne u uzorku 4. U poređenju sa sistemom sa nižim opsegom koncentracija saharoze, utvrđeno je da je u ovom sistemu produktivnost niža (0,27 g levana/g saharoze).

Tabela 4.4. Dizajn eksperimenta i rezultati Box-Behnken optimizacije u sistemu sa višom koncentracijom saharoze (X_1 - koncentracija saharoze (g/L), X_2 - koncentracija amonijum-hlorida (g/L) i X_3 - inicijalna pH vrednost podloge)

Broj uzorka	X_1 (g/L)	X_2 (g/L)	X_3	Dobijena koncentracija levana (g/L)	Predviđena koncentracija levana (g/L)
1	350,0	3,0	6,75	58,06	58,79
2	300,0	3,0	6,00	16,78	12,70
3	300,0	5,0	6,75	64,36	66,66
4	350,0	1,0	6,00	8,90	9,18
5	350,0	5,0	7,50	92,90	92,64
6	350,0	3,0	6,75	63,06	58,79
7	350,0	1,0	7,50	41,65	39,88
8	350,0	3,0	6,75	56,32	58,79
9	350,0	3,0	6,75	62,11	58,79
10	350,0	5,0	6,00	24,57	26,34
11	300,0	1,0	6,75	29,98	33,77
12	400,0	5,0	6,75	88,91	85,12
13	400,0	1,0	6,75	50,41	48,10
14	350,0	3,0	6,75	54,40	58,79
15	400,0	3,0	7,50	73,52	77,59
16	300,0	3,0	7,50	52,50	50,48
17	400,0	3,0	6,00	16,35	18,37

Koncentraciju levana u sistemu sa višom koncentracijom saharoze moguće je predvideti prema jednačini 4.2:

$$Y = 58,79 + 8,20X_1 + 17,48X_2 + 24,25X_3 + 1,03X_1X_2 + 5,36X_1X_3 + 8,90X_2X_3 - 1,30X_1^2 - 0,93X_2^2 - 17,70X_3^2, \quad (4.2.)$$

gde je Y predviđeni prinos levana u g/L, X_1 koncentracija saharoze, X_2 koncentracija amonijum-hlorida i X_3 inicijalna pH vrednost podloge.

Tabela 4.5. pokazuje ANOVA rezultate za odgovarajući model polinoma. Model je signifikantan sa F vrednošću od 51,72 ($P < 0,001$) i $R^2 = 0,9852$. Predviđen R^2 od 0,8459 se umereno slaže sa prilagođenim R^2 od 0,9661. Adekvatna preciznost (8,97) takođe dokazuje visoku podesnost i tačnost predviđenog modela. Signifikantni su ($P < 0,05$) svi linerni koeficijenti (koncentracije saharoze i amonijum-hlorida i pH), jedan kvadratni koeficijent (pH^2) i dva koeficijenta interakcije (saharozna x pH i amonijum-hlorid x pH).

Tabela 4.5. Analiza varijanse (ANOVA) za kvadratni model polinoma u sistemu sa višom koncentracijom saharoze

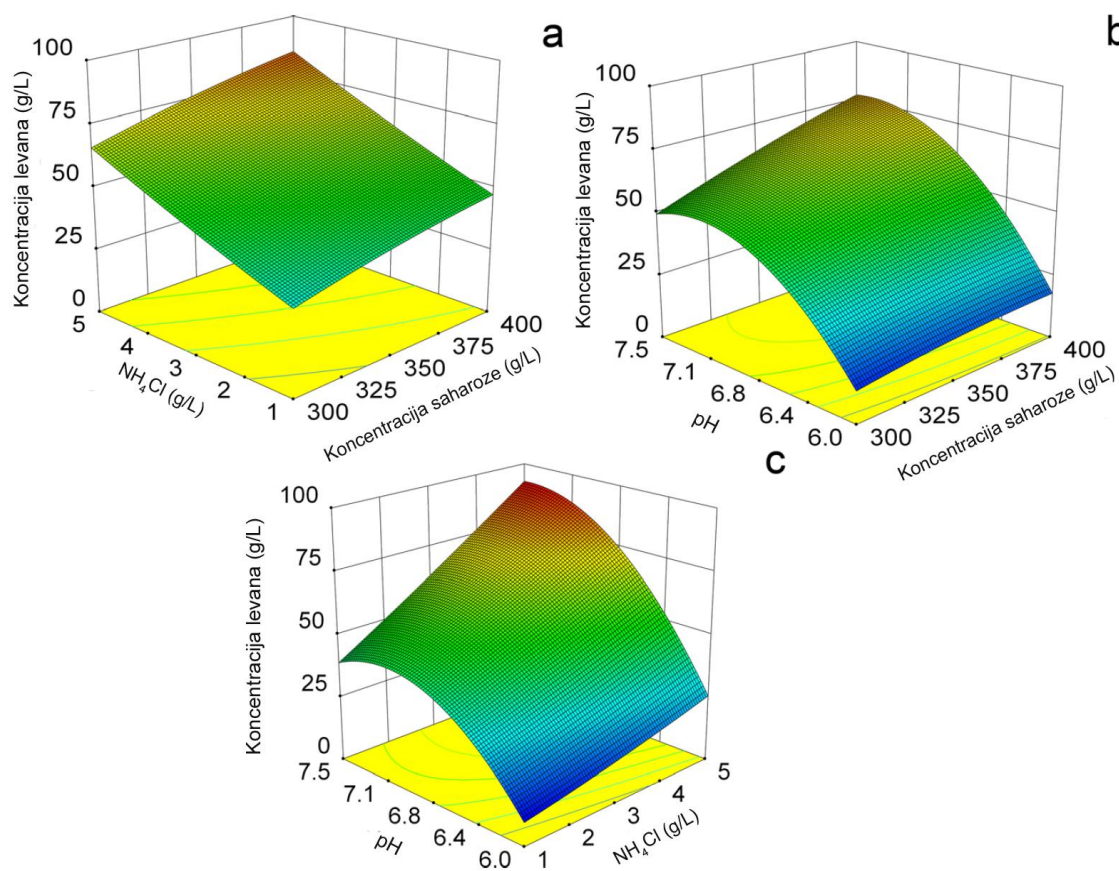
Izvor	Suma kvadrata odstupanja (SS)	Broj stepeni slobode (dF)	Srednji kvadrat odstupanja (MS)	F-vrednost	P-vrednost
Model	9461,68	9	1051,30	51,69	<0,0001
X ₁ - saharoza	537,43	1	537,43	26,44	0,0013
X ₂ - NH ₄ Cl	2443,35	1	2443,35	120,15	<0,0001
X ₃ - pH	4703,53	1	4703,53	231,29	<0,0001
X ₁ X ₂	4,24	1	4,24	0,21	0,6616
X ₁ X ₃	115,03	1	115,03	5,66	0,0490
X ₂ X ₃	317,02	1	317,02	15,59	0,0055
X ₁ ²	7,12	1	7,12	0,35	0,5728
X ₂ ²	3,60	1	3,60	0,18	0,6864
X ₃ ²	1319,49	1	1319,49	64,89	<0,0001
Ostatak	142,35	7	20,34		
„Lack of fit”	87,19	3	29,06	2,11	0,2420
Greška	55,16	4	13,79		
Ukupno	9603,54	16			

Trodimenzionalni dijagrami površine odgovora (slika 4.5.a) jasno pokazuju da se u ispitivanom koncentracionom opsegu saharoze, najveća produkcija levana predviđa na višim koncentracijama amonijum-hlorida. Posmatrajući interakciju između koncentracije saharoze i pH, uočava se da je prinos levana mali na pH vrednostima nižim od 6,8, nezavisno od koncentracije saharoze, a istovremeno, tek na pH vrednostim iznad 7, porast koncentracije saharoze dovodi do povećanja produkcije polisaharida (slika 4.5.b). Slika 4.5.c prikazuje da se visoki prinosi levana postižu upotrebom viših pH vrednosti i viših koncentracija amonijum-hlorida.

Numeričkom funkcijom za optimizaciju dobijeno je da su optimalni uslovi za produkciju levana bili u podlozi sa 397,65 g/L saharoze, 4,62 g/L amonijum-hlorida i inicijalnog pH od 7,31 (NH₄Cl-PS400), a maksimalna predviđena vrednost za prinos levana je 99,19 g/L. Pomoću dodatne tri fermentacije potvrđeni su predviđeni optimalni uslovi, a dobijeni prinos levana bio je 94,4 ± 4,1 g/L.

Evidentno je da početno pH podloge ima centralnu ulogu u sistemima sa nižom i višom koncentracijom saharoze. Takođe, viša inicijalna pH vrednost u sistemima sa višom koncentracijom saharoze ukazuje na korelaciju sa količinom organskih kiselina koje se

grade tokom sinteze polisaharida. Studije na *Z. mobilis* i *Bacillus spp.* ukazuju da je optimalna pH podloge između 5 i 7 [103,104]. Međutim, optimalna pH ne zavisi samo od sastava podloge, već i od uslova kultivacije. Pokazano je da je za višestruku šaržnu fermentaciju ćelija *B. subtilis* natto imobilizovanih u alginatu neophodna kontrola inicijalne pH na 5,6 - 5,8, a za šaržnu kulturu u fermentoru najpogodnija pH je 7,0 [107,108].



Slika 4.5. Trodimenzionalni dijagrami uticaja: (a) koncentracija saharoze i NH_4Cl (b) koncentracije saharoze i pH medijuma (c) koncentracije NH_4Cl i pH podloge na produkciju levana *B. licheniformis* u sistemu sa višom koncentracijom saharoze

Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa ispitivanjima koja su publikovali Silbir i koautori (2014): u odnosu na tri ispitivana faktora (koncentracija saharoze, dužina fermentacije i pH), inicijalna pH vrednost podloge imala je najveći uticaj na produkciju levana pomoću *Z. mobilis* [22]. Važan uticaj pH vrednosti na produkciju levana može da se

objasni činjenicama da je biosintetički put produkcije egzopolisaharida pH zavisian i da je kod Gram pozitivnih bakterija određena pH vrednost neophodna za ekskreciju enzima levansaharaze (Videti poglavlje 2.3.3).

Ako se uporede rezultati dobijeni tehnikom jedne promenljive u vremenu i RSM, maksimalni predviđeni i dobijeni prinosi levana u NH_4Cl -PS200 se slažu sa vrednostima dobijenim u OPS-u (slika 4.4). Međutim, u NH_4Cl -PS400, maksimalni predviđeni i dobijeni prinosi levana su viši od prikazanih na slici 4.4, što je verovatno uticaj inicijalnog pH podloge.

4.3. Upotreba melase kao izvora ugljenika za produkciju levana

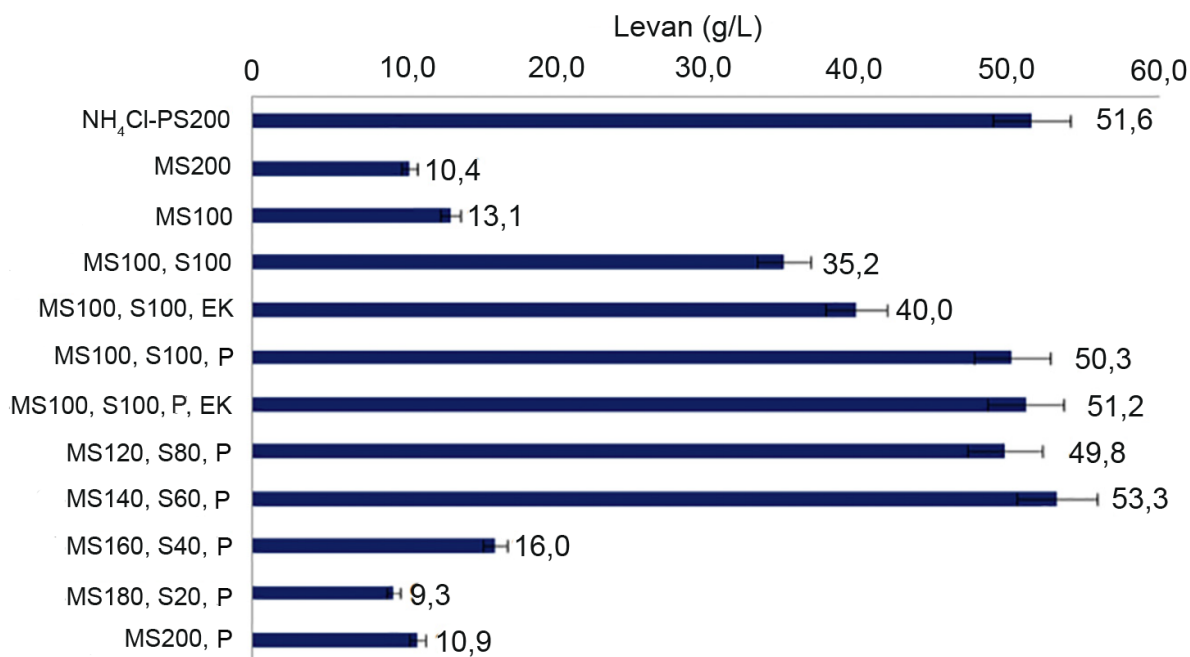
U prethodnim eksperimentima optimizacije produkcije levana pomoću RSM dobijeni su visoki prinosi levana na podlogama sa 200 i 400 g/L saharoze, stoga je u narednoj seriji eksperimenata ispitivana mogućnost supstitucije saharoze melasom, koja je ekonomski isplativiji izvor ugljenika. Prvo je analiziran hemijski sastav i načini pretretmana melase, a potom efekti modifikovane podloge sa melasom na produkciju levana *B. licheniformis*.

4.3.1. Melasa šećerne repe: hemijski sastav i pretretman

Uzorak melase sa kojim je rađeno je sadržao 77,8 % suve supstance. Procenat pepela bio je 6,3 %, betaina 5,9 %, a hlorida 1,25 %. Od značajnih ugljenohidratnih komponenti dobijeno je da melasa sadrži 49,4 % saharoze i 0,55 % rafinoze. Elementalna organska mikroanaliza je pokazala da se melasa sastoji od ugljenika (38,64 %), vodonika (5,93 %), azota (2,02 %) i sumpora (0,56 %). ICP-AES analizom ustanovljeno je da u melasi ima 1,98 % kalijuma, 1,12 % natrijuma, 0,44 % kalcijuma, 70 ppm gvožđa, 51 ppm magnezijuma, 4,2 ppm cinka, 2,5 ppm mangana, 1,9 ppm nikla, 0,71 ppm bakra i manje od 0,05 % fosfata.

Na slici 4.6. prikazano je poređenje prinosa levana *B. licheniformis* nakon fermentacije u NH_4Cl -PS200 (51,6 g/L levana) i različitih podloga sa melasom. Da bi se

uklonile neželjene komponente iz melase rađen je pretretman sa H_2SO_4 i aktivnim ugljem. Potom je dobijeni rastvor u kome je ukupni sadržaj saharoze u melasi bio 200 g/L (MS200) korišćen kao podloga za produkciju polisaharida. Pošto je ova podloga imala inhibitorno dejstvo na produkciju levana (10,4 g/L), rastvor melase je dalje razblaživan. Podloga sa melasom razblaženom do ukupnog sadržaja saharoze od 100 g/L (MS100) dala je sličan prinos levana (13,1 g/L). MS100 sa dodatkom komercijalne saharoze koncentracije 100 g/L (S100) dovela je do povećanja prinosa levana, koja je i dalje bila niža nego u NH_4Cl -PS200. Međutim, tek dodatak fosfata (P) u MS100, S100 podlogu pojačao je sintezu levana do produktivnosti od 0,25-0,27 g levana/g saharoze, koja je bliska sa produktivnošću u modifikovanom OPS-u sa inicijalnom koncentracijom saharoze u opsegu od 100 – 200 g/L (Videti sekciju 4.1). Dodatak P u MS200, EK u MS100, S100 i EK u MS100, S100, P nisu značajno uticali na produktivnost levana.



Slika 4.6. Produkcija levana *B. licheniformis* na različitim podlogama sa: 200 g/L saharoze i NH_4Cl kao izvorom N (NH_4Cl -PS200), 200, 180, 160, 140, 120 i 100 g/L saharoze u melasi (MS200, MS180, MS160, MS140, MS120, MS100) i koncentracijama saharoze od 100, 80, 60, 40, 20 g/L (S100, S80, S60, S40, S20), dodatkom ekstrakta kvasca (EK) ili fosfata (P).

Pošto se dodatak P u podloge sa melasom pokazao kao uticajan faktor, on je dodavan u narednim fermentacijama na podlogama sa variranim koncentracijama melase i saharoze tako da je ukupna koncentracija saharoze ostajala 200 g/L. Odnosno, pripremane su modifikovane MS100, S100 podloge u kojima je koncentracija saharoze u melasi bila: 120 g/L (MS120), 140 g/L (MS140), 160 g/L (MS160) i 180 g/L (MS180), a komercijalne saharoze: 80 g/L (S80), 60 g/L (S60), 40 g/L (S40), 20 g/L (S20) (slika 4.6). Ove fermentacije su pokazale da povećanje udela melase u podlogama iznad određenog nivoa, inhibira produkciju levana, nezavisno od prisustva P.

Na osnovu slike 4.6. može se zaključiti da koncentracija fosfata u melasi nije bila dovoljna za rast bakterija, pa je dodavanje P u podlogu znatno unapredilo produkciju levana. Značaj prisustva P u podlogama sa melasom je već uočen u ispitivanjima produkcije polisaharida ksantana [109] i gelana [110]. Osim toga, najviši prinosi levana su dobijeni kombinovanjem razblaživanja melase i dodavanjem komercijalne saharoze. Ovo se može objasniti smanjenjem inhibitornog efekta mineralnih komponenti prisutnih u melasi, njenim razblaživanjem i povećanjem odnosa ugljenika i azota dodavanjem komercijalne saharoze. Ako se uporede odnos ugljenika i azota u $\text{NH}_4\text{Cl-PS200}$ (134) i pretretiranoj melasi (19), uočava se da je u pretretiranoj melasi sedam puta niži. Osim toga pored pretretmana, u melasi razblaženoj do 200 g/L saharoze koncentracije gvožđa, natrijuma i hlorida ostaju previsoke u odnosu na koncentracije koje se koriste za pravljenje OPS-a.

4.3.2. Primena RSM-a za optimizaciju produkcije levana na podlozi sa melasom

Interakcije između tri ključna faktora za produkciju levana na podlozi sa melasom ispitivane su RSM metodom: koncentracije fosfata, koncentracije saharoze u melasi (% melase) i početne pH vrednosti podloge. Korišćena je modifikovana MS200 u kojoj je variran % melase i dodavana komercijalna saharoza, tako da je ukupna koncentracija saharoze iznosila 200 g/L. Sve fermentacije rađene su na 37 °C i bez mešanja.

Dizajn promenljivih u sistemu sa modifikovanom podlogom na bazi melase, zajedno sa predviđenim i dobijenim prinosom levana, prikazan je u tabeli 4.6. Koncentracija fosfata bila je od 3 do 9 g/L, procenat melase 50 – 75 %, dok je pH vrednost

varirana između 6,0 i 7,5. U zavisnosti od uslova fermentacije, uočava se znatna razlika u prinosu levana, sa maksimumom od 52,85 g/L levana (uzorak 10) i minimumom od 6,53 g/L levana (uzorak 11).

Tabela 4.6. Dizajn eksperimenta i rezultati Box-Behnken optimizacije u sistemu sa melasom (X_1 razblaženje melase (%), X_2 koncentracija fosfata (g/L) i X_3 inicijalna pH vrednost podloge)

Broj zorka	X_1 (g/L)	X_2 (g/L)	X_3	Dobijena koncentracija levana (g/L)	Predviđena koncentracija levana (g/L)
1	50,0	9,0	6,75	51,18	48,39
2	62,5	6,0	6,75	41,98	48,20
3	62,5	3,0	6,00	8,11	6,46
4	62,5	9,0	6,00	16,19	16,17
5	75,0	6,0	6,00	6,92	5,79
6	62,5	6,0	6,75	49,45	48,20
7	75,0	3,0	6,75	38,84	41,62
8	75,0	9,0	6,75	18,52	19,67
9	62,5	6,0	6,75	44,85	48,20
10	62,5	6,0	6,75	52,85	48,20
11	50,0	6,0	6,00	6,53	9,33
12	62,5	6,0	6,75	51,87	48,20
13	62,5	9,0	7,50	33,80	35,60
14	50,0	3,0	6,75	33,95	32,80
15	50,0	6,0	7,50	46,94	48,07
16	62,5	3,0	7,50	51,65	51,67
17	75,0	6,0	7,50	34,50	31,68

Predviđeni odgovor produkcije polisaharida dobijen je prema jednačini 4.3:

$$Y = -1967,88 + 9,93X_1 + 40,47X_2 + 452,07X_3 - 0,25X_1X_2 - 0,34X_1X_3 - 2,88X_2X_3 - 0,05X_1^2 - 0,49X_2^2 - 29,03X_3^2, \quad (4.3.)$$

gde je Y predviđeni prinos levana u g/L, X_1 razblaženje melase (%), X_2 koncentracija fosfata i X_3 inicijalna pH vrednost podloge.

