

Univerzitet u Beogradu

Hemijski fakultet

Sanja N. Stojanović

Produkcija i karakterizacija enzima inulinaza
Aspergillus spp. za dobijanje
fruktooligosaharida

Doktorska disertacija

Beograd, 2023

University of Belgrade

Faculty of Chemistry

Sanja N. Stojanović

Production and characterization of inulinase
enzymes from *Aspergillus* spp. for obtaining of
fructooligosaccharides

Doctoral dissertation

Belgrade, 2023

Mentori

dr Zoran Vujčić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu
Hemijski fakultet

dr Biljana Dojnov, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu
Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju
Centar za hemiju

Članovi komisije

dr Marija Gavrović Jankulović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu
Hemijski fakultet

dr Bojan Duduk, naučni savetnik
Institut za pesticide i zaštitu životne sredine
Beograd

Datum odbrane

Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za Biohemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu pod rukovodstvom redovnog profesora dr Zorana Vujčića i dr Biljane Dojnov.

Mentoru dr Zoranu Vujčiću se zahvaljujem na neprocenjivoj pomoći tokom planiranja eksperimenata, njihovoj realizaciji, tumačenju rezultata i uobličavanju ovog rada. Neizmernu zahvalnost mu dugujem na pruženoj prilici da u njegovoj grupi stičem nova znanja i razvijam kreativnost u eksperimentima od prvih istraživačkih koraka. Hvala na strpljenju, beskrajnom razumevanju, podršci i svim pruženim savetima tokom izrade ovog doktorata. Hvala za prepoznavanje mog potencijala i za slobodu u eksperimentima. Veliko hvala na pruženoj prilici da spoznam čari prenošenja znanja mlađim generacijama, gde sam, tokom učenja drugih i sama učila i proširila svoje znanje.

Mentoru dr Biljani Dojnov se zahvaljujem na nesebičnom deljenju svoga znanja, pomoći prilikom planiranja i razvijanja eksperimenata. Hvala za sve duge sate provedene u analiziranju rezultata i njihovom uobličavanju. Hvala na razumevanju i neprocenjivom strpljenju, hvala na podršci i savetima tokom mog učenja, rada u laboratoriji i izradi doktorske disertacije. Hvala za pruženu slobodu i ukazanom poverenju, hvala na svemu što sam naučila u zajedničkom radu.

Zahvaljujem se dr Bojanu Duduku na prilici da stičem znanja u oblasti molekularne biologije, na pomoći tokom rada i pruženom znanju, kao i na korisnim sugestijama i savetima u izradi doktorske disertacije.

Zahvaljujem se dr Mariji Gavrović Jankulović na korisnim sugestijama i pomoći prilikom izrade doktorske disertacije. Zahvaljujem se na pruženom poverenju u moj rad na Katedri za biohemiju, kao i na prijatnoj saradnji svih ovih godina.

Zahvaljujem se dr Jeleni Stepanović sa Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine na pomoći tokom rada i pruženom znanju u oblasti molekularne biologije, kao i na pruženim savetima tokom realizacije doktorske disertacije.

Zahvaljujem se dragim kolegama dr Miroslavi Vujčić, dr Nataši Božić, dr Aleksandri Margetić, dr Barbari Jožef, dr Marineli Šokardi Slavić, ne samo na zajedničkom radu, već i na nesebičnoj pomoći, razumevanju, podršci i divnom druženju tokom proteklih godina.

Zahvaljum se i dragim prijateljicama, Marici, koja me je naučila pažljivom i marljivom radu tokom mojih prvih dana u laboratoriji 483, na pruženim savetima, znanju i podršci, i Milici, sa kojom smo od prvog fakultetskog dana zajedno krenule u avanturu zvanu biohemija, na podršci i dugogodišnjem druženju.

Hvala i mojim dragim studentima, Marini, Nebojši, Mariji i Neveni koji su mi tokom godina postali divni prijatelji. Hvala vam na svakodnevnoj pomoći, podršci, razgovoru i divnom druženju.

Hvala i svim ostalim kolegama koji su u nekom trenutku tokom svih ovih godina, radili u laboratoriji 483, ostavili svoj pečat i doprineli veseloj atmosferi.