Statistička signifikantnost jednačine 4.3. za površinu odgovora kvadratnog modela, potvrđena je F testom i Analizom varijanse i prikazana u tabeli 4.7. ANOVA kvadratnog regresionog modela pokazala je signifikantnost modela, sa F vrednošću od 26,98, P vrednošću manjom od 0,0001 i $R^2 = 0,9720$. Test nepodesnosti modela („lack of fit”) nije

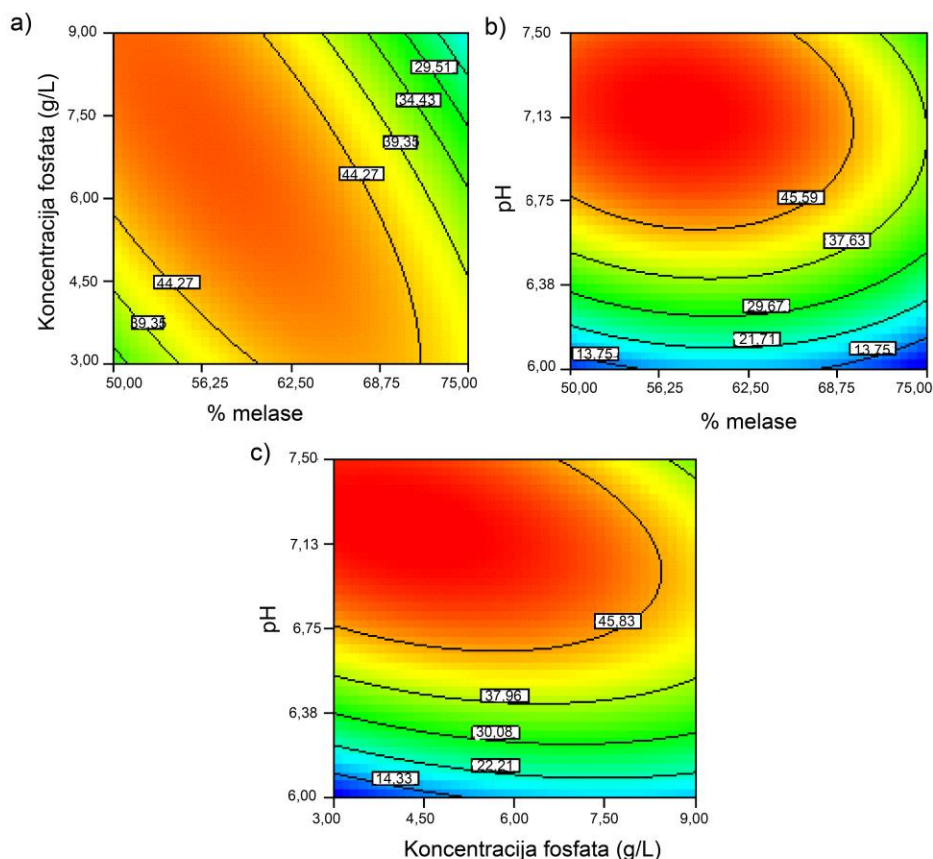
bio signifikantan u odnosu na grešku (P vrednost viša od 0,05). Predviđen R^2 od 0,8235 se umereno slaže sa prilagođenim R^2 od 0,9360. Signifikantni su ($P < 0,05$) dva linearna koeficijenta (% melase i pH), dva kvadratna koeficijenta (% melase² i pH²) i dva koeficijenta interakcije (% melase x fosfat i fosfat x pH).

Tabela 4.7. ANOVA za kvadratni model polinoma u sistemu sa melasom

Izvor	Suma kvadrata odstupanja (SS)	Broj stepeni slobode (dF)	Srednji kvadrat dstupanja (MS)	F-vrednost	P-vrednost
Model	4472,56	9	496,95	26,98	<0,0001
X ₁ - % melase	198,25	1	198,25	10,76	0,0135
X ₂ - fosfat	20,66	1	20,19	1,12	0,3247
X ₃ - pH	2084,48	1	2084,48	113,17	<0,0001
X ₁ X ₂	352,45	1	352,45	19,14	0,0033
X ₁ X ₃	41,18	1	41,18	2,24	0,1785
X ₂ X ₃	168,10	1	168,10	9,13	0,0194
X ₁ ²	279,41	1	279,41	15,17	0,0059
X ₂ ²	82,79	1	82,79	4,49	0,0717
X ₃ ²	1122,55	1	1122,55	60,95	0,0001
Ostatak	128,93	7	18,42		
„Lack of fit”	42,30	3	14,10	0,65	0,6227
Greška	86,63	4	21,66		
Ukupno	4601,21	16			

Konturni dijagrami površine odgovora, prikazani na slici 4.7, prikazuju vizuelnu interpretaciju interakcija dve promenljive, dok je treća bila fiksirana. Najviši prinos levana predviđa se u podlozi u kojoj je procenat saharoze u melasi između 53 i 59 %, a koncentracija fosfata od 6 g/L do 8 g/L (slika 4.7.a). Na slici 4.7.b uočava se da inicijalna pH ima značajniji uticaj nego % melase. Koncentracije levana više od 45 g/L dostižu se na pH vrednostima iznad 6,5 i % melase nižim od 68,75 %. Dijagram na slici 4.7.c pokazuje da se maksimalni prinos levana predviđa na pH vrednostima višim od 6,6, nezavisno od koncentracije fosfata.

Numeričkom funkcijom Design Expert softvera za optimizaciju predviđeno je da su optimalni uslovi za produkciju 53,6 g/L levana *B. licheniformis*: 62,6 % melase, 4,66 g/L fosfata i inicijalnog pH od 7,2. Na ovaj način dobijena je optimalna podloga sa melasom za produkciju levana *B. licheniformis*.



Slika 4.7. Konturni dijagrami uticaja: (a) % melase i koncentracije fosfata na pH 6,75, (b) % melase i inicijalne pH pri koncentraciji fosfata od 6 g/L i (c) inicijalnog pH i koncentracije fosfata pri procentu melase od 62,5 % na produkciju levana *B. licheniformis* u sistemu sa melasom

4.4. Ispitivanje strukturnih karakteristika izolovanog polisaharida

Za ispitivanje strukture polisaharida korišćene su sledeće tehnike: elementalna organska mikroanaliza, kompletna kisela hidroliza i identifikacija ugljenohidratnih komponenti papirnom hromatografijom, FTIR spektroskopija, NMR spektroskopija, određivanje optičke rotacije, viskoziteta i molekulske mase, perjodatna oksidacija i Smithova degradacija za ispitivanje tipa glikozidnih veza i metilaciona analiza za određivanje položaja glikozidnih veza upotrebom GC/MS.

4.4.1. Elementalna organska mikroanaliza, optička rotacija i hidroliza

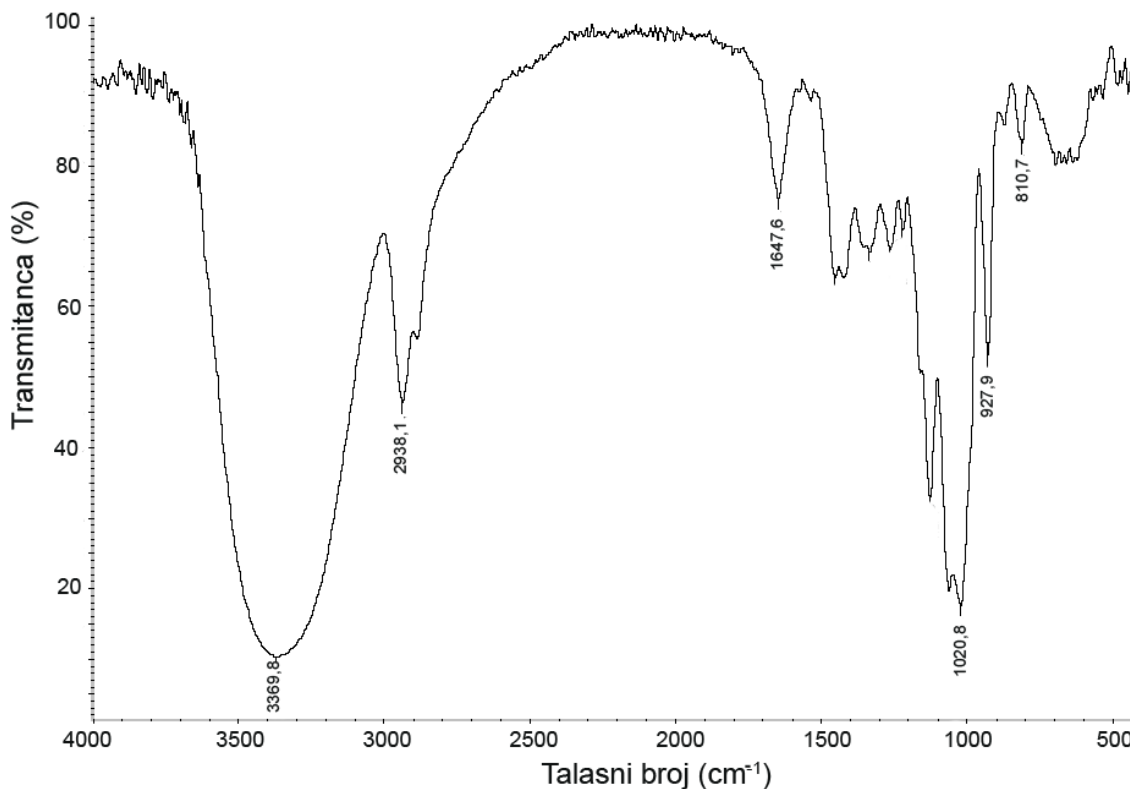
Elementalna analiza levana izolovanih nakon fermentacije na NH₄Cl-PS200 (LS200), NH₄Cl-PS400 (LS400) i optimalnoj podlozi sa melasom (LM), pokazala je da u dobijenim polimerima nema azota i sumpora. Sadržaj elemenata bio je u sledećim opsezima: ugljenik (40,65 % - 41,05 %), vodonik (6,26 % - 6,37 %) i kiseonik (52,58 % - 52,66 %). Dobijene vrednosti su bliske teorijskim vrednostima, koje se odnose na čist polisaharid. Rezultati pokazuju da je polisaharid prečišćen od proteina, aminokiselina i nukleinskih kiselina.

Utvrđeno je da je specifična rotacija LS200 levana $[\alpha]^{25} = -41,8^\circ$, LS400 levana $[\alpha]^{25} = -40,9^\circ$ i LM levana $[\alpha]^{25} = -40,4^\circ$. Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima gde je specifična optička rotacija levana $-44 \pm 4^\circ$ [112].

Prečišćen polisaharid je hidrolizovan pomoću trifluorosirćetne kiseline i na osnovu rezultata papirne hromatografije, poređenjem sa odgovarajućim standardima, utvrđeno je da totalni hidrolizat sadrži pretežno fruktozu, sa tragovima glukoze.

4.4.2. Analiza FTIR spektroskopijom

Na slici 4.8. prikazan je FTIR spektar izolovanog polisaharida, koji pokazuje apsorpcione trake karakteristične za neutralne polisaharide. Široka traka sa maksimumom na oko 3300 cm^{-1} potiče od OH valencionih vibracija, a pik manjeg intenziteta na 2938 cm^{-1} od C-H valencionih vibracija. Jasan pik na 1648 cm^{-1} ukazuje na prisustvo vode, koja je vodoničnim vezama vezana za levan. Apsorpcione trake između 1200 cm^{-1} i 1500 cm^{-1} potiču od C-H deformacionih vibracija. Izražena apsorpciona traka jakog intenziteta na 1021 cm^{-1} , koja potiče od C-O-C valencionih vibracija glikozidne veze, dominira među nekoliko oštih pikova na oko 1000 cm^{-1} . Prisustvo furanoidnih monomernih jedinica potvrđeno je apsorpcijama na 928 cm^{-1} i 811 cm^{-1} [134,129].



Slika 4.8. FTIR spektar izolovanog polisaharida

4.4.3. Viskozitet

Unutrašnji viskoziteti levana LS200, LS400 i LM su redom: 0,25 dL/g, 0,14 dL/g i 0,24 dL/g. Nizak unutrašnji viskozitet, u odnosu na druge mikrobne polisaharide visokih molekularskih masa, ukazuje na kompaktan i sferan oblik ispitivanog polisaharida u rastvoru, što je veoma značajno za potencijalnu primenu u industriji hrane i farmaciji [29,31]. Do sada su publikovani unutrašnji viskoziteti levana iz sledećih mikrobnih izvora: *Bacillus sp.* (0,14 dL/g), *Z. mobilis* (0,22 - 0,33 dL/g), *Pseudomonas* (0,17 dL/g), *S. salivarius* (0,13 – 0,16 dL/g) i *Microbacterium laevaniformans* (0,38 dL/g) [121].

4.4.4. Molekulska masa

Molekulske mase uzoraka levana su određivane pomoću gel hromatografije. Levani LS200 i LM, dobijeni fermentacijom u podlogama sa 200 g/L ukupne koncentracije

saharoze, relativno su visoke molekulske mase (opseg $> 10^6$ Da), za razliku od LS400 koji je u opsegu od 10^5 Da (tabela 4.8). Srednji stepen polimerizacije računat pomoću M_w i molekulske mase β -(2 \rightarrow 6)-vezane fruktoze (162,16) je u opsegu $3,5 - 4,5 \times 10^4$ Da za LS200 i LM, a $3,2 \times 10^3$ za LS400. Molekulske mase levana izolovanih iz različitih mikroorganizama su u opsegu od 10^4 do 10^{10} Da, a posebno se izdvaja levan iz *Kozakia baliensis* sa molekulskom masom od $2,466 \times 10^9$ Da [29]. Levani izolovani iz Gram pozitivnih bakterija, kao što su iz rodova *Bacillus* i *Paenibacillus* imaju molekulsku masu u opsegu od 10^5 do 10^7 [117,100]. Molekulska masa levana bakterije *B. licheniformis* 8-37-0-1 je $2,826 \times 10^4$ [83].

Tabela 4.8. Molekulske mase ispitivanih levana (\bar{M}_n – srednja brojna vrednost molekulske mase, \bar{M}_w – srednja masena vrednost molekulske mase, \bar{M}_z – srednja z-vrednost molekulske mase, PDI – indeks polidisperznosti)

Uzorak levana	\bar{M}_n	\bar{M}_w	\bar{M}_z	PDI
LS200	$6,79 \times 10^6$	$7,24 \times 10^6$	$7,96 \times 10^6$	1,07
LS400	$8,25 \times 10^4$	$5,13 \times 10^5$	$3,45 \times 10^6$	6,22
LM	$3,75 \times 10^6$	$5,82 \times 10^6$	$7,42 \times 10^6$	1,55

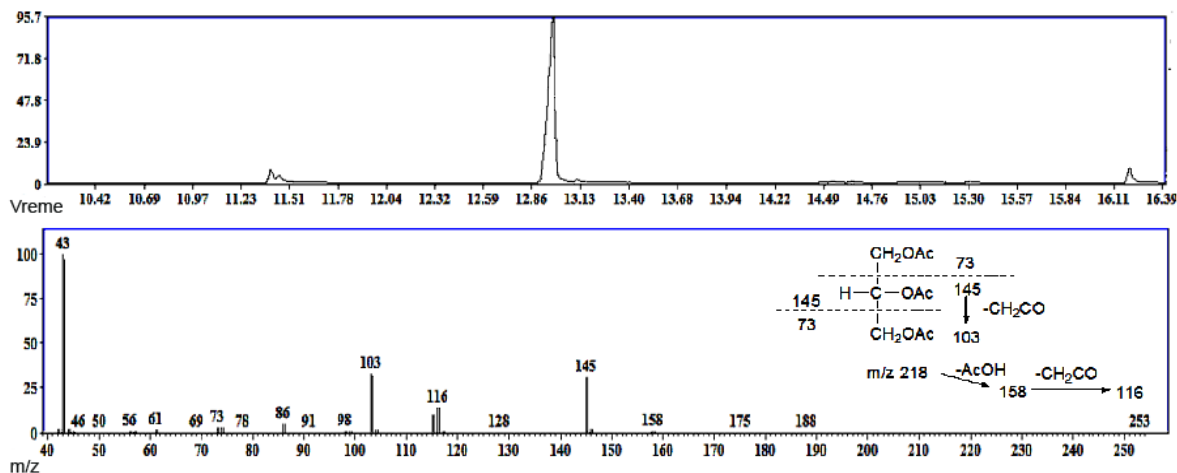
Poznato je da uslovi fermentacije mogu da utiču na molekulsku masu levana. Na primer, levani visokih molekulskih masa se dobijaju u prisustvu 40 % etanola, 20 % polietilen-glikola, acetonitrila ili 0,08 M rastvora fosfata, dok se niskomolekulski levani dobijaju u podlozi sa 0,8 M rastvorom fosfata [89]. Osim toga, pokazano je da i pH podloge za fermentaciju utiče na molekulsku masu levana iz *Halomonas* [122]. Razlike u molekulskim masama levana LS200, LS400 i LM ukazuju na mogućnost kontrolisanja ovog parametra pomoću koncentracije saharoze u podlozi. Iako se ne može isključiti ni pretpostavka o postojanju dva enzima sa različitim afinitetima prema supstratu, moguće objašnjenje dobijenih razlika u molekulskim masama je bimodularna distribucija ove veličine u levanu koga produkuje *B. licheniformis* NS032. Fenomen simultane produkcije visokomolekulskih i niskomolekulskih levana pokazan je kod nekih bakterija, kao što su *B. subtilis* natto ($2,3 \times 10^6$ i $7,2 \times 10^3$ Da) [107,123] i *B. licheniformis* ($6,12 \times 10^5$ i $1,1 \times 10^4$) [124]. Dualna distribucija molekulskih masa se objašnjava postojanjem dva mehanizma

elongacije biosinteze levana: procesivnog i neprocesivnog. Takođe, pokazano je da na distribuciju molekulskih masa *B. subtilis* utiče promena koncentracije enzima, nezavisno od koncentracije saharoze [125].

4.4.5. Analiza polisaharida perjodatnom oksidacijom i Smith-ovom degradacijom

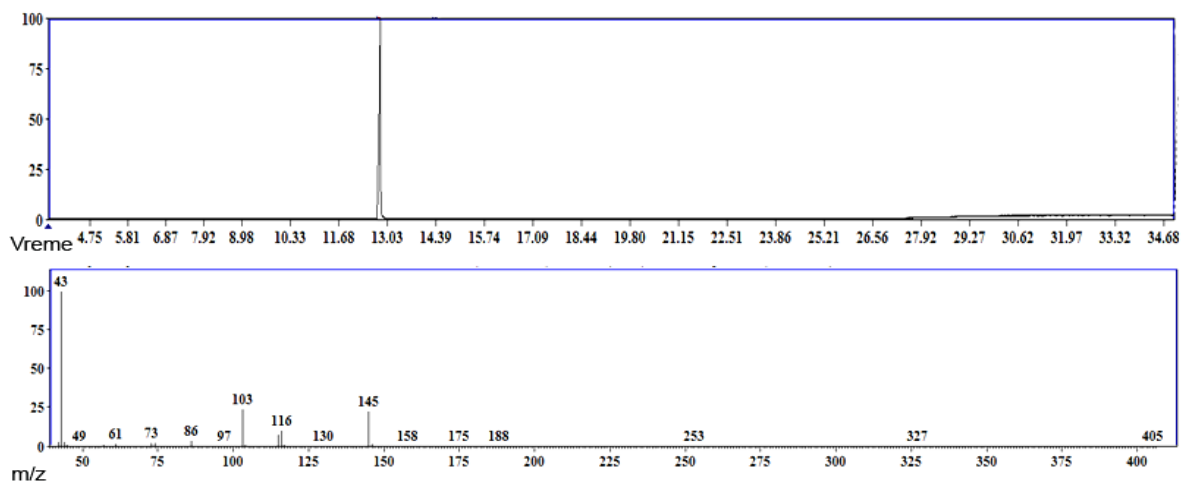
Dalje ispitivanje uzorka LS200 rađeno je perjodatnom oksidacijom [135] praćenom Smith-ovom degradacijom. U zavisnosti od utrošenih molova perjodata oksidacija polisaharida je postala konstantna nakon 18 h, pri čemu se po jednoj heksoznoj jedinici utrošilo 0,89 mola perjodata i nastalo 0,02 mola mravlje kiseline. Ovi rezultati ukazuju da se radi o polimeru sa (2,6)-vezanim fruktofuranoznim monomernim jedinicama u molekulu sa oko 2 % terminalnih neredukcionih heksopiranoznih grupa. Dobijeni rezultati su konzistentni sa rezultatima perjodatne oksidacije levana dobijenih iz drugih mikrobnih izvora i indiciraju da se 85 % fruktoznih jedinica oksidovalo, što pokazuje da su ove jedinice vezane preko položaja C2 i C1 ili/i C6 položaja [136]. Potrošnja perjodata ukazuje da ispitivani fruktan ne sadrži (2,3) ili (2,4) veze.

Smith-ovom degradacijom [137], odnosno redukcijom oksopolisaharida natrijum-borhidridom i hidrolizom, dobijena je smeša degradacionih proizvoda u kojoj je, hromatografijom na tankom sloju, identifikovan samo glicerol. Prisustvo ovog alkohola potvrđeno je i gasnom hromatografijom i gasno-masenom analizom nagrađenih alditol acetata [137]. Na slici 4.9. prikazani su hromatogrami produkata dobijenih nakon Smith-ove degradacije i esterifikacije. Jedinjenja su identifikovana na osnovu njihovih retencionih vremena i dijagostičkih fragmenata na masenim spektrima poređenjem sa standardom acetilovanog glicerola (glicerol-triacetata), što je prikazano na slici 4.10.



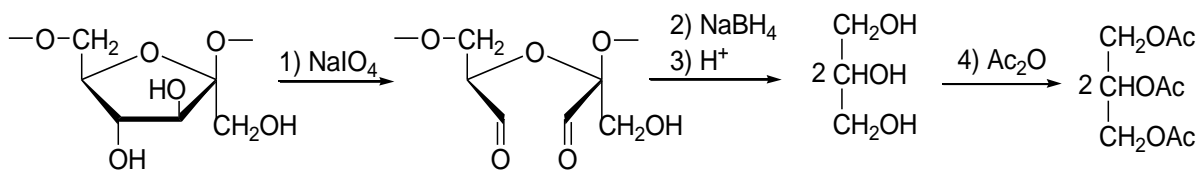
Slika 4.9. GC/MS hromatogram L200 nakon perjodatne oksidacije i Smith-ove degradacije

Na gasnom hromatogramu L200 dominira pik na retencionom vremenu od 12,98 min, a na hromatogramu potpuno esterifikovanog glicerola na 12,81 min. Na masenim spektrima uočavaju se fragmenti (m/z): 43, 103, 116 i 145, koji su, poređenjem sa NIST bazom podataka [138], karakteristični obrasci fragmentacije glicerol-triacetata.



Slika 4.10. GC/MS hromatogram glicerol-triacetata

Na slici 4.11. je prikazana reakciona shema perjodatne oksidacije, praćene Smith-ovom degradacijom monosaharidne jedinice u glavnom nizu levana i acetilovanjem dobijenog proizvoda. Rezultat ovih reakcija je jedna komponenta, glicerol-triacetat uz degradaciju fruktoze.



Slika 4.11. Reakciona shema perjodatne oksidacije, Smith-ove degradacije i acetilovanja monosaharidne jedinice u glavnom nizu levana (2,6-O-supstituisane fruktofuranoze)

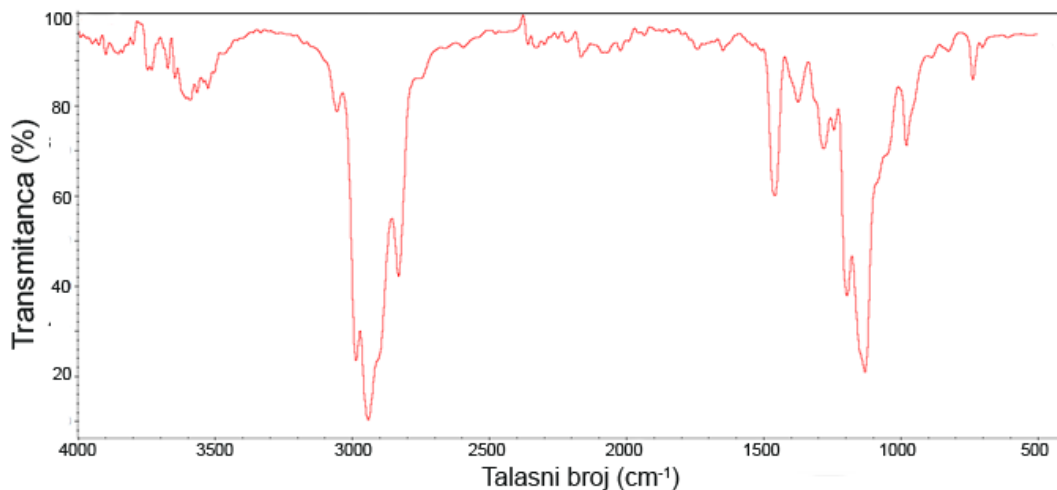
Rezultati reduktivne degradacije oksidovanog polisaharida ukazuju da su u glavnom lancu ispitivanog uzorka prisutne (2,6)-glikozidne veze, kojima su međusobno povezane fruktofuranozne jedinice. Glicerol kao proizvod perjodatne oksidacije i Smith-ove degradacije može takođe da se dobije iz neredukcione terminalne heksopiranoze, kao i iz (2,6)-vezanih fruktofuranoznih jedinica kod kojih se javlja grananje preko položaja C1. Ako se uzme u obzir da Smith-ovom degradacijom (2,3) ili (2,4) glikozidnih veza ne nastaje glicerol, može se zaključiti da ispitivani polisaharid ne sadrži taj tip veza.

4.4.6. Metilaciona analiza polisaharida

Dalje ispitivanje strukture izolovanih uzoraka levana (L200, L400 i LM) vršeno je metilovanjem, a potom reduktivnim raskidanjem permetilovanih levana i acetilovanjem dobijenih proizvoda. Metilovanje je rađeno metodom po Cuciano-u [90].

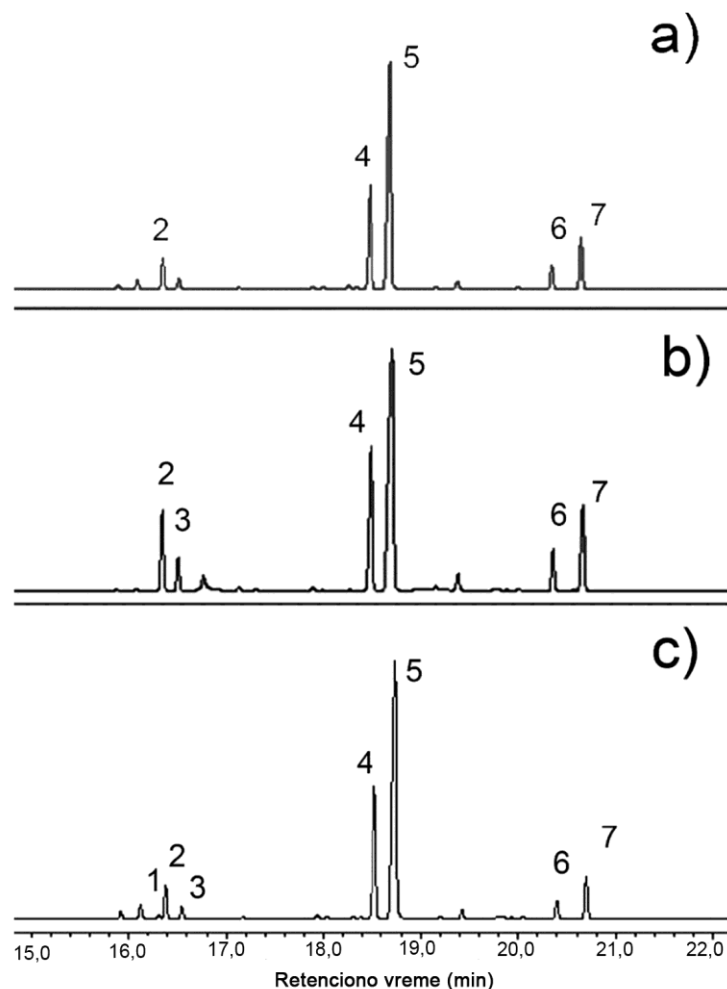
Izostanak apsorpcione trake u FTIR spektru na $3400 - 3600 \text{ cm}^{-1}$ (slika 4.12), koja je karakteristična za valencione vibracije hidroksilnih grupa levana (poglavlje 4.4.3), bio je indikacija da su levani u potpunosti metilovani.

Permetilovani levani su zatim podvrgnuti reduktivnom raskidanju [91] i acetilovanju [92] da bi se istovremeno utvrdili položaji glikozidnih veza i veličina prstena svakog monosaharidnog ostatka. Dobijena smeša anhidroalditol derivata ispitivana je gasnom i gasno-masenom analizom [94]. Na slici 4.13. prikazani su GC/MS hromatogrami dobijenih parcijalno O-metilovanih anhidroalditol acetata, a u tabeli 4.9. detaljna identifikacija pikova sa karakterističnim fragmentnim jonima iz masenih spektara.



Slika 4.12. FTIR spektar permetilovanog levana

Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je se levan sastoji iz tri vrste D-fruktofuranoznih ostataka i da od svakog nastaju dva epimerna anhidroalditola. Od monosaharidnih (fruktoznih) jedinica u glavnom nizu, koji su povezani (2→6) glikozidnim vezama nastaju procentualno najviše zastupljeni pikovi: 6-*O*-acetyl-2,5-anhidro-1,3,4-tri-*O*-metil-D-manitol (pik 4) i 6-*O*-acetyl-2,5-anhidro-1,3,4-tri-*O*-metil-D-glucitol (pik 5). 2,5-anhidro-1,3,4,6-tetra-*O*-metil-D-manitol (pik 2) i 2,5-anhidro-1,3,4,6-tetra-*O*-metil-D-glucitol (pik 3) potiču od terminalnih (neredukujućih) fruktoznih jedinica. Derivati fruktoznih jedinica prisutnih na mestima grananja polisaharida imaju najveća retencionna vremena: 1,6-di-*O*-acetyl-2,5-anhidro-3,4-di-*O*-metil-D-manitol (pik 6) i 1,6-di-*O*-acetyl-2,5-anhidro-3,4-di-*O*-metil-D-glucitol (pik 7). U hromatogramu LS400 levana uočava se i dodatni pik označen brojem jedan, koji potiče od 1,5-anhidro-2,3,4,6-tetra-*O*-metil-D-glucitola. Ovaj anhidroalditol je nastao iz terminalne α -D-glukoze na neredukcionom kraju lanca [114], koja ostaje tokom biosinteze levana, jer je deo inicijalnog molekula saharoze (videti poglavlja 2.3.3. i 2.3.4.). Molekulska masa LS400 levana, izračunata na osnovu sadržaja glukoze (0,87 %), bila je 2×10^4 Da. Može se pretpostaviti da je razlog zbog kog glukoza nije mogla da se detektuje u hromatogramima LS200 i LM levana, njihova velika molekulska masa [113]



Slika 4.13. Gasni hromatogrami parcijalno metilovanih anhidroalditol acetata (a) LM, (b) LS200 i (c) LS400. Označeni pikovi potiču od: 1- terminalne glukoze, 2 i 3 – terminalnih fruktoza, 4 i 5 – fruktoza u glavnom nizu, 6 i 7 – fruktoza na mestima grananja.

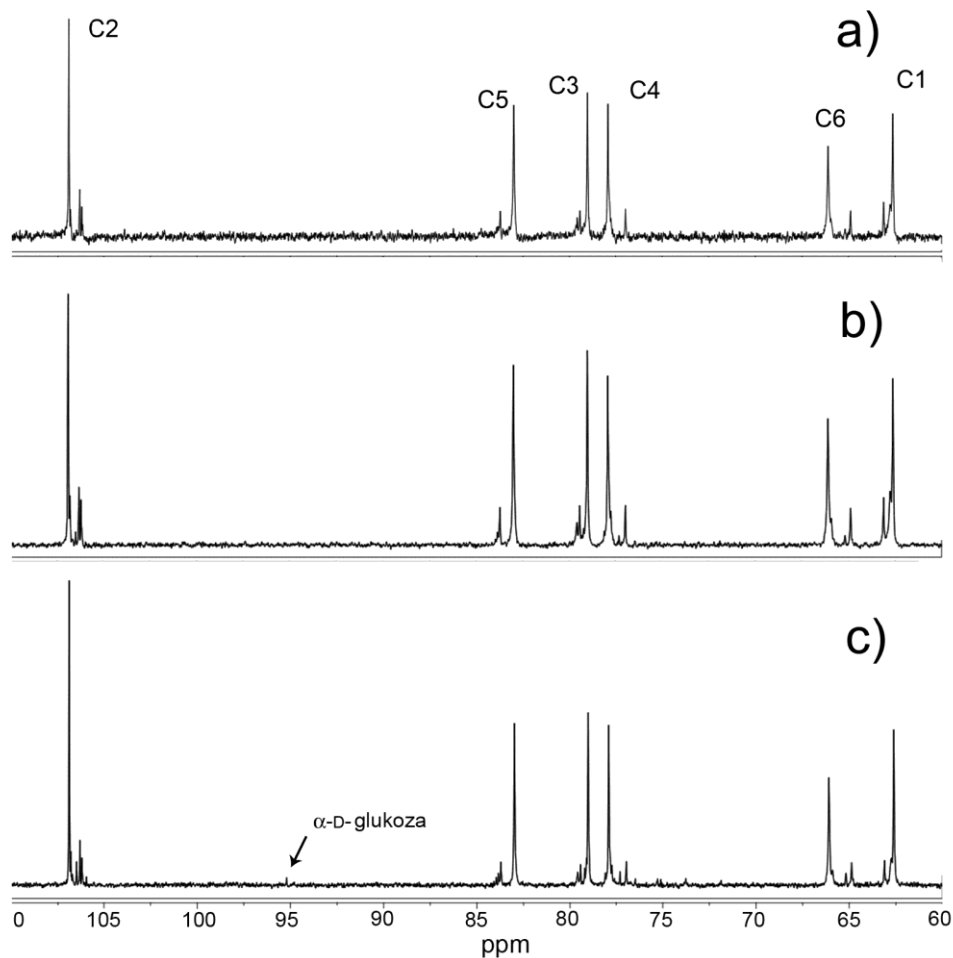
Stepeni grananja uzoraka levana LS200, LS400 i LM izračunati su na osnovu sadržaja (%) 3,4-di-*O*-metil-derivata i iznosili su redom: $11,04 \pm 0,57$ %, $11,99 \pm 0,63$ % i $12,68 \pm 0,71$ %. Može se zaključiti da nema značajne razlike u stepenu grananja među ispitivanim levanima. Generalno, sadržaji dimetilovanih derivata koji potvrđuju grananje i tetra-*O*-metil derivata koji potiču od neredukcionih jedinica u molekulu polisaharida bi trebalo da budu jednaki [115,116]. Stepeni grananja levana bakterije *B. licheniformis* NS032 su slični već publikovanim podacima od strane drugih istraživača: 14,28 % za *B. licheniformis* 8-37-0-1 [83], 12 % za *P. polymyxa* NRRL B-18475 [117] i 10,5 % za *B. subtilis* [116]. Iako je autor Lindberg [115] utvrdio širok opseg stepena grananja za različite

levane (5-22 %), u većini studija se navodi uži opseg (9-15 %), što može biti jasna indikacija za strukturnu sličnost bakterijskih levana [116]. Međutim, postoje i levani sa izrazito niskim stepenom grananja (manjim od 5 %), kao što su levani bakterija *A. xylinum* [118], bakterija koje proizvode sirćetnu kiselinu [119] i *Lactobacillus reuteri* 121 [120].

Tabela 4.9. Obrasci fragmentacije parcijalno metilovanih anhidroalditol acetata dobijenih reduktivnim raskidanjem permetilovanog levana (*brojevi u zagradama ukazuju na zastupljenost)

Pik	Parcijalno <i>O</i> -metilovani anhidroalditol acetat	Retenciono vreme	Karakteristični fragmentacioni joni (m/z)	Monosaharidna jedinica i vrsta veze
1	1,5-anhidro-2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -metil-D-glucitol	16,307	101 (100)*, 71 (73), 45 (44), 75 (44), 88 (28)	terminalna glukopiranoza
2	2,5-anhidro-1,3,4,6-tetra- <i>O</i> -metil-D-manitol	16,380	45 (100), 101 (75), 71 (58), 143 (53), 89 (39), 99 (34), 115 (32)	terminalna fruktofuranosa
3	2,5-anhidro-1,3,4,6-tetra- <i>O</i> -metil-D-glucitol	16,545	101 (100), 45 (78), 71 (40), 143 (37), 89 (30)	terminalna fruktofuranosa
4	6- <i>O</i> -acetil-2,5-anhidro-1,3,4-tri- <i>O</i> -metil-D-manitol	18,524	43 (100), 71 (95), 101 (79), 45 (76), 111 (66), 143 (56), 115 (41), 87 (40)	(2→6)-fruktofuranosa
5	6- <i>O</i> -acetil-2,5-anhidro-1,3,4-tri- <i>O</i> -metil-D-glucitol	18,738	101 (100), 43 (81), 71 (74), 117 (72), 45 (66), 111 (62), 87 (45), 143 (37)	(2→6)-fruktofuranosa
6	1,6-di- <i>O</i> -acetil-2,5-anhidro-3,4-di- <i>O</i> -metil-D-manitol	20,399	43 (100), 87 (62), 71 (45), 111 (31), 117 (29), 101 (23)	(1,2→6)-fruktofuranosa
7	1,6-di- <i>O</i> -acetil-2,5-anhidro-3,4-di- <i>O</i> -metil-D-glucitol	20,699	43 (100), 87 (56), 117 (46), 71 (41), 101 (29), 111 (19)	(1,2→6)-fruktofuranosa

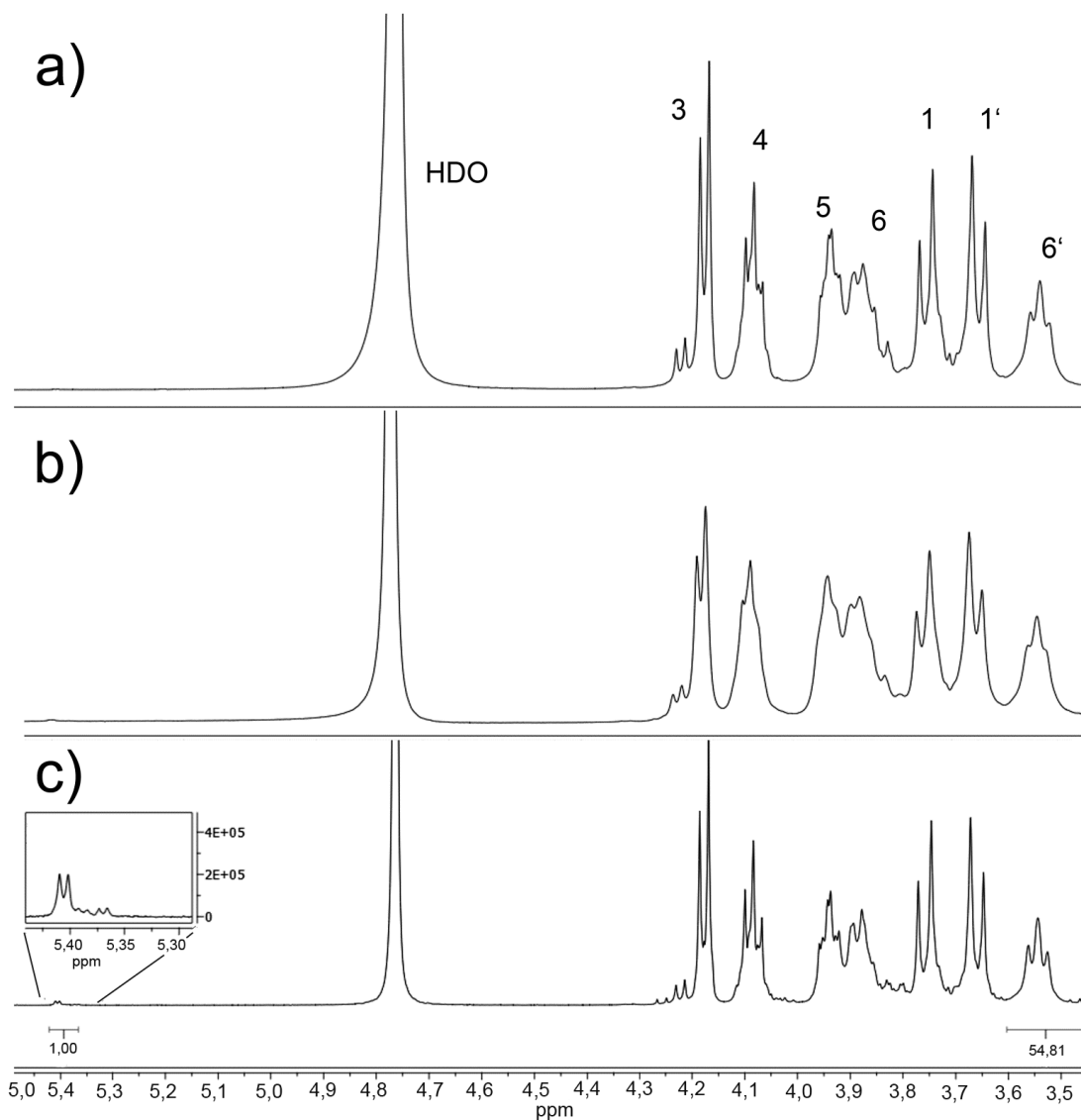
Na osnovu metilacione analize može se zaključiti da glavnu strukturnu osobenost ispitivanog glikana čini osnovni niz, koji se sastoji iz fruktofuranoznih jedinica međusobno povezanih (2,6)-glikozidnim vezama, sa glukoznom heksapiranoznom jedinicom na neredukcionom kraju niza. Fruktofuranoze se nalaze kao bočne pojedinačne grupe vezane za osnovni niz (2,1)-glikozidnim vezama (slika 4.14.a), ili predstavljaju deo račvastih bočnih jedinica za koje su (2,6)-vezani polimerni fruktofuranozil ostaci (slika 4.14.b).