Takođe se zahvaljujem i ostalim kolegama sa Hemijskog fakulteta i Centra za hemiju-IHTM.

Veliku zahvalnost dugujem mojim dragim prijateljima, mojoj odabranoj porodici. Megi, Boki, Maco, Anto, Mici, Djoro, hvala vam na bezrezervnom prijateljstvu, hvala vam na svakom razgovoru i druženju, podršci i razumevanju tokom svih ovih godina. Hvala vam na svim zajedničkim trenucima, avanturama i smehu. Hvala vam što ste uvek prisutni.

I naposljetku, hvala mojoj predivnoj porodici, bez svih vas ne bih bila ono što jesam. Hvala vam na neiscrpoj ljubavi i bezrezervnoj podršci, strpljenju i razumevanju. Hvala vam na svakom savetu, čak i kad sam ponekad tvrdoglavo odbijala da ih poslušam. Hvala što ste me bodrili i uvek verovali u mene, čak i u trenucima kad sam sama sumnjala.

Ova disertacija je posvećena vama.

„Produkcija i karakterizacija enzima inulinaza *Aspergillus* spp. za dobijanje fruktooligosaharida“

SAŽETAK

Ova disertacija se bavi ispitivanjem mogućnosti primene izolata gljive roda *Aspergillus* spp. za produkciju enzima inulinaznog kompleksa u cilju dobijanja fruktooligosaharida. Razvijen je brz i pouzdan difuzioni test za detekciju proizvođača inulinaznog kompleksa korišćenog u ispitivanju 39 izolata vrste roda *Aspergillus*, prethodno identifikovanih do nivoa vrste, umnožavanjem *CaM* gena.

Izolati su ispitani na mogućnost produkcije mikotoksina na genetskom nivou umnožavanjem biosintetskih klastera gena za fumonizin i ohratoksin, a analitičkim metodama ispitano je prisustvo mikotoksina u enzimskom preparatu. Ukrštanjem rezultata difuzionog enzimskog testa i mogućnosti produkcije mikotoksina odabran je soj identifikovan kao *Aspergillus welwitschiae* FAW1, koji ne produkuje mikotoksine i potencijalno je dobar proizvođač enzima za dobijanje FOS-ova, što ga čini pogodnim za upotrebu u proizvodnji hrane.

Inulinazni enzimski kompleks je produkovan tokom fermentacije gljive na čvrstoj podlozi upotrebom različitih inducibilnih supstrata (tritikale, jerusalimska artičoka i pšenične mekinje). Svi enzimi su okarakterisani i dobijene su različite aktivnosti u zavisnosti od supstrata: egzoinulinazna – InuE (2,4 U/mL) i endoinulinazna – InuA (34 U/mL) dobijene su na tritikaleu, dok je najveća β -fruktofuranozidazna – FFase (6,3 U/mL) i fruktoziltransferazna – FTase aktivnost dobijena na podlozi sa jerusalimskom artičokom, pšeničnim mekinjama i peptonom. Koprodukcijom inulinaznih enzimskih kompleksa pokazano je da se ista gljiva može koristiti za obe metode dobijanja FOS-ova (FOS_s i FOS_h) u zavisnosti od podloge na kojoj se uzgaja.

Razvijena je nova zimogramska metoda za simultanu detekciju enzima InuA, InuE, FFase nakon jednog elektroforetskog razdvajanja enzima.

Uspešno su prečišćeni glavni enzimi odgovorni za produkciju FOS-ova – InuA za dobijanje FOS_h i FTase za dobijanje FOS_s. Potvrđeno je prisustvo gena *suc1* u genomu *A. welwitschiae* FAW1 koji se smatra odgovornim za ekspresiju enzima FTase i FFase. Dobijeni FOS_s i FOS_h poseduju značajan antioksidativni potencijal što ih čini dobrim kandidatima za dodatak funkcionalnoj hrani.