Slika 4.15. ^{13}C NMR spektri (a) LM, (b) LS200 i (c) LS400

4.4.7.2. ^1H NMR spektroskopija

U ^1H NMR spektrima levana LM i LS200 (slike 4.16.a i 4.16.b) uočavaju se signali u regionu od 3,5 do 4,5 ppm koji su karakteristični za protone ugljenohidratnog prstena, dok je u spektru LS400 (slika 4.16.c) prisutan i dodatni signal na 5,41 ppm, koji potiče od anomernog protona glukoze.



Slika 4.16. ^1H NMR spektri (a) LM, (b) LS200 i (c) LS400

Kao što je već pomenuto, tokom biosinteze u molekul levana se ugrađuje i jedan glukozni ostatak, koja potiče od inicijalne saharoze. Odustvo H1 signala koji odgovara anomernom protonu terminalne α -D-glukopiranoze u spektrima LM i LS200 ukazuje na veliku molekulsku masu ovih polimera.

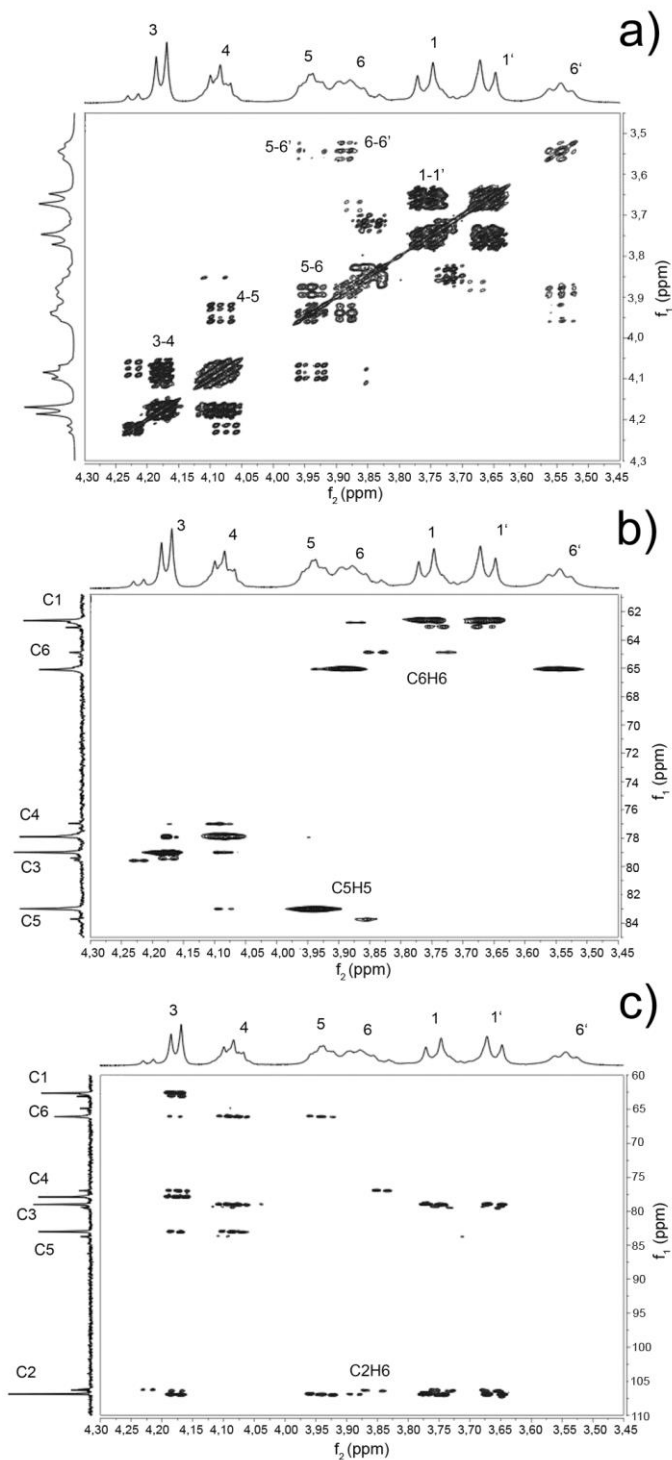
4.4.7.3. Dvodimenzionalna NMR spektroskopija

Primenom dvodimenzionalne NMR spektroskopije (COSY, HSQC i HMBC) omogućena je asignacija signala koji se preklapaju u jednodimenzionalnim NMR spektrima. Dvodimenzionalnom NMR spektroskopijom dobijeni su identični spektri za LM i LS200 levane, dok su se spektri LS400 razlikovali, kao što je i bilo očekivano nakon ^{13}C i ^1H NMR analize. U daljem tekstu su prikazani rezultati dobijeni ispitivanjem: LM, kao predstavnika visokomolekulskog levana i LS400 kao predstavnika niskomolekulskog levana.

COSY spektar LM levana (slike 4.17.a) prikazuje sledeće signale: H3/H4 (4,18/4,08), H4/H5 (4,08/3,94), H5/H6 (3,94/3,88), H5/H6' (3,94/3,54), H6/H6' (3,88/3,54) i H1/H1' (3,76/3,66). Velika razlika u hemijskim pomeranjima između 6 i 6' protona kod fruktanskih polisaharida, kao što su levan i inulin, može se objasniti efektom zaklanjanja elektronskog oblaka atoma kiseonika [113]. Ovaj efekat takođe uzrokuje preklapanja između H5 i H6 signala [29,118].

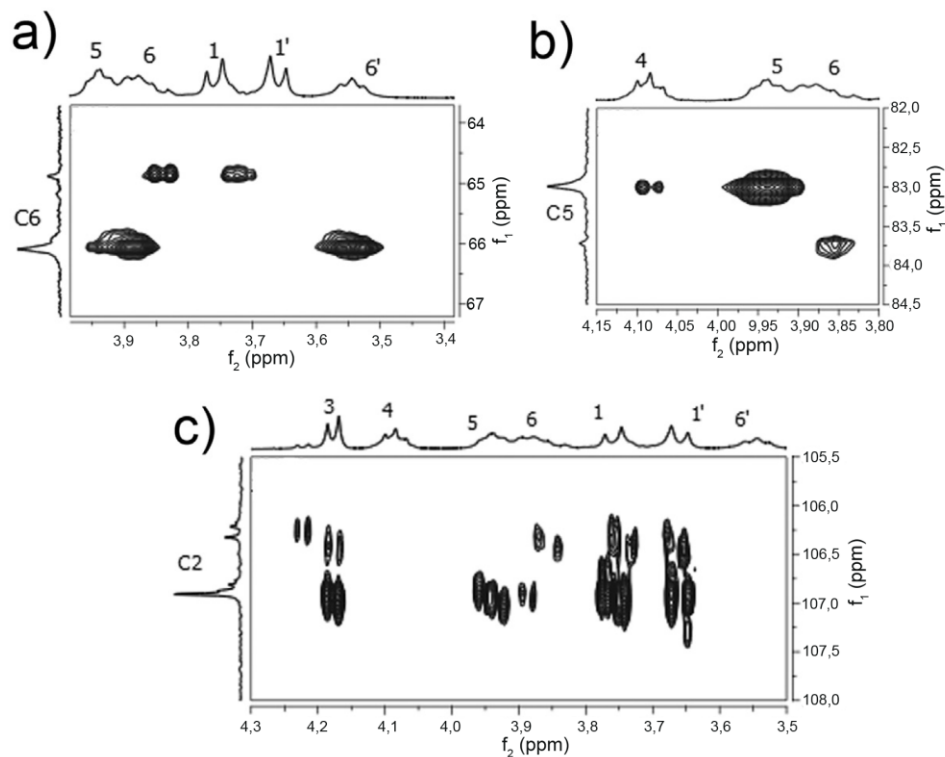
Zahvaljujući direktnoj C-H korelaciji, HSQC spektar (slike 4.17.b, 4.18.a) je omogućio detekciju protonovanih C atoma i nekoliko preklopljenih protonskih signala, koji se ne bi mogli utvrditi na drugi način, što se posebno odnosi na fragmente B i C (tabela 4.10). Kvaternerni anomerni karakter C2 potvrđuje odsustvo njegove korelacije sa protonima [113]. Na slici 4.17.b se uočavaju dva unakrsna pika H5/C5 (3,94/83,00 i 3,85/83,73), koja indiciraju prisustvo dva lanca povezana β -(2 \rightarrow 6) i β -(2 \rightarrow 1) vezama, što je karakteristično za levan i može da se koristi za spektroskopsko praćenje njegove hidrolize [127].

Za analizu polisaharida je od posebne važnosti identifikacija atoma povezanih glikozidnom vezom, što je omogućeno snimanjem i interpretacijom HMBC spektra, jer prikazuje korelacije između H i C atoma udaljenih za dve ili tri veze (slika 4.17.c). U anomernom regionu ovog spektra levana LM, C2/H6 korelacija na 106,91/3,88 ppm je potvrdila prisustvo β -(2 \rightarrow 6) veze između D-fruktofuranoznih jedinica u glavnom nizu. Mada postoje jake H1, H1'/C2 korelacije unutar iste D-fruktorfuranozne jedinice i veliko preklapanje, unakrsni pikovi na 3,74, 3,66/106,33 ppm (fragment B) mogu biti dokaz za β -(2 \rightarrow 1) veze između susednih D-fruktofuranoznih jedinica na mestima grananja (-1, 2-, 2-). Takođe, u određenim fragmentima uočavaju se korelacije C2/H3 i C2/H5 unutar iste D-fruktofuranozne jedinice (slika 4.18c). Za razliku od levana izolovanog iz *P. bovis* sp. nov BD3526 [48], u HMBC spektrima



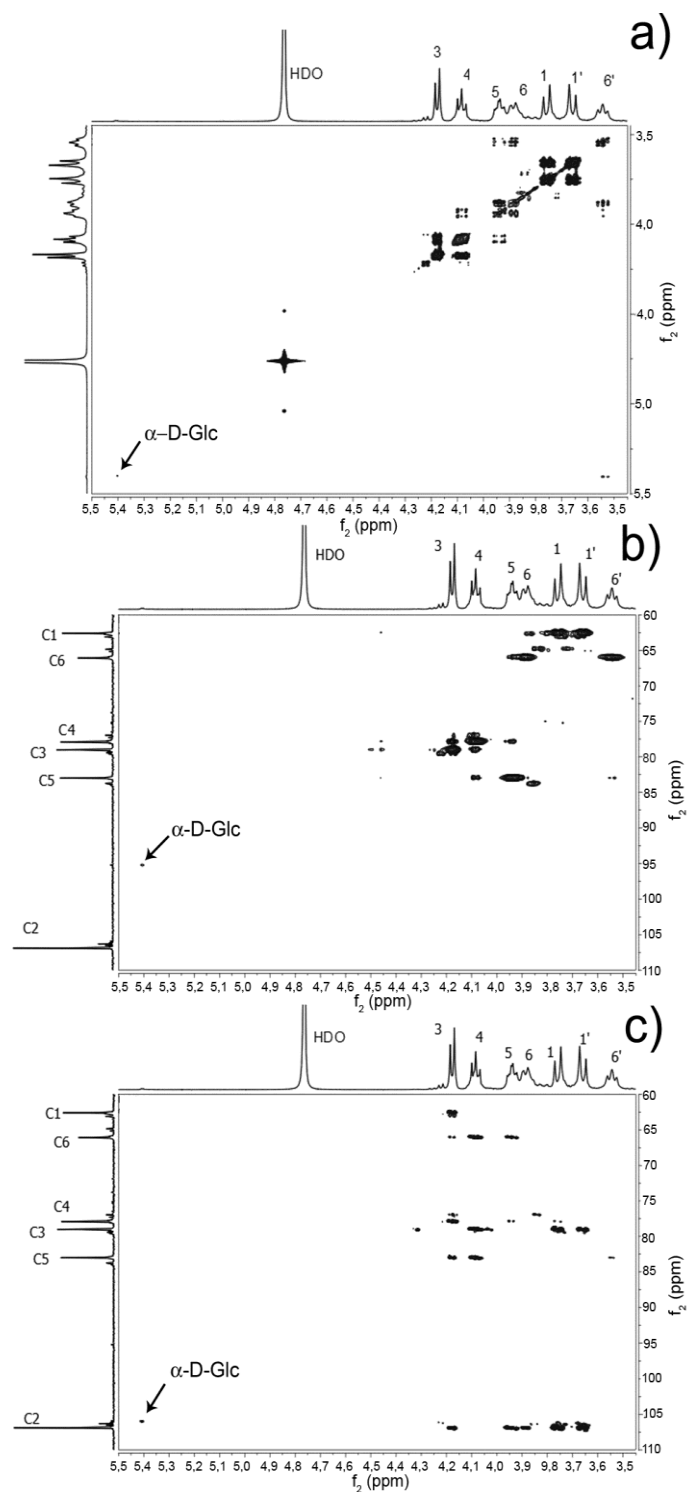
Slika 4.17. Dvodimenzionalni NMR spektri LM (a) COSY, (b) HSQC i (c) HMBC

nekih levana nisu prisutni unakrsni pikovi koji odgovaraju β -(2 \rightarrow 6) vezama (između C2 jedne D-fruktofuranozne jedinice i H6 naredne jedinice u lancu) [28].



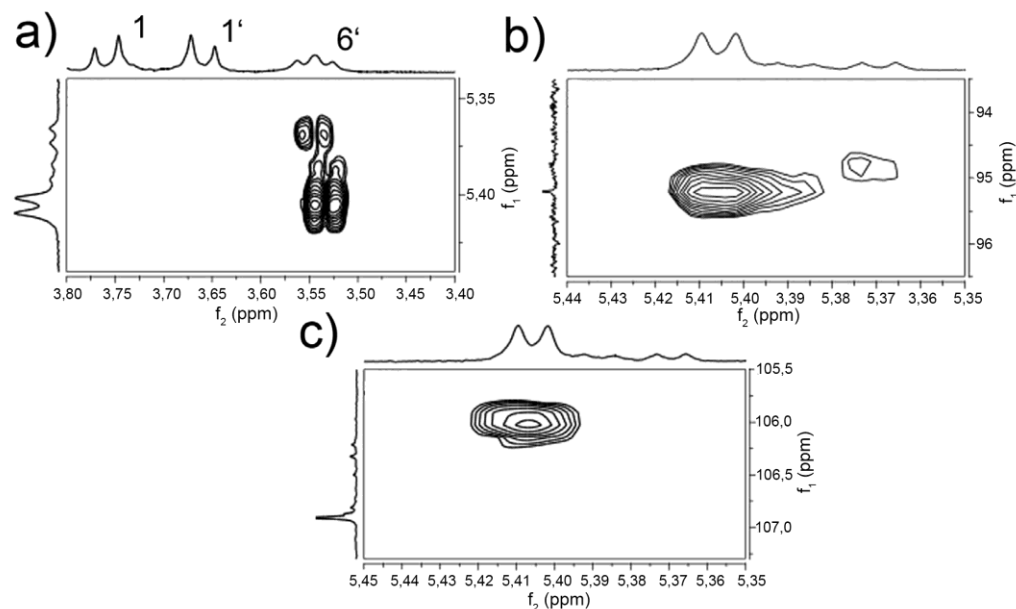
Slika 4.17. Uvećani prikaz dela 2D NMR spektra LM levana (a) C5 regiona HSQC (b) C5 regiona HSQC i (c) C2 regiona HMBC

Na slici 4.19.a-c prikazani su dvodimenzionalni NMR spektri LS400 levana (COSY, HSQC i HMBC), u kojim se može videti isti obrazac pikova kao u odgovarajućim spektrima LM levana. Jedina razlika potiče od α -D-glukoze, uočene prethodno i pomoću ^{13}C i ^1H NMR-a.



Slika 4.19. Dvodimenzionalni NMR spektri LS400 (a) COSY, (b) HSQC i (c) HMBC

Na COSY spektru (slika 4.19.a) označen je pik koji potiče od H1 i H2 korelacije na 5,41 i 3,54 ppm unutar α -D-glukoze, a uvećanje ove korelacije prikazano je na slici 4.20.a. Takođe, prisustvo glukoze potvrđuje i H1/C1 korelacija na 5,41/95,23 ppm naznačena na HSQC spektrima sa slika 4.22.b i 4.23.b. Od udaljenih korelacija uočava se jedna između H1 glukoze (5,41 ppm) i C2 susedne fruktoze (106,0 ppm) na HMBC spektru (slike 4.19.c i 4.20.c). Dobijena ukrštanja pikova su u skladu sa prethodno pokazanim podacima za saharozu [113], 6-kestožu [128] i niskomolekulske fruktane [129,130].



Slika 4.20. Uveličani prikaz anomernih regiona 2D NMR spektra LS400 levana (a) COSY (b) HSQC i (c) HMBC

Na osnovu površine pikova anomernog H regiona glukoze i H6' fruktoze, izračunata je molekulska masa LS400 levana, koja je iznosila $8,89 \times 10^3$ Da.

U tabeli 4.10. prikazana su hemijska pomeranja u ^1H i ^{13}C NMR spektrima levana bakterije *B. licheniformis* NS 032.

Tabela 4.10. Hemijska pomeranja (ppm) u ^1H i ^{13}C NMR spektrima levana bakterije *B. licheniformis* NS 032

		1, 1'	2	3	4	5	6, 6'
A,	H	3,76 3,66		4,18	4,08	3,94	3,88 3,54
β -(2 \rightarrow 6)-fruktofuranosa	C	62,62	106,91	79,00	77,91	83,00	66,09
B,	H	3,74 6,66		4,18	4,08	3,94	3,88 3,54
β -(1,2 \rightarrow 6)-fruktofuranosa	C	63,11	106,33 ^a	79,71 ^a	77,83 ^a	83,00	65,91 ^a
C,	H	3,87 3,68		4,22	4,09	3,85	3,84 3,72
terminalna, fruktofuranosa	C	62,76	106,21 ^a	79,56 ^a	76,96 ^a	83,73	64,88 ^a
D,	H	5,41	3,54	- ^b	-	-	
terminalna, glukopiranoza	C	95,23	-	-	-	-	

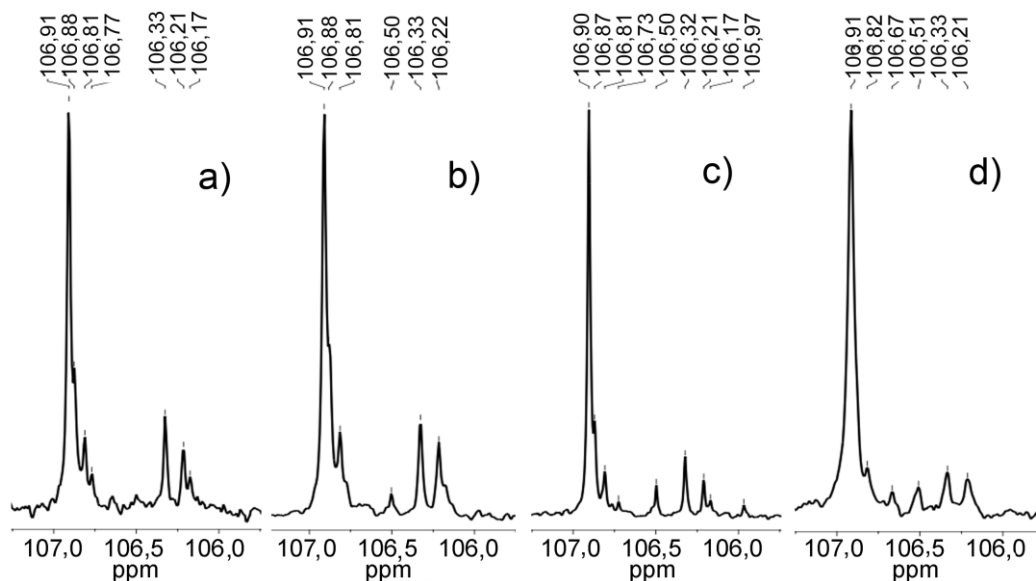
^a Izmenljivi između B/C fragmenata

^b Preklapljeni signali

4.4.7.4. Ispitivanje grananja levana pomoću NMR spektroskopije

Za ispitivanje strukturnih razlika između linearnih i razgranatih levana izolovanih iz biljaka ili dobijenih fermentacijom bakterija, često se koristi ^{13}C NMR [126,131]. Glavne karakteristike spektara linearnih levana su intenzivni i oštri signali, dok su kod razgranatih prisutni C3 signali manjih intenziteta na višim hemijskim pomeranjima u blizini glavnog C3 signala, ili se pojavljuju manji pikovi na nižim hemijskim pomeranjima u okolini C6 [132,133]. U ^{13}C NMR spektrima sva tri ispitivana levana *B. licheniformis* (LM, LS200 i LS400) se uočavaju pomenuti signali manjih intenziteta u okolini C3 i C6 atoma (slike 4.19a-c, poglavlje 4.8.8.1), što je, pored metilacione analize, još jedna potvrda razgranatosti ispitivanih molekula.

Razlike u grananju se mogu uočiti i na osnovu izgleda pikova slabijeg intenziteta pomerenih ka nižim hemijskim pomeranjima u okolini anomernog C2 atoma (slika 4.21).



Slika 4.21. Prošireni anomerni region ^{13}C NMR spektara levana: (a) LM, (b) LS200, (c) LS400 i (d) levana iz *E. herbicola*

Na slici su prikazani izdvojeni anomerni region ^{13}C NMR spektara LM, LS200 i LS400, kao i levana dobijenog pomoću *E. herbicola* koji je korišćen za poređenje. Evidentno je da se u svim ispitivanim levanima javljaju tri anomerna signala: glavni na

106,91 ppm i dva sporedna na 106,33 ppm i 106,21 ppm. Uočavaju se i dodatni pikovi slabijeg intenziteta: 106,81 ppm i 106,5 ppm kod svih ispitivanih levana. Pik na 105,97 ppm vidljiv je samo kod LS400 levana, a pik na 106,66 ppm kod levana iz *E. herbicola* i LM. Dva pika (106,77 i 106,17 ppm) prisutna su samo kod LM i LS400 levana. Ovakav raspored sporednih pikova ukazuje da nema signifikantnih razlika u obrascu i stepenu grananja između LS200, LS400 i LM levana, što je takođe konzistentno sa rezultatima metilacione analize.

4.5. Optimizacija uslova za kopolimerizaciju levana i polistirena

U ovom delu rada ispitivan je uticaj različitih parametara na reakciju kalemljenja između levana i stirena, u cilju optimizacije eksperimentalnih uslova: temperature, atmosfere, reakcionog vremena, vrste aminoaktivatora i odnosa KPS/AK, kojim bi se postigao maksimalni procenat kalemljenja. U sintezama kopolimera korišćen je levan dobijen fermentacijom bakterije *B. licheniformis* na NH_4Cl -PS200 podlozi.

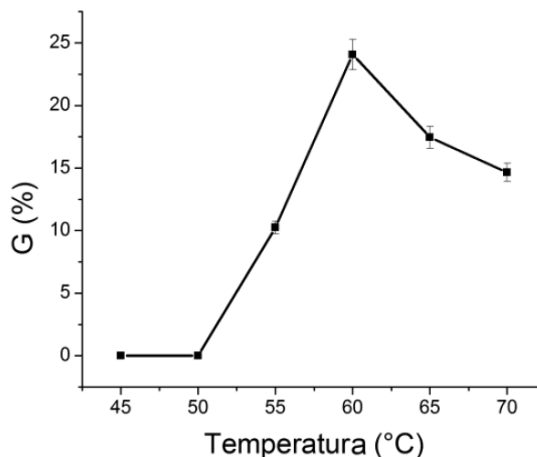
4.5.1. Uticaj temperature i atmosfere

Uticaj temperature na kopolimerizaciju PS-a i levana u atmosferi kiseonika prikazan je na slici 4.22. Reakcione temperature su bile od 45 °C do 70 °C u trajanju od 180 min, sa kalijum-persulfatom kao inicijatorom i bez prisustva amina. Generalno, porast temperature dovodi do povećanja G (%), međutim na temperaturama iznad 60 °C kalemljenje je manje efikasno, što bi moglo da bude rezultat prevelike konzumacije monomera za homopolimerizaciju PS-a i/ili drugih sporednih reakcija kao što je otkidanje lanaca PS od granula levana [140].

U reakcijama na 45 °C i 50 °C, G (%) ne dolazi do reakcije kalemljenja, već se na pomenutim temperaturama odigrava homopolimerizacija stirena, a krajnja reakcija između makroradikala polistirena i levana izostaje. Najviši G (%) (24,1 %) postignut je na 60 °C, ali je bio ispod željenog nivoa u odnosu na slične sinteze. Porastom temperature raste mobilnost molekula i ubrzava se difuzija monomera unutar polimera. Takođe više

temperature dovode do bržeg raspada termalnog inicijatora KPS-a, što vodi većoj količini radikala u sistemu za kraće vreme [64,140].

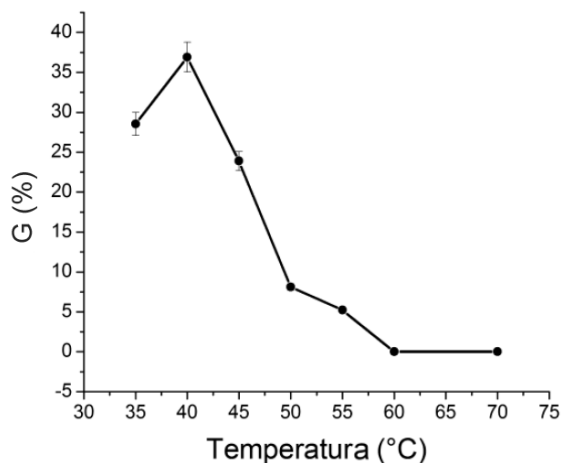
Temperatura (°C)	G (%)
45	0
50	0
55	10,3
60	24,1
65	17,5
70	14,7



Slika 4.22. Uticaj temperature u atmosferi kiseonika na G (%).

Da bi se poboljšao G (%) u atmosferi kiseonika, ispitivan je uticaj aminoaktivatora DMEA na različitim temperaturama. Pomenuti amin je bio odabran na osnovu prethodno publikovanih istraživanja [146]. Međutim, treba napomeniti da amini mogu da imaju dvojako dejstvo, odnosno, neki mogu da deluju kao aktivatori, dok drugi mogu biti inhibitori reakcija kalemljenja. Ispitivane su temperature u opsegu od 35 do 70 °C, a reakciono vreme je bilo 180 min. Maksimalni G (%) dobijen je na 40 °C i iznosio je 36,9 % (slika 4.23). Dobijeni rezultat je posledica prisustva amina i sniženja energije aktivacije inicijatora, usled čega reakcija otpočinje na nižim temperaturama. Poredeći sa reakcijom bez aminoaktivatora, temperatura neophodna za maksimalni G (%) bila je čak za 20 °C niža, a dobijeni stepen kalemljenja 50 % veći. Na temperaturama iznad 40 °C prvo je došlo do blagog, a potom, do naglog smanjenja stepena kalemljenja. Smanjenje G (%) na temperaturama iznad optimalne nastaje usled prerane terminacije rastućih lanaca i sporednih reakcija, koje u tom slučaju postaju dominantne [71,140].

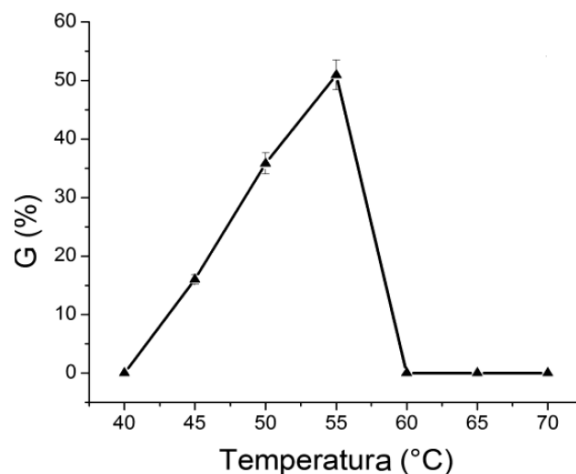
Temperatura (°C)	G (%)
35	28,5
40	36,9
45	23,9
50	8,1
55	5,2
60	0
70	0



Slika 4.23. Uticaj temperature u atmosferi kiseonika i prisustvu DMEA na G (%).

S obzirom da na reakciju kalemljenja između levana i PS-a u atmosferi kiseonika utiču sporedne reakcije između radikala i kiseonika, urađen je dodatni set sinteza u atmosferi azota i bez amina. Ispitivane temperature reakcija su bile u opsegu od 40 do 70 °C, a reakciono vreme 180 min (slika 4.24).

Temperatura (°C)	G (%)
40	0
45	16,0
50	35,8
55	50,9
60	0
65	0
70	0



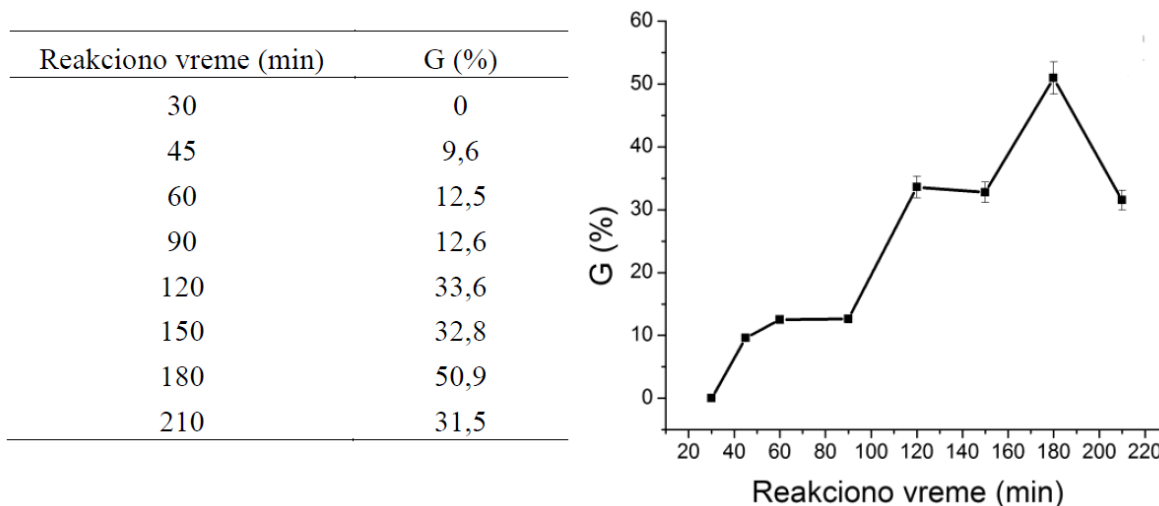
Slika 4.24. Uticaj temperature u atmosferi azota na G (%).

Kada se ispitivana reakcija kalemljenja odvija u atmosferi azota, ona otpočinje na 45 °C, što je za 10 °C niže, nego u atmosferi kiseonika. Maksimalni G (%) se takođe ostvaruje na nižim temperaturama, a istovremeno je dvostruko viši od maksimuma u atmosferi kiseonika. Viši G (%) u inertnoj atmosferi može se objasniti odsustvom reakcije

azota i radikala, jer ne dolazi do negativnog uticaja na reakcije kopolimerizacije smanjenjem broja radikala [77,97]. U prisustvu azota, 55 °C je bila optimalna temperatura za sintezu Lev-g-PS-a sa G (%) koji je iznosio 50,9 %.

4.5.2. Uticaj reakcionog vremena

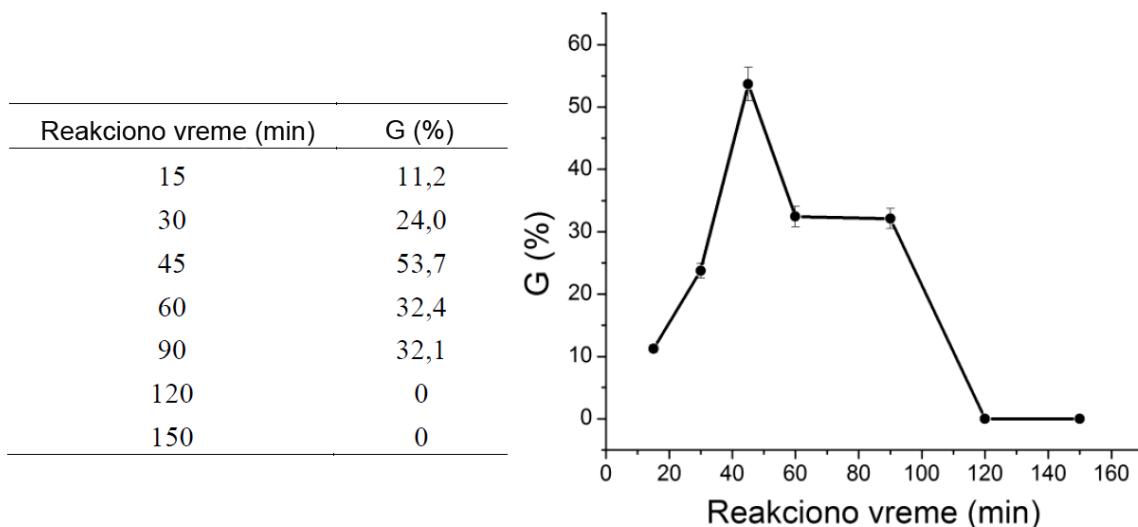
Uticaj reakcionog vremena na stepen kalemljenja je ispitivan u uslovima za maksimalni G (%) (55 °C, atmosfera azota i odsustvo amina). Reakciono vreme je varirano između 15 i 210 min. Uočava se da G (%) raste, zajedno sa porastom vremena reakcije do 180 minuta (slika 4.25). Najviši G (%) dobijen je nakon 180 min i iznosio je 50,9 %, što se slaže sa prethodnim rezultatima. Dužina reakcionog vremena koja je potrebna za dobijanje maksimalnog stepena kalemljenja se može objasniti niskom mobilnošću molekula, malom doprinosu monomera stirena za kalemljenje, reakciji homopolimerizacije i verovatno odsustvom amina. Nakon 180 min, G (%) je bio smanjen, verovatno kao posledica velike potrošnje monomera u sporednim reakcijama i otkidanja lanaca PS sa granula levana [140].



Slika 4.25. Uticaj reakcionog vremena u atmosferi azota i na 55 °C na G (%).

Takođe, pri istim uslovima, urađene su i dodatne sinteze, ali na temperaturi od 70 °C, koja se pokazala kao optimalna u sintezama kopolimera sa skrobom [77,97,146]. Dobijeni stepeni kalemljenja se razlikuju od rezultata pri temperaturi od 55 °C (slika 4.26). Reakcija kalemljenja je bila započeta već nakon 15 min, a maksimalna vrednost za G (%)

postignuta je nakon 45 min ($G=53,7$). Ovo se može objasniti pojavom veće mobilnosti molekula na višim temperaturama [71]. Dalje povećanje vremena reakcije snižava G (%), što je prouzrokovano sporednim reakcijama [140]. Na 60 min i 90 min dolazi do blagog pada, a nakon 120 min stepen kalemljenja je drastično pao na 0 %.



Slika 4.26. Uticaj reakcionog vremena u atmosferi azota i na 70 °C na G (%).

4.5.3. Uticaj amina

Nakon ispitivanja uticaja temperature, atmosfere i reakcionog vremena na G (%) Lev-g-PS kopolimera, može se zaključiti da je najpogodniji set uslova: 70 °C, reakciono vreme od 45 min i atmosfera azota. Pošto, kao što je pomenuto u poglavlju 4.5.1, amini mogu da se ponašaju kao aktivatori i inhibitori reakcija kalemljenja, ispitan je i uticaj različitih amina na G (%) Lev-g-PS kopolimera, u optimalnom setu uslova (tabela 4.16.). Korišćeni su sledeći amini male kiselosti: *n*-propilamin, izobutilamin, *n*-pentilamin, *n*-heksilamin, dietanolamin, dibutilamin, 4-(2-hidroksietil)morfolin, *N,N*-dimetiletanolamin (DMEA), *N,N*-dietiletanolamin.

Ako se uporede tercijarni amini (4-(2-hidroksietil)morfolin, DMEA i *N,N*-dietiletanolamin), uočava se da DMEA deluje kao aktivator reakcije kalemljena kopolimera levana i polistirena. Poređenjem pK vrednosti tercijarnih amina, može se zaključiti da aktivatorska aktivnost DMEA ne potiče od njegove kiselosti, jer upotrebom jače kiseline 4-

(2-hidroksietil)morfolina i *N,N*-dietiletanolamina koji je slabija kiselina u odnosu na DMEA ne dolazi do reakcije kalemljenja. Najpovoljniji uticaj DMEA sa najvišim G (%) = 58,1 %, mogao bi se objasniti sternim faktorima, jer je njegov atom azota najmanje zaštićen. Sterni faktori su takođe uticali na odsustvo kalemljenja upotrebom druga dva tercijarna amina. Vrednosti pK za sekundarne amine (dietanolamin i dibutilamin), razlikuje se za 2,35 jedinice (tabela 4.16.) i G (%) je skoro dvostruko veći (15,5 %) u prisustvu, jače kiseline, dietanolamina. Pošto su svi primarni amini (*n*-propilamin, izobutilamin, *n*-pentilamin, *n*-heksilamin) bliske kiselosti, razlika u G (%) se javila najverovatnije usled sternih faktora. Poredeći primarne amine, najviši G (%) od 37,6 % dobijen je sa *n*-propilaminom, čiji atom azota ima najmanje sterne smetnje.

Tabela 4.16. Uticaj različitih amina na G (%)

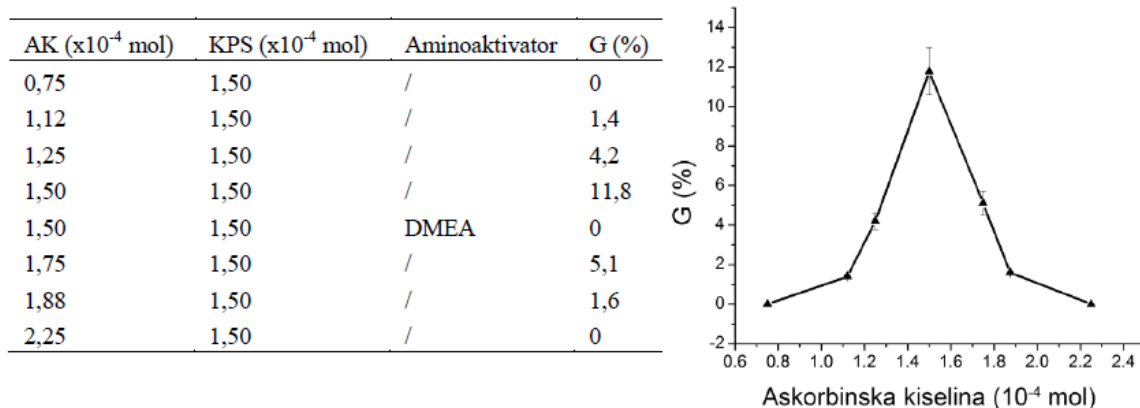
Aminoaktivator	pK vrednost	G (%)
/	/	53,7
<i>n</i> -propilamin	10,71	37,6
izobutilamin	10,68	12,0
<i>n</i> -pentilamin	10,63	15,5
<i>n</i> -heksilamin	10,56	14,1
dietanolamin	8,96	15,5
dibutilamin	11,31	8,1
4-(2-hidroksietil)morfolin	8,49	0
<i>N,N</i> -dimetiletanolamin (DMEA)	9,23	58,1
<i>N,N</i> -dietiletanolamin	9,87	0

U odnosu na sve ispitivane amine, upotrebom DMEA se dostiže najveći G (%), koji je za 4,5 % veći nego u reakciji pri istim uslovima, ali bez amina. DMEA deluje u sintezi Lev-g-PS kopolimera kao aktivator, dok se preostali ispitivani amini ponašaju kao inhibitori reakcije kopolimerizacije, što još jednom potvrđuje njihovu dvojaku prirodu.

Ispitivanje uticaja temperature, atmosfere, reakcionog vremena i amina na G (%) Lev-g-PS kopolimera, pokazalo je da su optimalni uslovi u kojima se dobija G (%) = 58,1 %: temperatura reakcije od 70 °C, reakciono vreme 45 min, atmosfera azota i DMEA kao aminoaktivator.

4.5.4. Sinteze inicirane sistemom KPS/AK

U ovom delu rada upoređivan je uticaj dva tipa inicijatora na G (%) Lev-g-PS kopolimera: termalni – KPS i redoks par - KPS/AK, odnosno mogućnost zamene termalnog inicijatora redoks parom. Redoks par KPS/AK je već korišćen u mnogim reakcijama kopolimerizacije [70,80]. U ovoj tezi, KPS/AK sistemu, molarni odnos pomenutih komponenti je variran između 1 : 0,5 i 1 : 1,5 pri sledećim uslovima: temperatura 70 °C, reakciono vreme 45 min i atmosfera azota. Maksimalni prinos G (%) = 11,8 dobijen je kada je odnos KPS/AK bio 1 : 1 (slika 4.27). Dobijeni stepen kalemljenja je znatno niži kada se koristi KPS/AK sistem, nego samo KPS kao inicijator (53,7%, tabela 4.17). Kada je pri optimalnom odnosu KPS/AK = 1 : 1 dodat DMEA, suprotno očekivanjima, ne samo da nije došlo do povećanja G (%), nego je reakcija kalemljenja potpuno izostala.