Ključne reči: inulinaze, jerusalimska artičoka, tritikale, *Aspergillus* spp., *Aspergillus welwitschiae*, mikotoksini, zimogram, fruktooligosaharidi, prebiotici, antioksidativnost

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Biohemija

„Production and characterization of inulinase enzymes from *Aspergillus* spp. for obtaining of fructooligosaccharides“

ABSTRACT

This dissertation examines the possibility of using isolates of *Aspergillus* spp. for the production of the inulinase complex enzyme for obtaining of fructooligosaccharides. A rapid and reliable diffusion test was developed for the detection of the inulinase complex enzyme producers used in the examination of 39 *Aspergillus* spp. isolates from the black aspergilli group, previously identified to the species level, by amplification of the *CaM* gene.

The isolates were examined for the possibility of mycotoxin production on the genetic level by amplifying the biosynthetic gene clusters for fumonisin and ochratoxin. The presence of mycotoxins in the enzyme preparation was examined using analytical methods. By crossing the results of the diffusion enzyme test and the possibility of mycotoxin production, a strain identified as *Aspergillus welwitschiae* FAW1 was selected as a potentially good producer of enzymes for obtaining FOS, which does not produce mycotoxins what makes it safe for use in food production.

The inulinase enzyme complex was produced during the fermentation of the fungi on a different solid inducible substrates (triticale, Jerusalem artichoke and wheat bran). All enzymes were characterized and different activities were obtained depending on the substrate: exoinulinase - InuE (2.4 U/mL) and endoinulinase - InuA (34 U/mL) were obtained on triticale, while the highest β -fructofuranosidase - FFase (6.3 U/mL) and fructosyltransferase - FTase activity were obtained on a medium with Jerusalem artichoke, wheat bran and peptone. The co-production of inulinase enzyme complexes showed that the same fungi can be used for both methods of obtaining FOS (FOS_s and FOS_h), depending on the substrate on which it was grown.

A new zymographic method for the simultaneous detection of enzymes InuA, InuE and FFase after one electrophoretic separation of the enzymes was developed.

The main enzymes responsible for the production of FOS were successfully purified - InuA for obtaining FOS_h and FTase for obtaining FOS_s. The presence of the *suc1* gene in the *A. welwitschiae* FAW1 genome, which is considered responsible for the expression of FTase and FFase enzymes, was confirmed. The obtained FOS_s and FOS_h have significant antioxidant potential, which makes them good candidates for use in functional food.

Keywords: inulinase, Jerusalem artichoke, triticale, *Aspergillus* spp., *Aspergillus welwitschiae*, mycotoxins, zymogram, fructooligosaccharides, prebiotics, antioxidant activity

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Biochemistry

Sadržaj

1.	Uvod	1
2.	Opšti deo	2
2.1	Upotreba filamentoznih gljiva u biotehnologiji	2
2.2	<i>Aspergillus</i> spp. i enzimski kompleksi	2
2.3	Identifikacija gljiva <i>Aspergillus</i> spp.	4
2.3.1	Konstruisanje filogenetskog stabla	5
2.4	Pretraga gljiva potencijalnih proizvođača enzima inulinaznog kompleksa	6
2.5	Mikotoksini filamentoznih gljiva	7
2.6	Produkcija inulinaznih enzima filamentoznim gljivama	7
2.6.1	Produkcija inulinaznih enzima na čvrstim supstratima	8
2.6.2	Upotreba otpadne biomase i prirodnih materijala kao supstrata za produkciju enzima	8
2.6.3	Indukcija inulinaznih enzima	9
2.7	Inulinaze – opis enzima, podela, primena	10
2.7.1	Endoinulinaza (2,1 β -D-fruktan fruktanohidrolaza, EC 3.2.1.7)	11
2.7.2	Egzoinulinaza (β -D-fruktan fruktohidrolaza, EC 3.2.1.80)	12
2.7.3	Invertaza (β -D-fruktofuranozidaza, EC 3.2.1.26)	14
2.7.4	Fruktoziltransferaze (EC 2.4.1.9)	15
2.7.5	Geni koji kodiraju enzime β – fruktofuranozidazu i fruktoziltransferazu	15
2.7.6	Zimogramska detekcija inulinaza	16
2.8	Primena inulinaza	17
2.8.1	Dobijanje etanola iz inulina	17
2.8.2	Produkcija visokokoncentrovanog fruktoznog sirupa iz inulina	18
2.8.3	Produkcija fruktooligosaharida	18
2.8.3.1	<i>In situ</i> produkcija oligosaharida	20
2.8.3.2	Metode za kvantifikaciju fruktooligosaharida	20
2.9	Primena fruktooligosaharida	21
2.9.1	Prebiotici - definicija i uloga	22
2.9.2	Antioksidativnost fruktooligosaharida	23
2.9.2.1	Mehanizmi delovanja antioksidanata	23
2.9.2.2	Metode za određivanje antioksidativnosti	24
2.9.2.2.1	FRAP metoda	24
2.9.2.2.2	DPPH metoda	24
2.9.2.2.3	ABTS metoda	24
2.9.2.2.4	ORAC metoda	25
3	Naši radovi	26
3.1	Odabir potencijalnih proizvođača inulinaza gljiva <i>Aspergillus</i> spp.	26
3.1.1	Izolovanje gljiva roda <i>Aspergillus</i> spp.	26
3.1.2	Identifikacija izolovanih sojeva gljiva roda <i>Aspergillus</i> spp.	28
3.1.3	Razvijanje testa za brzu selekciju gljiva proizvođača inulinaznih enzima	30
3.1.3.1	Potraga za sojevima proizvođačima inulinaznih enzima	30
3.2	Mikotoksini	33
3.2.1	Produkcija enzima i mikotoksina	33
3.2.1.1	HPLC analiza mikotoksina	34
3.2.1.2	Analiza klastera gena mikotoksina	34
3.3	Produkcija enzima odabranim sojem <i>A. welwitschiae</i> FAW1	37
3.3.1	Zimogramska detekcija enzima inulinaznog kompleksa	39
3.4	Upotreba dobijenih enzimskih kompleksa za sintezu fruktooligosaharida	41
3.4.1	Produkcija fruktooligosaharida sintezom iz saharoze	41

3.4.2	Produkcija fruktooligosaharida hidrolizom inulina	42
3.4.3	Optimizacija reakcije sinteze fruktooligosaharida	43
3.4.4	Kvalitativna i kvantitativna analiza sintetisanih fruktooligosaharida	44
3.4.5	<i>In situ</i> produkcija fruktooligosaharida	45
3.4.6	Antioksidativni kapacitet fruktooligosaharida	46
3.5	Produkcija, prečišćavanje i karakterizacija fruktoziltransferaze iz <i>Aspergillus welwitschiae</i> FAW1	47
3.5.1	Prečišćavanje fruktoziltransferaze iz <i>A. welwitschiae</i> FAW1	47
3.5.1.1	Jonoizmenjivačka hromatografija	48
3.5.1.1.1	Zimogramska detekcija endo-, egzoinulinazne i β -fruktofuranozidazne aktivnosti	50
3.5.1.2	Gel hromatografija	51
3.5.2	Produkcija fruktooligosaharida hidrolizom inulina prečišćenom endoinulinazom	54
3.5.3	Biohemijska karakterizacija fruktoziltransferaze	55
3.5.3.1	Određivanje supratne specifičnosti	55
3.5.3.2	Određivanje pH optimuma fruktoziltransferaze	56
3.5.3.3	Određivanje temperaturnog optimuma fruktoziltransferaze	57
3.5.3.4	Određivanje pI vrednosti fruktoziltransferaze	59
3.5.4	Karakterizacija enzima za produkciju fruktooligosaharida na nivou gena	60
3.5.4.1	Analiza sekvencije <i>suc1</i> gena	61
3.5.4.2	Provera ekspresije <i>suc1</i> gena	63
3.6	Zaključci	64
4	Eksperimentalni deo	65
4.1	Odabir potencijalnih proizvođača inulinaza gljiva <i>Aspergillus</i> spp.	65
4.1.1	Izolovanje gljiva roda <i>Aspergillus</i> spp.	65
4.1.2	Identifikacija <i>Aspergillus</i> spp. izolata	65
4.1.2.1	Ekstrakcija DNA	65
4.1.2.2	Umnožavanje <i>CaM</i> gena	66
4.1.2.3	Vizuelizacija produkata PCR reakcije	67
4.1.3	Razvijanje testa za brzu selekciju gljiva proizvođača inulinaznih enzima	68
4.1.3.1	Pretraga sojeva na poliakrilamidnom gelu	68
4.1.3.1.1	Određivanje ukupne inulinazne aktivnosti nakon difuzionog testa	69
4.2	Ispitivanje produkcije mikotoksina	69
4.2.1	Produkcija enzima i mikotoksina	69
4.2.1.1	Priprema podloge za umnožavanje spora	70
4.2.1.2	Zasejavanje spora na mikrobiološkim podlogama	70
4.2.1.3	Produkciona fermentacija	70
4.2.1.4	Ekstrakcija enzimskih kompleksa i mikotoksina iz podloge	70
4.2.1.5	Određivanje koncentracije proteina Bradford-ovom metodom	71
4.2.1.6	Određivanje ukupne inulinazne aktivnosti	71
4.2.2	Analiza mikotoksina na genskom nivou	72
4.2.2.1	Umnožavanje gena za fumonizin (<i>fum</i>)	72
4.2.2.2	Umnožavanje gena za ohratoksin (<i>ota</i>)	73
4.3	Produkcija enzima odabranim sojem <i>A. welwitschiae</i> FAW1	73
4.3.1	Određivanje enzimskih aktivnosti	74
4.3.1.1	Ekstrakcija enzima iz podloge	74
4.3.1.2	Određivanje β -fruktofuranozidazne (invertazne) aktivnosti	74
4.3.1.3	Određivanje egzoinulinazne aktivnosti	75
4.3.1.4	Određivanje endoinulinazne aktivnosti Azofruktanom	75
4.3.2	Zimogramska detekcija enzima inulinaznog kompleksa	76
4.3.2.1	Zimogramska detekcija endoinulinaze	76