Slika 4.27. Uticaj koncentracije AK na G (%)

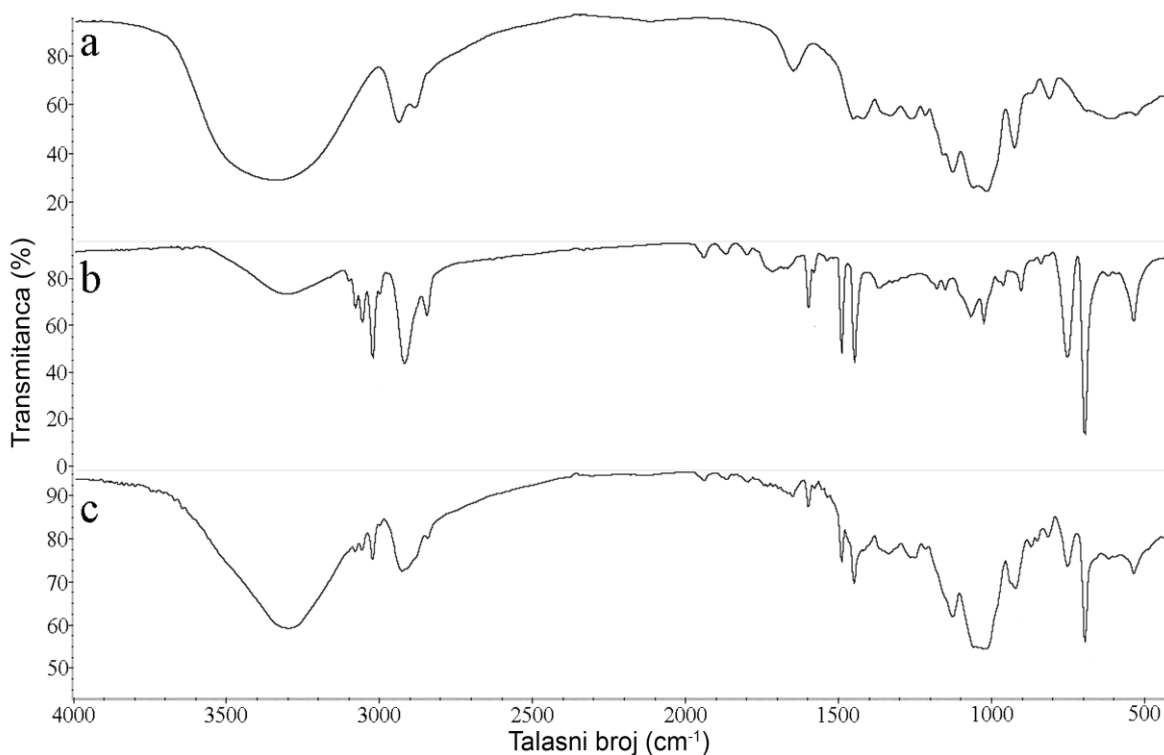
U ispitivanim reakcionim uslovima, u odnosu na upotrebu termalnog inicijatora, prisustvo redoks inicijatorskog sistema u reakcijama kopolimerizacije levana i stirena nije dovelo do povećanja stepena kalemljenja.

4.6. Strukturna karakterizacija kopolimera levana i polistirena

Da bi se strukturno okarakterisao dobijeni Lev-g-PS kopolimer, korišćene su: FTIR spektroskopija, skenirajuća elektronska mikroskopija, termogravimetrijska / diferencijalnotermička analiza, difrakcija X-zracima i ^{13}C nuklearna magnetna rezonancija.

4.6.1. FTIR spektroskopija levana, polistirena i kopolimera

FTIR spektroskopija je korišćena da bi se uporedili uzorci levana i polistirena, kao referentnih materijala i Lev-g-PS kopolimera stepena kalemljenja od 53,7 % (slika 4.28). Na slici 4.28.a prikazan je FTIR spektar levana, koji je izolovan i prečišćen nakon fermentacije soja *B. licheniformis*. Spektar sadrži apsorpcione trake karakteristične za levanski tip polisaharida (poglavlje 4.4.3).



Slika 4.28. FTIR spektar (a) levana, (b) polistirena and (c) Lev-g-PS kopolimera sa G (%) = 53.68

FTIR spektar prikazan na slici 4.28.b pokazuje pikove, koji su specifični za PS. Tri pika između 3082 cm^{-1} i 3025 cm^{-1} odgovaraju valencionim vibracijama C-H veze ugljenika u aromatičnom prstenu. Usled C-H valencionih vibracija CH_2 i CH veze nastali su pikovi na 2921 cm^{-1} i 2848 cm^{-1} , redom. Pikovi između 2000 i 1660 cm^{-1} potiču od C=C vibracija unutar aromatičnog prstena. Takođe, od valencionih vibracija u aromatičnom prstenu potiču još dva pika: jedan izražajan na 1601 cm^{-1} (C-C veza) i drugi na 1492 cm^{-1} (C-H veza). Apsorpcija na 1451 cm^{-1} potiče od C-H deformacionih vibracija unutar CH_2 , a dva pika na 1069 cm^{-1} and 1028 cm^{-1} od C-H deformacionih vibracija u ravni aromatičnog prstena. Poslednja dva pika (755 i 698 cm^{-1}) odgovaraju C-H deformacionim vibracijama van ravni aromatičnog prstena [139,140].

Na slici 4.28.c prikazan je FTIR spektar Lev-g-PS kopolimera dobijenog nakon sinteze u trajanju od 45 minuta i u atmosferi azota, a na temperaturi od $70\text{ }^\circ\text{C}$ i bez upotrebe amina ($G(\%) = 53.68$). Prisustvo svih karakterističnih pikova za levana (1018 i 924 cm^{-1}) i PS (tri pika od 3082 do 3025 , 2928 , 698 cm^{-1}) potvrđuju da dobijeni kopolimer sadrži obe pomenute komponente.

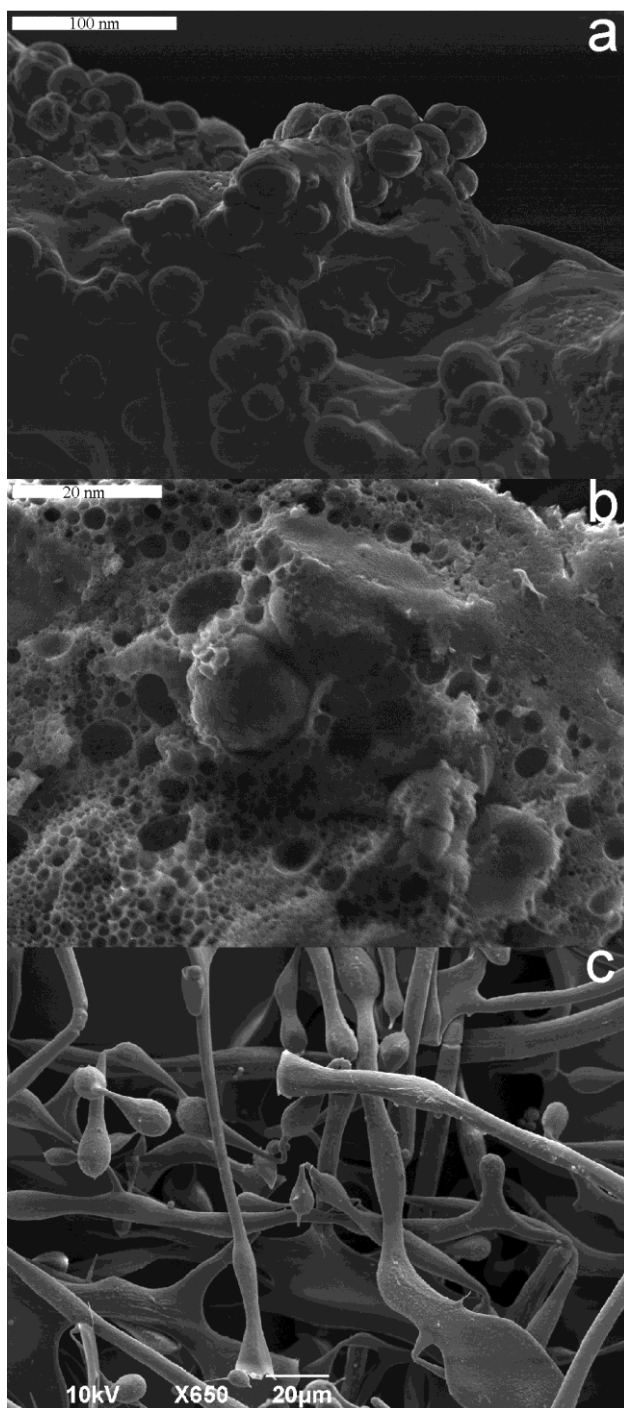
4.6.2. SEM mikroskopija levana i kopolimera

Na slici 4.29. prikazani su mikrografi levana i Lev-g-PS kopolimera stepena kalemljenja od 53,7 % analizirani skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM).

Sve granule levana prisutnog u kopolimeru su sferičnog oblika i dimenzija između $10\text{ }\mu\text{m}$ i $35\text{ }\mu\text{m}$ (slika 4.29.a). Na slici 4.29.b prikazan je mikrograf kopolimera većeg uveličanja na kome se zapaža da je na površini sfernih granula levana prisutan i PS u formi mreže, što je takođe uočeno u prethodnim publikacijama o kopolimeru skroba i polistirena [77,97].

SEM mikrograf levana prikazan je na slici 4.29.c i na njoj se uočava štapičasta struktura levana dužina između $7\text{ }\mu\text{m}$ i $15\text{ }\mu\text{m}$ na čijim krajevima su granule kapljičastog oblika sa maksimalnom veličinom od $2\text{ }\mu\text{m}$. Dimenzije granula su za nekoliko mikrometara veće od prečnika štapića. Oblik i veličina granula levana se razlikuje pre (do $2\text{ }\mu\text{m}$) i nakon reakcije kalemljenja (preko $10\text{ }\mu\text{m}$), što je posledica bubrenja levana. Dodatna potvrda o

bubrenju levana mogu biti pukotine koje se zapažaju na granulama kopolimerima većim od 30 μm (slika 4.29a).



Slika 4.29. SEM mikrografi: (a) i (b) Lev-g-PS kopolimera sa G (%) = 53,68 na različitom uveličanju; (c) levana.

4.6.3. TG/DTA analiza levana, polistirena i kopolimera

TG/DTA termogrami levana, polistirena i Lev-g-PS kopolimera različitih stepena kalemljenja su prikazani na slici 4.30.

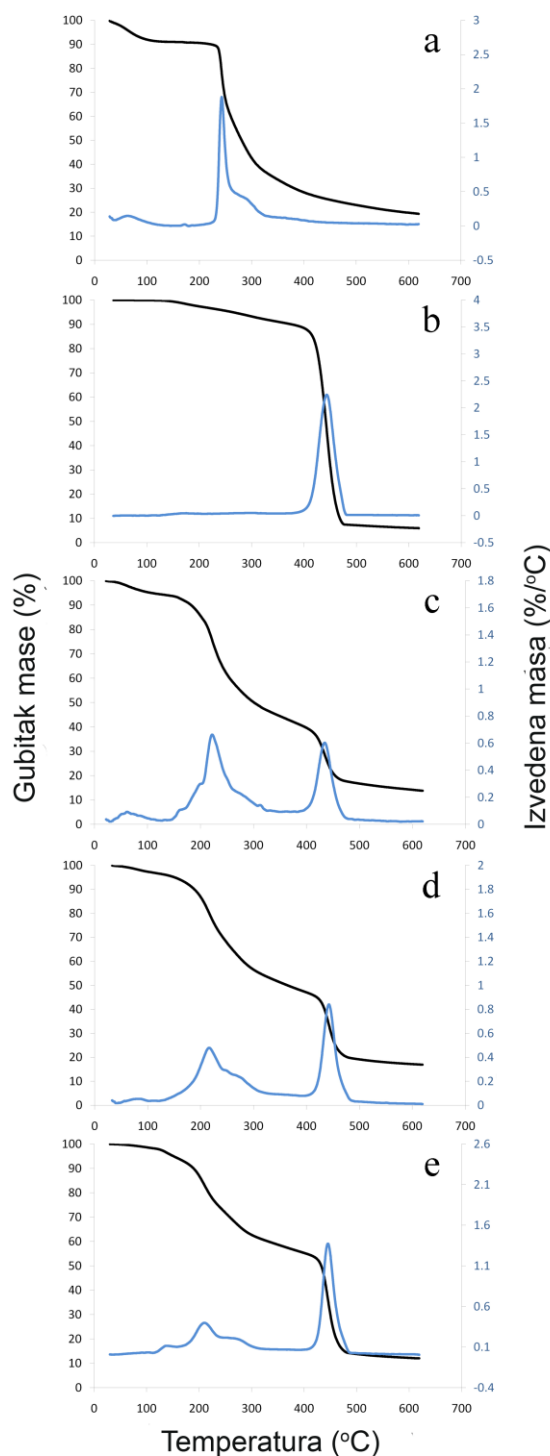
Degradacija levana se odvija u dva koraka, kao što je prikazano na slici 4.30.a U prvom koraku, koji se dešava na temperaturama između sobne i 149 °C, gubitak mase je oko 9 %. Ovaj korak verovatno potiče od gubitka vode koja je adsorbovana i vezana vodoničnim vezama za levan. Temperaturno razlaganje počinje na temperaturama iznad 200 °C i odvija se do 432 °C, sa najvišim pikom na 248 °C. Gubitak mase usled razlaganja levana bio je 65 %.

Slika 4.30.b prikazuje TG/DTA termogram PS-a sa malim i postepenim gubitkom mase (8,1 %) na temperaturama između 127 °C i 329 °C. Nagli gubitak mase od 85 % je bio završen na temperaturi od 500 °C, što je karakteristično za razlaganje polistirena [141].

TG/TDA termogrami tri kopolimera različitog stepena kalemljenja su bili slični (Slike 4.30c-e), odnosno, gubici mase, iako su se razlikovali u procentima, bili su u bliskim temperaturnim intervalima. Nakon gubitka vode, razlaganje kopolimera se odvijalo u dva koraka gubitka mase: prvi je bio prouzrokovan razlaganjem levana, a drugi polistirena, što se slaže sa literaturnim podacima za kopolimere skroba i PS-a [140,141].

Na slici 4.30.c je TG/DTA termogram Lev-g-PS kopolimera dobijenog sa heksilaminom, kao aminoaktivatorom, čiji je G (%) bio 15,5 %. Prvo, zagrevanjem do 124 °C izgubilo se oko 5,6 % vode, daljim zagrevanjem do 350 °C gubitak mase je bio 50 % i na kraju u intervalu između 350 i 549 °C gubitak mase bio je 29 %.

Sličan trostepeni gubitak mase uočava se i kod kopolimera (G (%) = 24,0 %) dobijenog u sintezi na 70 °C, bez amina i u atmosferi azota, koja je trajala 30 min (slika 4.30.d): prvi pri zagrevanju do 121 °C (oko 3,4 % gubitka mase), drugi pri daljem zagrevanju do 349 °C (oko 45 % gubitka mase), a treći pri zagrevanju do 523 °C (oko 33 % gubitka mase).



Slika 4.30. TG/DTA (a) levana, (b) PS, (c) Lev-g-PS sa G (%) = 15,5, (d) Lev-g-PS sa G (%) = 24,0 i (e) Lev-g-PS sa G (%) = 37,6.

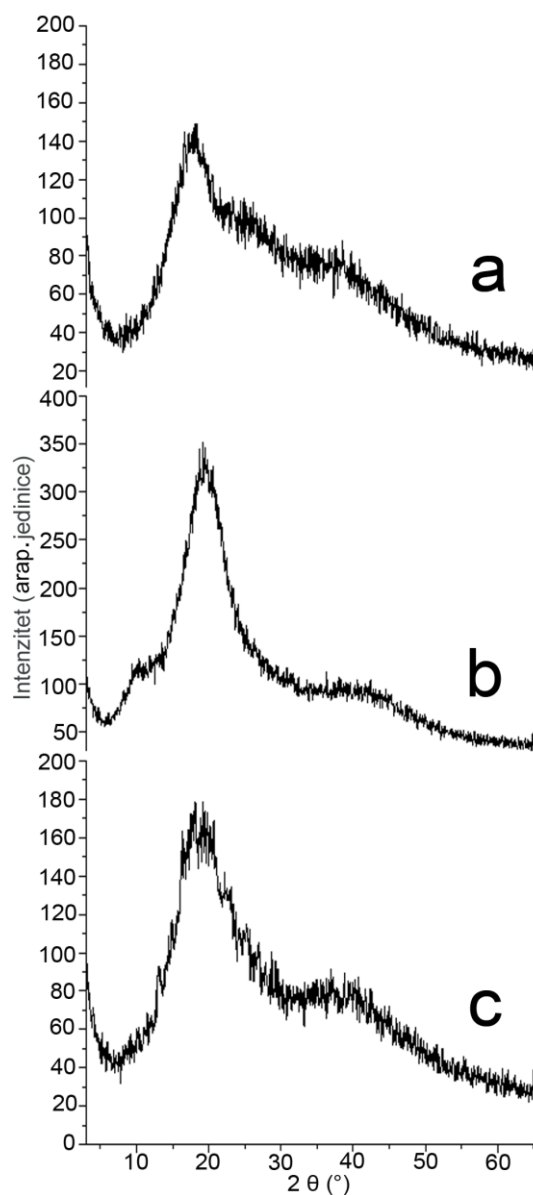
TG/DTA termogram Lev-g-PS kopolimera dobijenog sa propilaminom, čiji je G (%) bio 37,6 % prikazan je na slici 4.30.e. Nakon gubitka vode zagrevanjem do 121 °C, sa daljim porastom temperature do 349 °C gubitak mase je bio oko 36 %. Treća zona gubitka mase (oko 45 %) bila je u temperaturnom intervalu od 349 °C do 526 °C.

Prikazani TG/DTA rezultati potvrđuju da je došlo do reakcije kalemljenja između levana i PS-a. Ako se uporede krive u termogramima 4.30c-e u temperaturnim opsezima 350-500 °C i 120-350 °C, uočava se da porastom G (%) raste i gubitak mase polistirena, a opada gubitak mase levana u odnosu na ukupnu masu analiziranog Lev-g-PS.

4.6.4. XRD analiza levana, polistirena i kopolimera

Difraktogrami analiziranih uzoraka (levan, PS i Lev-g-PS sa $G (\%) = 37,6$) prikazani su na slici 4.31. U analiziranim uzorcima nije utvrđeno prisustvo ni jedne kristalne faze. Zapaža se samo jedan široki amorfni difrakcioni maksimum na $17,8^\circ$ ugla 2θ u uzorku levana (slika 4.31a). Kao što se može naći u literaturi, u uzorku PS prisutni su amorfni pikovi na $19,4^\circ$ i 38° ugla 2θ (slika 4.31b) [142].

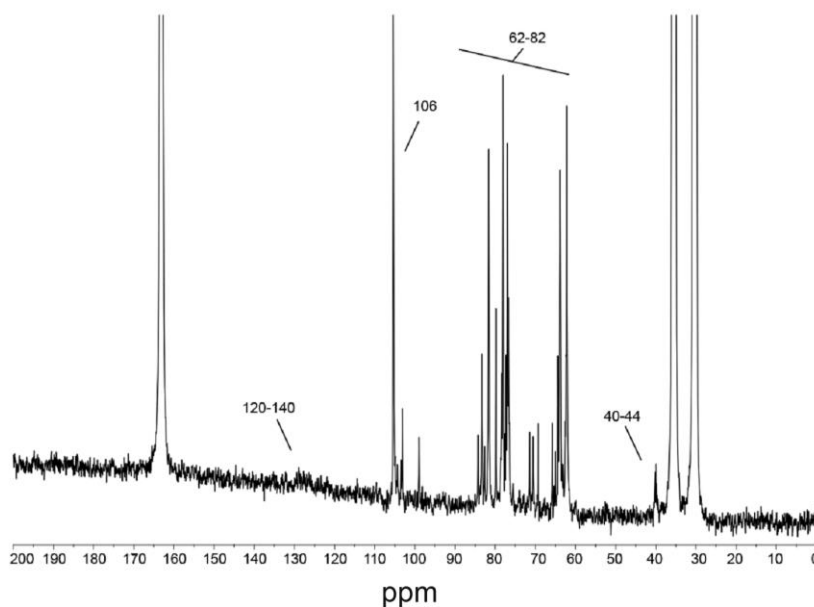
U uzorku Lev-g-PS postoje dva široka amorfna pika (slika 4.31c). Prvi ima dva bliska difrakciona maksimuma na $18,0^\circ$ i $19,6^\circ$ ugla 2θ , a drugi maksimum na $38,0^\circ$ ugla 2θ koji potiču redom od levana i PS. Difraktogram Lev-g-PS pokazuje izraženiju infleksiju na $38,0^\circ$ pomerenu ka nižim vrednostima, koja je koristan indikator za potvrdu formiranja kopolimera levana i PS upotrebom XRD-a.



Slika 4.31. XRD difraktogrami (a) levana, (b) PS, (c) Lev-g-PS sa $G (\%) = 37,6$.

4.6.5. ^{13}C NMR spektroskopija kopolimera

^{13}C -NMR spektar Lev-g-PS kopolimera ($G (\%) = 15,5$) prikazan je na slici 4.32. Na spektru se uočavaju rezonancije karakteristične za levan: signali anomernog regiona na 106 i 105 ppm koji potiču od C-2 β -D-fruktofuranoznih jedinica i signali na 82 ppm (C-5), 79 ppm (C-3), 78 ppm (C-4), 65 ppm (C-6) i 62 ppm (C-1) [143]. Pored pomenutih signala, prisutni su dodatni setovi rezonancija sa hemijskim pomeranjem na 120-140 ppm koji potiču od ugljenika iz fenilnih grupa u graftovanom polistirenu, zajedno sa signalima na 40-44 ppm od ugljenika u alifatičnom delu strukture PS-a [144].



Slika 4.32. ^{13}C NMR spektar Lev-g-PS sa $G (\%) = 15,5$.

Ovi rezultati potvrđuju formiranje Lev-g-PS kopolimera i u skladu su sa rezultatima dobijenim za kopolimer polistirena i skroba [145].