4.3.2.2	Zimogramska detekcija β -fruktofuranozidaze (invertaze).....	76
4.3.2.3	Zimogramska detekcija egzoinulinaze	76
4.4	Upotreba dobijenih enzimskih kompleksa za sintezu fruktooligosaharida.....	76
4.4.1	Produkcija fruktooligosaharida sintezom iz saharoze	76
4.4.2	Produkcija fruktooligosaharida hidrolizom inulina.....	77
4.4.3	Optimizacija reakcije sinteze fruktooligosaharida	77
4.4.4	Kvalitativna i kvantitativna analiza sintetisanih fruktooligosaharida.....	78
4.4.4.1	Tankoslojna hromatografija	78
4.4.4.2	Kvantifikacija fruktooligosaharida HPLC metodom.....	78
4.4.4.2.1	Priprema standarda	78
4.4.4.2.2	Priprema fruktooligosaharida.....	78
4.4.4.2.3	HPLC analiza	78
4.4.5	<i>In situ</i> produkcija fruktooligosaharida.....	79
4.4.6	Antioksidativni kapacitet fruktooligosaharida	79
4.4.6.1	ABTS metoda.....	79
4.4.6.2	ORAC metoda	79
4.5	Produkcija, prečišćavanje i karakterizacija fruktoziltransferaze iz <i>Aspergillus welwitschiae</i> FAW1.....	80
4.5.1	Prečišćavanje fruktoziltransferaze iz <i>Aspergillus welwitschiae</i> FAW1	80
4.5.1.1	Dijaliza ekstrakta	80
4.5.1.2	Jonoizmenjivačka hromatografija	80
4.5.1.3	Poliakrilamidna elektroforeza	81
4.5.1.4	Zimogramska detekcija endo-, egzoinulinazne i β -fruktofuranozidazne aktivnosti	82
4.5.1.5	Gel hromatografija.....	83
4.5.2	Produkcija fruktooligosaharida hidrolizom inulina prečišćenom endoinulinazom.....	83
4.5.3	Biohemijska karakterizacija fruktoziltransferaze	83
4.5.3.1	Određivanje supstratne specifičnosti	83
4.5.3.2	Određivanje pH optimuma fruktoziltransferaze.....	84
4.5.3.3	Određivanje temperaturnog optimuma fruktoziltransferaze	84
4.5.3.4	Određivanje pI fruktoziltransferaze izoelektričnim fokusiranjem	84
4.5.4	Karakterizacija enzima za produkciju fruktooligosaharida na nivou gena	85
4.5.4.1	Umnožavanje i analiza sekvencije <i>suc1</i> gena	85
4.5.4.2	Provera ekspresije <i>suc1</i> gena	86
4.5.4.2.1	Izolovanje ukupne RNA	86
4.5.4.2.2	Tretiranje izolovane RNA DNazom.....	86
4.5.4.2.3	RT PCR reakcija umnožavanja dela <i>suc1</i> gena.....	86
5.	Literatura.....	88

Lista skraćenica

BSA – goveđi serum albumin (od *eng.* bovine serum albumine)
AA – akrilamid
CBB – Coomassie Brilliant Blue
DNS – dinitrosalicilni reagens
EDTA – Etilen-diamin-tetraacetatna kiselina
FFase – β -fruktofuranozidaza/invertaza
FTase – β -fruktoziltransferaza
IEF – izoelektrično fokusiranje
IEX – jonoizmenjivačka hromatografija
InuA – endoinulinaza
InuE – egzoinulinaza
PDA – krompir dekstrozni agar (od *eng.* potato dextrose agar)
SSF – fermentacija na čvrstoj podlozi (od *eng.* solid-state fermentation)
SmF – tečna fermentacija (od *eng.* submerge fermentation)
DP – stepen polimerizacije (od *eng.* degree of polymerization)
HPLC – tečna hromatografija pod visokim pritiskom (od *eng.* high-performance liquid chromatography)
TLC – tankoslojna hromatografija (od *eng.* thin layer chromatography)
FPLC – tečna hromatografija proteina pod visokim pritiskom (od *eng.* fast protein liquid chromatography)
GH – glikozid-hidrolaze
GT – glukozil-transferaze
PCR – lančana reakcija polimeraze (od *eng.* polymerase chain reaction)
CTAB – cetiltrimetil-amonijum-bromid
SDS – natrijum-dodecilsulfat (od *eng.* sodium dodecil sulphate)
PAGE – poliakrilamidna gel elektroforeza
PAA – poliakrilamid
PAG – poliakrilamidni gel
PVDF – poliviniliden-difluorid
TRIS – tris (hidroksimetil)aminometan
TE – Tris-EDTA pufer
TBE – Tris-boradni EDTA pufer
TEMED – N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamin
OS – oligosaharidi
FOS – fruktooligosaharidi
FOS_s – fruktooligosaharidi nastali sintezom
FOS_h – fruktooligosaharidi nastali hidrolizom
ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)
DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
APS – amonijum-persulfat
AAPH – 2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihidrohlorid
DMSO – dimetil-sulfoksid
NBT – nitroblue tetrazolium
OTA – ohratoksin
FB – fumonizin

1. Uvod

Primena mikroorganizama u industriji ili u proizvodnji brojnih komercijalnih proizvoda korisnih za čoveka ima značajnu ulogu i sve veći značaj u svetu. Poznato je da filamentozne gljive, *Aspergillus* spp., *Trichoderma* spp., *Rhizopus* spp., daju industrijski važne hidrolitičke enzime (amilaze, celulaze, ksilanaze, pektinaze, proteaze, inulinaze), koje proizvode u vidu enzimskih kompleksa i zahvaljujući toj sposobnosti imaju značajnu primenu u biotehnološkim procesima [1,2]. Potraga za novim potencijalnim proizvođačima enzima među gljivama često obuhvata nekoliko faza koje podrazumevaju dug period rasta gljiva kao i komplikovanu detekciju produkovanih enzima, stoga bi pronalazak odgovarajuće metode za selekciju među velikim brojem izolata skratio vreme pretrage.

Gljive roda *Aspergillus* sekcija *Nigri* sastoji se od velikog broja vrsta, koje odlikuje mogućnost produkcije proteina i sekundarnih metabolita, koji se često koriste u biotehnologiji i prehrambenoj tehnologiji [3]. Iako je FDA dozvolila primenu nekih industrijskih sojeva *Aspergillus* vrste u industriji hrane, kod svih novoizolovanih sojeva ključnu ulogu ima identifikacija soja na molekularnom nivou kao i ispitivanje mogućnosti sinteze mikotoksina, kako bi se zadovoljio visok standard bezbednosti, jer samo sojevi koji ne proizvode mikotoksine mogu se koristiti u proizvodnji enzima čija je primena u prehrambenoj industriji [4]. Gljive roda *Aspergillus* predstavljaju jedan od najboljih proizvođača inulinaza s obzirom na to da imaju sposobnost produkcije kompleksa enzima koji imaju ulogu u dobijanju fruktooligosaharida (FOS) [5–8]. Aktuelna su istraživanja na poboljšanju proizvodnje pomenutih enzima, karakterizaciji novih inulinaza (pronađenih u novim mikroorganizmima), kloniranju i ekspresiji inulinaznih gena, kao i na unapređenju primene inulinaza za dobijanje fruktooligosaharida.