5. ZAKLJUČAK

U okviru ovog rada ispitivano je dobijanje maksimalnog prinosa ekstracelularnog polisaharida levana pomoću bakterije *Bacillus licheniformis* NS032 koja je gajena pri različitim uslovima u podlogama sa saharozom i melasom. Nakon odvajanja biomase, izolovanja iz fermentacione tečnosti i prečišćavanja dvostrukim taloženjem etanolom i dijalizom, polisaharid je strukturno okarakterisan u pogledu monosaharidnog sastava, tipa veze, stepena grananja, molekulske mase, optičke rotacije i viskoziteta. Ispitivanja vrste monomerne jedinice, glikozidne veze i stepena grananja polisaharida rađena su primenom: totalne hidrolize, metilacione analize kombinovane sa GC/MS, perjodatne oksidacije sa Smith-ovom degradacijom i GC/MS analizom dobijenih produkata i spektralnih tehnika (FTIR, ^{13}C - i ^1H -NMR, COSY, HSQC i HMBC). Zatim, ispitani su optimalni reakcioni uslovi kojima se postiže maksimalni stepen kalemljenja kopolimera levana i polistirena. Dobijeni kalemljeni kopolimer je izdvojen iz reakcione smeše, prečišćen i takođe strukturno okarakterisan. Za strukturnu karakterizaciju Lev-g-PS kopolimera korišćene su tehnike: FTIR i NMR spektroskopije, SEM, TG/DTA i XRD.

Optimizovane podloge za fermentaciju sa saharozom i melasom, zajedno sa strukturnom karakterizacijom levana, korišće budućim proučavanjima ovog polisaharida bakterije *B. licheniformis*, ne samo na industrijskom nivou, već i za istraživanja različitih primena ovog biopolimera. Takođe, utvrđeni najpogodiji reakcioni parametri za kalemljenu kopolimerizaciju levana i polistirena i strukturna karakterizacija dobijenog kopolimera otvaraju put daljim ispitivanjima materijala na bazi ovog kopolimera u smeru njihovog stepena biodegradabilnosti.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti sledeće:

- Optimalna temperatura za produkciju polisaharida je 37 °C, a aeracija podloge mešanjem na rotacionoj mućkalici nema uticaja na prinos;
- Najviši prinos dobijen je u podlogama sa početnom koncentracijom saharoze u opsegu od 100 – 200 g/L (0,26 – 0,29 g levana/g saharoze);
- Najbolji izvor azota, od ispitivanih organskih, za produkciju levana je kombinacija EK i ME, a neorganskih amonijum-hlorid;
- Optimalni uslovi za produkciju levana (LS200) na podlozi sa nižom koncentracijom saharoze su: 196,75 g/L saharoze, 2,44 g/L amonijum-hlorida i inicijalna pH

vrednost od 6,97, pri kojima je modelom predviđen prinos od 47,84 g/L, što se slaže sa eksperimentalno dobijenim ($46,3 \pm 1,9$ g/L);

- Optimalni uslovi za produkciju levana (LS400) na podlozi sa višom koncentracijom saharoze su: 397,65 g/L saharoze, 4,62 g/L g/L amonijum-hlorida i inicijalna pH vrednost od 7,31, pri kojima je modelom predviđen prinos od 99,19 g/L u saglasnosti sa eksperimentalno dobijenim ($94,4 \pm 4,1$ g/L);
- Melasa sadrži 77,8 % suve supstance, 6,3 % pepela, 5,9 % betaina, 1,25 % hlorida, 49,4 % saharoze, 0,55 % rafinoze, 38,64 % ugljenika, 5,93 % vodonika, 2,02 % azota, 0,56 % sumpora, 1,98 % kalijuma, 1,12 % natrijuma, 0,44 % kalcijuma, 70 ppm gvožđa, 51 ppm magnezijuma, 4,2 ppm cinka, 2,5 ppm mangana, 1,9 ppm nikla, 0,71 ppm bakra i manje od 0,05 % fosfata;
- Dodatak fosfata u podlogu na bazi melase (MS100, S100) delovao je stimulatивно na sintezu levana do produktivnosti od 0,25-0,27 g levana/g saharoze, koja je bliska sa produktivnošću u modifikovanom OPS sa inicijalnom koncentracijom saharoze u opsegu od 100 – 200 g/L;
- Optimalna podloga sa melasom za produkciju 53,6 g/L levana (LM) sadrži: 62,6 % melase i 4,66 g/L fosfata sa inicijalnim pH od 7,2;
- Rezultati totalne hidrolize pokazuju da je ispitivani polisaharid fruktan koji sadrži malu količinu glukoze;
- Metilacionom analizom LM, LS200 i LS 400 levana je utvrđeno da osnovni niz sačinjavaju fruktofuranosne jedinice međusobno povezane (2,6)-glikozidnim vezama, sa glukoznom heksapiranoznom jedinicom na neredukcionom kraju niza. Deo fruktoznih jedinica supstituisan je preko položaja O-1 sa (2,1)-vezanim pojedinačnim fruktofuranosnim ostacima ili su (2,1)-vezane jedinice preko položaja O-6 dalje polimerizovane (2,6)-glikozidnim vezama u oligomerne (polimerne) lance fruktofuranozil ostataka. Ovakva struktura odgovara strukturi fruktana levanskog tipa;
- Izračunati stepeni grananja na osnovu metilacione analize uzoraka levana (LS200 = $11,04 \pm 0,57$ %, LS400 = $11,99 \pm 0,63$ % i LM = $12,68 \pm 0,71$ %) nisu značajno različiti;

- FTIR i NMR spektroskopski podaci (^{13}C - i ^1H -NMR, COSY, HSQC i HMBC), odgovaraju podacima, koji se odnose na strukture fruktana levanskog tipa (β 2,6 veze). NMR analiza je takođe dodatno potvrdila razgranatost (β 2,1 veze) ispitivanih molekula. NMR spektri LS400 levana ukazuju na prisustvo dodatnog signala, koji odgovara terminalnoj α -D-glukopiranoznoj jedinici;
- Raspored pikova manjeg intenziteta u okolini C2, C3 i C6 atoma u ^{13}C NMR spektrima levana ukazuje da nema signifikantnih razlika u obrascu i stepenu grananja između LS200, LS400 i LM levana, što je konzistentno sa rezultatima metilacione analize;
- Rezultati reduktivne degradacije oksidovanog polisaharida ukazuju da su u glavnom lancu ispitivanog uzorka prisutne (2,6)-glikozidne veze;
- Specifične rotacije LS200 levana $[\alpha]^{25} = -41,8^\circ$, LS400 levana $[\alpha]^{25} = -40,9^\circ$ i LM levana $[\alpha]^{25} = -40,4^\circ$ su u skladu sa literaturnim podacima;
- Dobijeni niski unutrašnji viskoziteti levana LS200 = 0,25 dL/g, LS400 = 0,14 dL/g i LM = 0,24 dL/g ukazuju na kompaktni i sferičan oblik ispitivanog polisaharida u rastvoru;
- Levani LS200 i LM imaju relativno visoku molekulsku masu (opseg $> 10^6$ Da), za razliku od LS400 koji je u opsegu od 10^5 Da;
- Porast temperature reakcije kopolimerizacije dovodi do povećanja G (%) sa maksimalnim G (%) (24,1 %) koji je postignut je na 60°C u atmosferi kiseonika, ali dodatak DMEA snižava energiju aktivacije inicijatora, pa se postiže maksimum već na 40°C i iznosi 36,9 %. Kada se ispitivana reakcija kalemljenja odvija u atmosferi azota i bez amina, optimalna temperatura za sintezu Lev-g-PS-a je 55°C sa G (%) = 50,9 %;
- Najviši G (%) = 50,9 se postiže u reakciji u trajanju od 180 minuta, u atmosferi azota i bez prisustva amina, što se slaže sa prethodnim rezultatima. Međutim, na temperaturi od 70°C reakciono vreme je kraće (nakon 45 min G (%) = 53,7);
- Najviši stepen kalemljenja (58,1 %, 15,5 %, 37,6 %) dobijen je upotrebom DMEA, dietanolamina i n-propilamina u odnosu na ispitivane tercijarne, sekundarne i primarne amine, respektivno;

- Upotreba redoks - KPS/AK sistema u reakcijama kopolimerizacije levana i stirena nije dovelo do povećanja stepena kalemljenja (maksimalni G (%) = 11,8);
- FTIR spekter kopolimera pokazuje prisustvo svih karakterističnih pikova, koji se odnos na levan (1018 i 924 cm^{-1}) i polistiren (tri pika od 3082 do 3025 , 2928 , 698 cm^{-1}), što potvrđuje da sadrži obe pomenute komponente;
- SEM mikrograf kopolimera pokazuje da je na površini sfernih granula levana prisutan i polistiren u formi mreže, što je takođe uočeno u prethodnim publikacijama o kopolimeru skroba i polistirena. Štapičastu strukturu sa granulama kapljica oblika na krajevima prikazao je SEM mikrograf levana;
- Rezultati TG/DTA analize potvrđuju da je došlo do reakcije kalemljenja između levana i polistirena, a dobijeni gubici mase su u korelaciji sa G (%);
- Difraktogram Lev-g-PS ima izraženiju infleksiju na $38,0^\circ$ pomeću ka nižim vrednostima, što potvrđuje formiranje kopolimera levana i PS;
- ^{13}C -NMR spektar Lev-g-PS potvrđuje formiranje kopolimera i u skladu je sa rezultatima dobijenim za kopolimer polistirena i skroba.

5. LITERATURA

1. Altes O., Systems biology of microbial exopolysaccharides production. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 3 (2015) 1-15.
2. Nurul H. A., Shuhaimi M., Yaakob M. C. Microbial polysaccharides and their modification approaches: A Review. *Int. J. Food. Prop.* 18 (2015) 332-347.
3. Donot F., Fontana A., Baccou J. C., Schorr-Galindo S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 951-962.
4. Freitas F., Torres C., Reis M. Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production. *Bioresour. Technol.* 245 (2017) 1674–1683.
5. Gupta P., Diwan B. Bacterial exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnol. Rep.* 13 (2017) 58-71.
6. Madhuri V. K., Vidya Prabhakar K. Microbial exopolysaccharides: biosynthesis and potential applications. *Orient. J. Chem.* 30 (3) (2014) 1401-1410.
7. Schmid J. Recent insights in microbial exopolysaccharide biosynthesis and engineering strategies. *Curr. Opin. Biotechnol.* 53 (2018) 130–136.
8. Freitas F., Alves V. D., Reis M. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends Biotechnol.* 29 (8) (2011) 388-398.
9. Choundury. A. R., Bhattacharyya M. S., Prasad G. S. Application of response surface methodology to understand the interaction of media components during pullulan production by *Aureobasidium pullulans* RBF-4A3. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 1 (2012) 232-237.
10. Bezera A. M., Santelli E. R., Oliveria P. E., Villar S. L., Escalera A. L. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76 (2008) 965-977.
11. Miller N. J., Miller C. J (Eds), Experimental design and optimization. In: *Chemometrics for Analytical Chemistry*, Pearson Education Limited, Harlow, UK, 2005, p. 181-210.

12. Ferreira S. L. C., Bruns E. R., Ferreira S. H., Matos D. G., David M. J., Brandão C. G., Da Silva P. G. E., Portugal A. L., Dos Reis S. P., Souza S. A., Dos Santos L. N. W. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Anal. Chim. Acta.* 597 (2007) 179–186.
13. Bas D., Boyaci H. I. J. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Food Eng.* 78 (2007) 836-845.
14. Liu J., Luo J., Ye H., Sun Y., Lu Z., Zeng X. Medium optimization and structural characterization of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Carbohydr. Polym.* 79 (2010) 206-213.
15. Majumder A., Singh A., Goyal A. Application of response surface methodology for glucan production from *Leuconostoc dextranicum* and its structural characterization. *Carbohydr. Polym.* 75 (2009) 150-156.
16. Aslan N., Cebeci Y. Application of Box–Behnken design and response surface methodology for modeling of some Turkish coals. *Fuel* 86 (2007) 90-97.
17. Li H., Xu H., Li S., Feng X., Ouyang P. Optimization of exopolysaccharide welan gum production by *Alcaligenes sp.* CGMCC2428 with Tween-40 using response surface methodology. *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 1363-1368.
18. Chen J., Wu S., Pan. Optimization of medium for pullulan production using a novel strain of *Aureobasidium pullulans* isolated from sea mud through response surface methodology. *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 771-774.
19. Jiang. Optimization of fermentation conditions for pullulan production by *Aureobasidium pullulan* using response surface methodology. *Carbohydr. Polym.* 79 (2010) 414-417.
20. Jathore N. R., Bule M. V., Tilay A. V., Annapure U. S. Microbial levan from *Pseudomonas fluorescens*: Characterization and medium optimization for enhanced production. *Food Sci. Biotechnol.* 21 (2012) 1045–1053.
21. Karthiga Devil G., Alamu A. Production of biopolymer levan by *Bacillus subtilis* using non-ionic surfactants. *Asian J. Pharm. Tech.* 3 (4) (2013) 149-154.

22. Silbir S., Dagbagli S., Yegin S., Baysal T., Goksungur Y. Levan production by *Zymomonas mobilis* in batch and continuous fermentation systems. *Carbohydr. Polym.* 99 (2014) 454–461.
23. Pagliano G., Ventorino V., Panico A., Pepe O. Integrated systems for biopolymers and bioenergy production from organic waste and by-products: a review of microbial processes. *Biotechnol. Biofuels.* 10 (113) (2017) 1-24.
24. Peters D., Raw materials, in: Ulber R., Sell D. (Eds.), White biotechnology advances in: *Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol. 105, Springer, Berlin, Heidelberg, 2007, p. 1–30.
25. Rajaeifar A. M., Hemayati S. S., Tabatabaei M., Aghbashlo M., Mahmoudi B. S. A review on beet sugar industry with a focus on implementation of waste-to-energy strategy for power supply. *Renew. Sust. Energ. Rev.* (2019) 423–442.
26. F. Küçükaşık, H. Kazak, D. Güney, I. Finore, A. Poli, O. Yenigün, B. Nicolaus, E. Öner. Molasses as fermentation substrate for levan production by *Halomonas sp*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89 (2011) 1729–1740.
27. Tian F., Karboune S. Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides by levansucrase from *Bacillus amyloliquefaciens*: specificity, kinetics and product characterization. *J. Mol. Catal., B Enzym.* 82 (2012) 71-79.
28. Dahech I., Fakhfakh J., Damak M., Belgith H., Mejdoub H., Belgith S. K. Structural determination and NMR characterization of bacterial exopolysaccharide. *Int. J. Biol. Macromol.* 59 (2013) 417-422.
29. Jakob F., Pfaff A., Novoa-Carballal R., Rübsam H., Becker T., Vogel F. V. Structural analysis of fructans produced by acetic acid bacteria reveals a relation to hydrocolloid function. *Carbohydr. Polym.* 92 (2013) 1234-1242.
30. Combie J., Öner T. E. From healing wounds to resorbable electronics, levan can fill bioadhesive roles in scores of markets. *Bioinspir. Biomim.* 14 (2019) 011001.
31. Öner T. E., Hernández L., Combie J. Review of Levan polysaccharide: From a century of past experiences to future prospects. *Biotechnol. Adv.* 34 (2016) 827-844.
32. Tomulescu C., Stoica R., Sevcenco C., Cășărică A., Moscovici M., Vamanu A. Levan – a mini review. *Sci. Bull. Series F. Biotechnol.* 10 (2016) 309-316.

33. Srikanth R., Sundhar Reddy H. S. S. C., Siddartha G., M. J. Ramaiah, K. B. Uppuluri. Review on production, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydr. Polym.* 120 (2015) 102-114.
34. Chen X., Gao H., Ploehn H. Montmorillonite-levan nanocomposites with improved thermal and mechanical properties. *Carbohydr. Polym.* 101 (2014) 565-573.
35. Abdel-Fattah M. A., Gamal-Eldeen M. A., Helmy A. W., Esawy A. M. Antitumor and antioxidant activities of levan and its derivative from the isolate *Bacillus subtilis* NRC-aza. *Carbohydr. Polym.* 89 (2012) 314-322.
36. De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K., Whitman W. B. (Eds), In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 3, The Firmicutes, Springer, New York, 2009, p. 21.
37. Boer S. A., Priest F., Diderichsen B. On the industrial use of *Bacillus licheniformis*: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40 (1994) 595-598.
38. Rey W. M., Ramaiya P., Nelson A. B., Brody-Karpin D. S., Zaretsky J. E., Tang M., Lopez de Leon A., Xiang H., Gusti V., Clausen G. I., Olsen B. P., Rasmussen D. M., Andersen T. J., Jørgensen L. P., Larsen S. T., Sorokin A., Bolotin A., Lapidus A., Galleron N., Ehrlich D. S., Berka M. R. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biol.* 5 (2004) 1-12.
39. Belghith S. K., Dahech I., Belgith H., Mejdoub H. Microbial production of levansucrase for synthesis of fructooligosaccharides and levan. *Int. J. Biol. Macromol.* 50 (2012) 451-458.
40. Dahech I., Belgith S. K., Belgith H., Mejdoub H. Partial purification of a *Bacillus licheniformis* levansucrase producing levan with antitumor activity. *Int. J. Biol. Macromol.* 51 (2012) 329-335.
41. González-Garcinuño A., Taberero A., Domínguez Á., Galán A. M., Martín del Valle M. E. Levan and levansucrases: Polymer, enzyme, micro-organisms and biomedical applications. *Biocatal. Biotransformation* 36 (3) (2018) 233-244.
42. Kang S. A., Jang K-H., Seo J-W., Kim K. H., Kim Y. H., Rairakhwada D., Seo M. Y., Lee J. O., Ha S. D., Kim C-H., Rhee S-K. Levan: applications and perspectives.

- Bernd H, Rehm A, (Eds.), In: *Microbial Production of Biopolymer Precursors: Applications and Perspectives*, Caister Academic Press, Norfolk UK, 2009, p. 145.
43. Choi W., Hwang Y., Sahu A., Min K., Sung D., Tae G., Chang H. J. An injectable and physical levan-based hydrogel as a dermal filler for soft tissue augmentation. *Biomater. Sci.* 6 (2018) 2627-2638.
44. Domzal-Kedzia M., Lewińska A., Jaromin A., Weselski M., Pluskota R., Lukaszewicz. Fermentation parameters and conditions affecting levan production and its potential applications in cosmetics. *Bioorg. Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.02.012>.
45. Ghaly A. E., Arab F., Mahmoud N. S., Higgins J. Production of levan by *Bacillus licheniformis* for use as a soil sealant in earthen manure storage structures. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 3 (2007) 47–54.
46. Liu J., Luo J., Ye H., Zeng X. Preparation, antioxidant and antitumor activities in vitro of different derivatives of levan from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Food Chem. Toxicol.* 50 (2012) 767-772.
47. Dahech I., Harrabi B., Hamden K., Feki A., Mejdoub H., Belgith H., Belgith S. K. Antioxidant effect of nondigestible levan and its impact on cardiovascular disease and atherosclerosis. *Int. J. Biol. Macromol.* 58 (2013) 281-286.
48. Xu X., Gao C., Liu Z., Wu J., Han J., Yan M., Wu Z. Characterization of the levan produced by *Paenibacillus bovis* sp. nov. BD3526 and its immunological activity. *Carbohydr. Polym.* 144 (2016) 178-186.
49. Sezer D. A., Sarilmişer K. H., Rayaman E., Çevikbaş A., Öner T. E., Akbuğa J. Development and Characterization of vancomycin-loaded levan-based microparticulate system for drug delivery. *Pharm. Dev. Technol.* 22 (5) (2017) 627-634.
50. Carreira A., Gonçalves F., Mendonça P., Gil M., Coelho J. Temperature and pH responsive polymers based on chitosan: Applications and new graft copolymerization strategies based on living radical polymerization. *Carbohydr. Polym.* 80 (2010) 618–630.

51. Erginer M., Akcay A., Coskuncan B., Morova T., Rende D., Bucak S., Baysal N., Ozisik R., Eroglu S. M., Agirbasli M., Oner T. E. Sulfated levan from *Halomonas smyrnensis* as a bioactive, heparin-mimetic glycan for cardiac tissue engineering applications. *Carbohydr. Polym.* 149 (2016) 289-296.
52. González-Garcinuño A., Masa R., Hernández M., Domínguez Á., Taberero A., Martín dell Valle E. Levan-capped silver nanoparticles for bactericidal formulations: release and activity modeling. *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019)1052.
53. Gomes T., Caridade S., Sousa M., Azevedo S., Kandur M., Öner E., Alves N., Mano J. Adhesive free-standing multilayer films containing sulfated levan for biomedical applications. *Acta Biomater.* 69 (2018) 183-195.
54. Berg A., Oner E., Combie J., Schneider B., Ellinger R., Weisser J., Wyrva R., Schnalrauch M. Formation of new, cytocompatible hydrogels based on photochemically crosslinkable levan methacrylates. *Int. J. Biol. Macromol.* 107 (2018) 2312-2319.
55. Avsar G., Agirbasli D., Agirbasli A. M., Gunduz O., Oner T. E. Levan based fibrous scaffolds electrospun via co-axial and single needle techniques for tissue engineering applications. *Carbohydr. Polym.* 193 (2018) 316-325.
56. Kwon K. Y., Lee J. S., Ko G-J, Sunwoo S. H., Lee S., Jo Y. J., Choi C. H., Hwang S-W., Kim T-I. Biosafe, eco-friendly levan polysaccharide toward transient electronics. *Small* 14 (1801332) (2018) 1-8.
57. Goubereyre P., Denery S., Bodinier M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. *J. Leukocyte Biol.* 89 (2011) 685-693.
58. Siefert S., Watzl B. Inulin and Oligofructose: Review of Experimental Data on Immune Modulation. *J. Nutr.* 137 (2007) 2563-2567.
59. Lomax R. A., Calder C. P. Prebiotics, immune function, infection and inflammation: a review of the evidence. *Brit. J. Nutr.* 101 (2009) 633-658.
60. Haciosmanoğlu G. G., Doğruel T., Genç S, Oner E. T., Can S. Z. Adsorptive removal of bisphenol A from aqueous solutions using phosphonated levan. *J. Hazard Mater.* 374 (2019) 43-49.