Produkcione fermentacije filamentoznim gljivama se najčešće odvijaju na čvrstim supstratima (SSF - od *eng.* solid state fermentation). Ova metoda ima nekoliko ekonomskih i praktičnih prednosti kao i pozitivan uticaj na zaštitu životne sredine posebno ako se uzme u obzir da omogućava ponovno korišćenje agro-industrijskog otpada kao supstrata za produkciju enzima, smanjuje zagađenje zemljišta i nastanak otpadnih voda, što ukazuje na veću isplativost procesa [9].

Enzimi koji imaju ulogu u hidrolizi inulina pripadaju kompleksu inulinaza i predstavljaju jednu od važnih klasa industrijskih enzima [3]. Dele se na dve podklase: endoinulinaze InuA, koje hidrolizuju unutrašnje veze u lancu inulina i egzoinulinaze InuE koje katalizuju reakciju hidrolize terminalne fruktoze sa neredukujućeg kraja inulina (FOS_h) [10,11]. Treću klasu inulinaza čine enzimi β -fruktofuranozidaze i/ili fruktoziltransferaza koji učestvuju u dobijanju fruktooligosaharida (FOS_s) tokom reakcije transfruktozilacije koristeći saharozu kao supstrat [12].

Primena FOS-ova kao prebiotika je široka: hrana i piće (cerealije, hleb, peciva, kolači, fermentisano meso, suva hrana), kao suplementi u dnevnoj ishrani (hrana, dečije formule), dodatak životinjskoj hrani. Studije su pokazale da FOS-ovi imaju sposobnost povećanja apsorpcije magnezijuma, smanjuju mogućnost nastanka raka debelog creva i stimulišu povećanje laktata i kratkolančanih masnih kiselina (acetat, propionat, butirat) i pozitivno deluju na imuni sistem [13,14].

Upotreba inulinaznog enzimskog kompleksa u proizvodnji FOS-ova bez prethodnog prečišćavanja pojedinačnih enzima je izazov u naučnom i praktičnom smislu jer može predstavljati prednost u odnosu na uobičajenu praksu gde se koriste pojedinačni enzimi, naročito kad se uzme u obzir da se oni najčešće eksprimiraju i proizvode zajedno.

2. Opšti deo

2.1 Upotreba filamentoznih gljiva u biotehnologiji

Biotehnologija ima značajnu ulogu i sve veći značaj u svetu. Predstavlja upotrebu mikroorganizama i ćelija izolovanih iz biljaka ili životinja, a zahvaljujući njihovom metabolizmu i biosintetičkim sposobnostima omogućeno je dobijanje specifičnih supstanci i jedinjenja koja su važna za život čoveka. Industrijska mikrobiologija, kao jedna od disciplina biotehnologije, koristi mikroorganizme u cilju izvođenja važnih hemijskih transformacija u industriji ili u proizvodnji brojnih komercijalnih proizvoda korisnih za čoveka. Početke industrijske mikrobiologije predstavljaju alkoholne fermentacije (npr. dobijanje piva i vina), a vremenom su razvijene tehnike za proizvodnju lekova (kao što su antibiotici), aditiva hrane (aminokiseline i začinsko sirće), enzima, hemikalija (kao što su etanol i limunska kiselina) i samih ćelija mikroorganizama, kao i tehnike za biotransformaciju steroida [15].