61. Babu R., O'Connor K., Seeram R. Current progress on bio-based polymers and their future trends. *Prog. Biomater.* 2 (8) (2013) 1–16.
62. Lewandowich G., Leja K. Polymer biodegradation and biodegradable polymers - a review. *Pol. J. Environ. Stud.* 19 (2) (2010) 255–266.
63. Cho S-H., Moon M-M., Kim M., Nam K., Kim Y-J. Biodegradability and biodegradation rate of poly(caprolactone)-starch blend and poly(butylene succinate) biodegradable polymer under aerobic and anaerobic environment. *Waste Manag.* 31 (2011) 475–480
64. Bhattacharya A., Misra N.B. Grafting: A versatile means to modify polymers Techniques, factors and applications. *Prog. Polym. Sci.* 29 (2004) 767–814.
65. Maharana T., Pattanaik S., Routaray A., Nath N., Sutar K. A. Synthesis and characterization of poly(lactic acid) based graft copolymers. *React. Funct. Polym.* 93 (2015) 47-67.
66. Kumar D., Pandey J., Raj V., Kumar P. A review on the modification of polysaccharide through graft copolymerization for various potential applications. *Open Med. Chem. J.* 11 (2017) 109-126.
67. Espino-Peréz E., Gilbert G. R., Domenek S., Brochier-Salon C. M., Belgacem N. M., Bras J. Nanocomposites with functionalized polysaccharide nanocrystals through aqueous free radical polymerization promoted by ozonolysis. *Carbohydr. Polym.* 135 (2016) 256-266.
68. Shatz C., Lecommandoux S. Polysaccharide-containing block copolymers: synthesis, properties and applications of an emerging family glycoconjugates. *Macromol. Rapid Commun.* 31 (2010) 1664-1684.
69. Nagaraja K. G., Demappa T., Mahadeviath. Polymerization kinetics of acrylonitrile by oxidation: reduction system using potassium persulfate/ascorbic acid in an aqueous medium. *J. Appl. Polym. Sci.* 121 (2011) 1299-1303.
70. Singh, V., Tiwari, A., Sanghi, R. Studies on K₂S₂O₈/ascorbic acid initiated synthesis of *Ipomoea dasysperma* seed gum-g-poly(acrylonitrile): A potential industrial gum. *J. Appl. Polym. Sci.* 98 (2005) 1652–1662.

71. Singh B., Sharma N. Optimized synthesis and characterization of polystyrene graft copolymers and preliminary assessment of their biodegradability and application in water pollution alleviation technologies. *Polym. Degrad. Stab.* 92 (2007) 876 -885.
72. Hilburg S., Elder A., Chung H., Ferebee R., Bockstaller M., Washburn N. A universal route towards thermoplastic lignin composites with improved mechanical properties. *Polymer* 55 (2014) 995-1003.
73. Naim A., Umar A., Sanagi M., Basarudin N. Chemical modification of chitin by grafting with polystyrene using ammonium persulfate initiator. *Carbohydr. Polym.* 98 (2013)1618-1623.
74. Francis R., Baby D., Gnanou Y. Synthesis and self-assembly of chitosan-g-polystyrene copolymer: A new route for the preparation of heavy metal nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* 438 (2015) 110-115.
75. Canché-Escamilla G., Canché-Canché M., Duarte-Aranda S., Cáceres-Farfán M., Borges-Argáez R. Mechanical properties and biodegradation of thermoplastic starches obtained from grafted starches with acrylics. *Carbohydr. Polym.* 86 (2011) 1501–1508.
76. Sheikh N., Akhavan A., Ataeivarjovi E. Radiation grafting of styrene on starch with high efficiency. *Radiat. Phys. Chem.* 85 (2013) 189-192.
77. Nikolic V., Velickovic S., Popovic A. Influence of amine activators and reaction parameters on grafting reaction between polystyrene and starch. *J. Polym. Res.* 21 (2014) 363.
78. Houga C., Meins L.J.-F., Borsali, R., Taton D., Gnanou Y., Synthesis of ATRP-induced dextran-b-polystyrene diblock copolymers and preliminary investigation of their self-assembly in water. *Chem. Commun.* (2007) 3063–3065.
79. Mechram W.M., Patil V.V., Mhaske T.S., Thorat B.N. Graft copolymers of starch and its application in textiles. *Carbohydr. Polym.* 75 (2009) 71–78.
80. Singh V., Sharma A.K., Tripathi D.N., Sanghi R. Poly(methylmethacrylate) grafted chitosan: An efficient adsorbent for anionic azo dyes. *J. Hazard Mater.* 161 (2009) 955–966.

81. Sekharan V.R., Abraham T.B., Thachil T.E., Utilization of waste expanded polystyrene: Blends with silica-filled natural rubber. *Mater. Des.* 40 (2012) 221–228.
82. Gojgic-Cvijovic G. D., Milic J. S., Solevic T. M., Beskoski V. P., Ilic M. V., Djokic L. S., Narancic T. M., Vrvic, M. M. Biodegradation of petroleum sludge and petroleum polluted soil by a bacterial consortium: a laboratory study. *Biodegradation.* 23 (2012) 1–14.
83. Liu C., Lu J., Lu L., Liu Y., Wang F., Xiao M. Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1. *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 5528–5533.
84. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28 (1956) 350–356.
85. Focht R. L., Schmidt F. H., Dowling B. B. Colorimetric determination of betaine in glutamate process end liquor. *J. Agric. Food Chem.* 4 (1956) 546–548.
86. Chaplin M. F. Monosaccharides. Chaplin M. F., Kennedy J. F. (Eds.), In: *Carbohydrate analysis: a practical approach*, IRL Press, Oxford, England, 1986, p. 1–36.
87. Ciric J., Oostland J., De Vries J. W., Woortman A. J. J., Loos K. Size exclusion chromatography with multi detection in combination with matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry as a tool for unravelling the mechanism of the enzymatic polymerization of polysaccharides. *Anal. Chem.* 84 (2012) 10463–10470.
88. Whistler R. L. (Ed.) Hay G. W., Lewis B. A., Smith F. In: *Methods in carbohydrate chemistry*, Vol. 5, Academic Press, New York 1965, p. 357-361.
89. Tanaka T., Oi S., Yamamoto T. The molecular structure of low and high molecular weight levans synthesized by levansucrase *J. Biochem.* 87 (1980) 297-303.
90. Ciucanu I., Kerek F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates, *Carbohydr. Res.* 131 (1984) 209–217.

91. Rolf D., Gray G. J. Reductive cleavage of glycosides. *Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 3539-3541.
92. Sims J. P., Boyko J. W., Edwards R. J. The structural analysis of a levan produced by *Streptococcus salivarius* SS2. *Carbohydr. Res.* 208 (1990) 193-198.
93. Rolf D., Bennek A. J., Gray R. G. Analysis of linkage positions in d-glucopyranosyl residues by the reductive-cleavage method. *Carbohydr. Res.* 137 (1985) 183-196.
94. Rolf D., Gray G. R. Analysis of the linkage positions in D-fructofuranosyl residues by the reductive-cleavage method, *Carbohydr. Res.* 131 (1984) 17-28.
95. Chen X. M., Tian G. Y. Structural elucidation and antitumor activity of a fructan from *Cyathula officinalis* Kuan, *Carbohydr. Res.* 338 (2003) 1235-1241.
96. Kekez B., Gojgić-Cvijović G., Jakovljević D., Pavlović V., Beškoski V., Popović A., Vrvic M. M., Nikolić V. Synthesis and characterization of a new type of levan-graft-polystyrene copolymer. *Carbohydr. Polym.* 154 (2016) 20-29.
97. Nikolic V., Velickovic S., Popovic A. Biodegradation of polystyrene-graft-starch copolymers in three different types of soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (2014) 9877-9886.
98. De Oliveira M. R., Da Silva R. S. S. F., Buzato J. B., Celligoi M. A. P. C. Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. *Biochem. Eng. J.* 37 (2007) 177-183.
99. Keith J., Wiley B., Ball D., Arcidiacono S., Zorfass D., Mayer J., Kaplan D. Continuous culture system for production of biopolymer levan using *Erwinia herbicola*. *Biotechnol. Bioeng.* 38 (1991) 557-560.
100. Abdel-Fattah A. F., Mahmoud D. A. R., Esawy M. A. T. Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and enzymic synthesis of levan and fructo-oligosaccharides. *Curr. Microbiol.* 51 (2005) 402-407.
101. Liu J., Luo J., Ye H., Sun Y., Lu Z., Zeng X. Production, characterization and antioxidant activities *in vitro* of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Carbohydr. Polym.* 78 (2009) 275-281.
102. Kumar A. S., Mody K., Jha B. Bacterial exopolysaccharides – a perception. *J. Basic Microbiol.* 47 (2007) 103-117.

103. Melo I. R., Pimentel M. F., Lopes C. E., Calazans G. M. T. Application of fractional factorial design to levan production by *Zymomonas mobilis*. *Braz. J. Microbiol.* 38 (2007) 45–51.
104. Shih I. L., Yu Y. T., Shieh C. J., Hsieh, C. Y. Selective production and characterization of levan by *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi. *J. Agric. Food Chem.* 53 (21) (2005) 8211–8215.
105. Dos Santos L.F., Bazani Cabral De Melo F.C., Martins Paiva W.J., Borsato D., Corradi Custodio Da Silva M.L., Pedrine Colabone Celligoi M.A., Characterization and optimization of levan production by *Bacillus subtilis natto*. *Rom. Biotechnol. Lett.* 18 (2013) 8413–8422.
106. Lorenzetti M.F.S., Moro M.R., García-Cruz C.H. Alginate/PVA beads for levan production by *Zymomonas mobilis*. *J. Food Process Eng.* 38 (2015) 31–36.
107. Wu F.-C., Chou S.-Z., Shih I.-L. Factors affecting the production and molecular weight of levan of *Bacillus subtilis natto* in batch and fed-batch culture in fermenter. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 44 (2013) 846–853.
108. Shih I. L., Chen L.-D., Wu J.-Y. Levan production using *Bacillus subtilis natto* cells immobilized on alginate. *Carbohydr. Polym.* 82 (2010) 111–117.
109. S. Kalogiannis, G. Iakovidou, M. Liakopoulou-Kyriakides, D.A. Kyriakidis, G.N. Skaracis. Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses. *Process Biochem.* 39 (2003) 249–256.
110. R.M. Banik, A. Santhiagu, S.N. Upadhyay. Optimization of nutrients for gellan gum production by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC-31461 in molasses based medium using response surface methodology. *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 792–797.
111. Maran P. J., Manikandan S., Thirugnanasambandham K., Nivetha V. C., Dinesh R. Box-Behnken design based statistical modeling for ultrasound-assisted extraction of corn silk polysaccharide. *Carbohydr. Polym.* 92 (2013) 604–611.
112. Han H. W. Microbial Levan. *Adv. Appl. Microbiol.* 35 (1990) 171–193.
113. Matulová M., Husárová S., Capek P., Sancelme M., Delort A. M. NMR structural study of fructans produced by *Bacillus sp.* 3B6, bacterium isolated in colud water. *Carbohydr. Res.* 346 (2011) 501–507.

114. Lopez M. G., Mancilla-Margalli N. A., Mendoza-Diaz G. Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. Azul. *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 7835–7840.
115. Lindberg B., Lonngren J., Thompson J. L. Methylation studies on levans. *Acta Chem. Scand.* 27 (1973) 1819–1821.
116. Benigar E., Dogsa I., Stopar D., Jamnik A., Cigić I. K., Tomšič M. Structure and dynamics of a polysaccharide matrix: aqueous solutions of bacterial levan. *Langmuir* 30 (2014) 4172–4182.
117. Han Y. W., Clarke M. A. Production and characterization of microbial levan. *J. Agric. Food Chem.* 38 (1990) 393–396.
118. Tajima K., Uenishi N., Fujiwara M., Erata T., Munekata M., Takai M. The production of a new water-soluble polysaccharide by *Acetobacter xylinum* NCI 1005 and its structural analysis by NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 305 (1997) 117–122.
119. Yoon E. J., Yoo S. H., Cha J., Lee H. G. Effect of levan's branching structure on antitumor activity. *Int. J. Biol. Macromol.* 34 (2004) 191–194.
120. Van Hijum S. A., Bonting K., Van DerMaarel M. J., Dijkhuizen L. Purification of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* strain 121 and characterization of the levan produced. *FEMS Microbiol. Lett.* 205 (2001) 323–328.
121. Bae I. Y., Oh I. K., Lee S., Yoo S. H., Lee H.G. Rheological characterization of levan polysaccharides from *Microbacterium laevaniformans*. *Int. J. Biol. Macromol.* 42 (2008) 10–13.
122. Erkorkmaz B. A., Kırtel O., Duru Ö.A., Öner E.T. Development of a cost-effective production process for *Halomonas* levan. *Bioprocess Biosyst. Eng.* (2018) <https://doi.org/10.1007/s00449-018-1952-x>.
123. Shih I-L., Chen L-D., Wang T-C., Wu J-Y, Liaw K-S. Tandem production of levan and ethanol by microbial fermentation. *Green Chem.* 12 (2010) 1242–1247.
124. Nakapong S., Pichyangkura R., Ito K., Iizuka M., Pongsawasdi P. High expression level of levansucrase from *Bacillus licheniformis* RN-01 and synthesis of levan nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.* 54 (2013) 30–36.

125. Raga-Carbajal E., Carrillo-Nava E., Costas M., Porras-Dominguez J., López-Munguía A., Olvera C. Size product modulation by enzyme concentration reveals two distinct levan elongation mechanisms in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Glycobiology* 26 (2016) 377–385.
126. Tomasic J., Jenning H. J., Glaudemans C. P. J. Evidence for single type of linkage in a fructofuranan from *Lolium perenne*. *Carbohydr. Res.* 62 (1978) 127–433.
127. Jensen S. L., Diemer M. B., Lundmark M., Larsen F. H., Blennow A., Mogensen H. K., Nielsen T. H. Levanase from *Bacillus subtilis* hydrolyses β -2,6 fructosyl bonds in bacterial levans and in grass fructans. *Int. J. Biol. Macromol.* 85 (2016) 514–521.
128. Liu J., Waterhouse A. L., Chatterton N. J. Proton and carbon chemical-shift assignments for 6-kestose and neokestose from two-dimensional n.m.r. measurements. *Carbohydr. Res.* 217 (1991) 43–49.
129. Wang C., Hua D., Yan C. Structural characterization and antioxidant activities of a novel fructan from *Achyranthes bidentata* Blume, a famous medicinal plant in China. *Ind. Crop. Prod.* 70 (2015) 427–434.
130. Chen J., Cheong K. L., Song Z., Shi Y., Huang X. Structure and protective effect on UVB-induced keratinocyte damage of fructan from white garlic. *Carbohydr. Polym.* 92 (2013) 200–205.
131. Hammer H., Morgenlie S. Classification of grass fructans by ^{13}C NMR spectroscopy. *Acta Chem. Scand.* 44 (1990) 158–160.
132. Seymour F. R., Knapp R. D., Zweig J. E., Bishop S. H. C^{13} nuclear magnetic resonance spectra of compounds containing β -D-fructofuranosyl groups or residues. *Carbohydr. Res.* 72 (1979) 57–69.
133. Seymour F. R., Knapp R. D., Jeanes A., Structural analysis of levans by use of ^{13}C NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 72 (1979) 222–228.
134. Poli A., Kazak H., Gürleyendag B., Tommonaro G., Pieretti G., Öner T. E. High level synthesis of levan by a novel *Halomonas species* growing on defined media. *Carbohydr. Polym.* 78. (2009) 651–657.
135. Goldstein I. J., Hay G. W., Lewis B.A., Smith F., In: *Methods in carbohydrate chemistry*. Vol. 5, Academic Press, New York 1965, p. 357.

136. Rankin J. C., Jeanes A. Evaluation of the periodate oxidation method for structural analysis of dextrans. *J. Am. Chem. Soc.* 76 (1954) 4435-4441.
137. Goldstein I. J., Hay G. W., Lewis B.A., Smith F., In: *Methods in carbohydrate chemistry*. Vol. 5, Academic Press, New York 1965, p. 361.
138. <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C102761&Mask=FFFF&Units=SI#Mass-Spec>
139. Bhutto A. A., Vesely D., Gabrys, J. B. Miscibility and interactions in polystyrene with poly(vinyl methyl ether) PVME blends. Part II. FTIR. *Polymer* 44 (2003). 6627–6631.
140. Kaewtatip K., Tanrattanakul, V. Preparation of cassava starch grafted with polystyrene by suspension polymerization. *Carbohydr. Polym.* 73 (4) (2008) 647–655.
141. Janarthanan P., Yunus W. Z. M. W., Ahmad B. M. Thermal behavior and surface morphology studies on polystyrene grafted sago starch. *J. Appl. Polym. Sci.* 90 (2003) 2053–2058.
142. Roghani-Mamaquani H., Khzeri K. A grafting from approach to graft polystyrene chains at the surface of graphene nanolayers by RAFT polymerization: Various graft densities from hydroxyl groups. *Appl. Surf. Sci.* 360 (2016) 373–382.
143. Kekez D. B., Gojgic-Cvijovic D. G., Jakovljevic M. D., Stefanovic Kojic J. R., Markovic D. M., Beskoski P. V., High levan production by *Bacillus licheniformis* NS032 using ammonium chloride as the sole nitrogen source. *Appl. Biochem. Biotech.* 175 (2015) 3068–3083.
144. Noguira R. F., Tavares I. M. Carbon-13 nuclear magnetic resonance investigation of styrene-*a*-methylstyrene copolymers. *J. Appl. Polym. Sci.* 92 (2001) 261–266.
145. Mou J., Li X., Wang H., Fei G., Liu Q. Preparation, characterization, and water resistance of cationic acetylated starch-g-poly(styrene-butyl acrylate) surfactant-free emulsion. *Starch.* 64 (2012) 826–834.
146. Nikolic V., Velickovic S., Popovic A. Amine activators influence on grafting reaction between methacrylic acid and starch. *Carbohydr. Polym.* 88 (2012) 1407–1413.

PRILOZI

Branka D. Lončarević

Biografski podaci

Branka (Dušan) Lončarević rođena je 18. novembra 1988. godine u Sarajevu, Bosna i Hercegovina. Osnovnu školu i gimnaziju je završila u Pančevu. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 2007. godine kao redovan student, a diplomirala u septembru 2012. godine sa prosečnom ocenom 8,13. Master studije na istom fakultetu završila je u septembru 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,20. Iste godine upisala je doktorske studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program doktor biohemijskih nauka i položila sve predviđene ispite sa srednjom ocenom 10,0.

Od 2015. do 2017. godine bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja u oblasti Materijali i hemijske tehnologije. Godine 2014. radila je na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu, a 2017. godine na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, kao saradnik u izvođenju studentskih vežbi. Kao istraživač pripravnik zaposlena je od 2017. godine u Centru za hemiju Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju na projektu III43004 finansiranim od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Bila je učesnik na međunarodnom projektu finansiranim od strane Japanske agencije za međunarodnu saradnju (JICA) i dobitnik je dve stipendije za učešće na konferencijama namenjene mladim istraživačima Federacije evropskih mikrobioloških udruženja (FEMS) i Udruženja za toksikologiju i hemiju životne sredine (SETAC). Jedan je od članova istraživačke grupe dobitnika stipendije „Pokreni se za nauku” kompanije Filip Moris i Centra za razvoj liderstva.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Бранка Лончаревић
Број индекса: ДБ14/2013

Изјављујем


да је докторска дисертација под насловом:

„Оптимизација продукције левана бактерије *Bacillus licheniformis* и примена у синтези кополимера”

- 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, 06.05.2019. године



Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Бранка Лончаревић

Број индекса: ДБ14/2013

Студијски програм: Доктор биохемијских наука

Наслов рада: „Оптимизација продукције левана бактерије *Bacillus licheniformis* и примена у синтези кополимера”

Ментор: др Владимир П. Бешкоски, ванредни професор

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, 06.05.2019. године

Б. Лончаревић

Изјава о коришћењу

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

„Оптимизација продукције левана бактерије *Bacillus licheniformis* и примена у синтези кополимера“

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 – делили под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делили 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, 06.05.2019. године

B. Lončarević

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.