Poznato je da filamentozne gljive, *Aspergillus* spp., *Trichoderma* spp., *Rhizopus* spp., daju industrijski važne enzime i metabolite i zahvaljujući toj sposobnosti imaju značajnu primenu u biotehnološkim procesima [1,2]. U takve enzime spadaju hidrolitički enzimi (amilaze, celulaze, ksilanaze, pektinaze, proteaze, inulinaze), koje gljive proizvode tokom fermentacije u vidu enzimskih kompleksa. Pored gljiva određeni sojevi kvasaca među kojima su *Pichia* spp., *Kluyveromyces fragilis*, *Cryptococcus aureus*, *Kluyveromyces marxianus* takođe imaju visok potencijal za proizvodnju enzima sa prinosom na industrijskom nivou [16,17].

Mikroorganizmi su najpogodniji izvor za dobijanje komercijalnih inulinaza zbog jednostavnog gajenja i velikog prinosa enzima. Do sada je pronađen veliki broj mikroorganizama koji mogu da proizvode ove enzime, a neki od njih su vrste rodova *Aspergillus*, *Penicillium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Staphylococcus*, *Xanthomonas*, *Kluyveromyces*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Sporotrichum*, *Candida* [18,19]. Pandey et al., kao i mnogi naučnici nakon njih, uradili su veoma detaljnu analizu mikrobnih inulinaza, njihovu produkciju, osobine i industrijsku primenu [1].

Zapaža se veliki napredak u poboljšanju proizvodnje inulinaza, karakterizaciji novih inulinaza (pronađenih u novim mikroorganizmima), radi se na kloniranju i ekspresiji inulinaznih gena, kao i na unapređenju primene inulinaza za dobijanje bioetanola, inuloooligosaharida, fruktooligosaharida i visokokoncentrovanog fruktoznog sirupa. Svi navedeni proizvodi su široke primene, što objašnjava i potrebu intenzivnih istraživanja inulinaza čija upotreba u potpunosti zadovoljava standarde zaštite životne sredine.

Posebno mesto među proizvođačima inulinaza zauzimaju filamentozne gljive roda *Aspergillus* kao što su *A. niger*, *A. welwitschiae*, *A. oryzae* i *A. ficuum* [20,21]

2.2 *Aspergillus* spp. i enzimski kompleksi

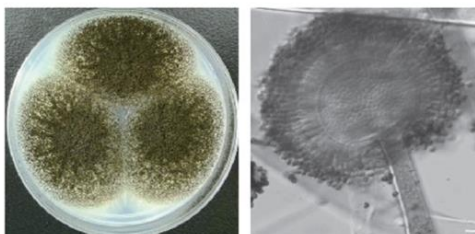
Gljive roda *Aspergillus* pripadaju haploidnim filamentoznim gljivama razdela Ascomycota, familije Aspergillaceae. Podeljene su u 4 podroda (*Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati* i *Nidulantes*) i 20 sekcija [22]. Rastu u aerobnim uslovima na organskim podlogama kao što je biljni materijal koji je u stanju raspadanja, a pošto su uobičajen član mikrobnih zajednica koje pronalazimo u zemljištu imaju i značajnu ulogu u ciklusu kruženja ugljenika [23].

Stvaraju kolonije koje mogu biti različite boje. Micelija je hijalinska do svetlo pigmentisana i septirana. Kolonije brzo rastu i odlikuju se obilnom sporulacijom. Boja formiranih spora varira od tamnih crnih do svetlo zelene boje u zavisnosti od gljive [15,24]. Rastu u širokom opsegu pH vrednosti (pH 1.4 - 9.8) i temperature (6 – 47 °C), a ovakve osobine uz sposobnost produkcije konidiospora koje se šire vazduhom, omogućavaju opstanak vrste u hladnim i vlažnim uslovima [23,24]. Neki predstavnici roda *Aspergillus* su prikazani na slici 1.

A. niger



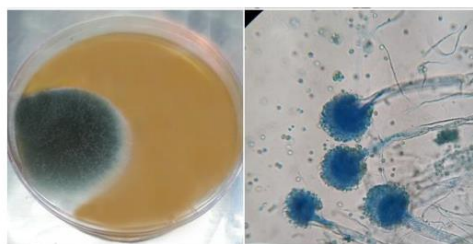
A. welwitschiae



A. flavus



A. fumigatus



A. carbonarius



Slika 1. Gljive roda *Aspergillus*; izgled kolonija i mikroskopski izgled hifa sa sporangijama (preuzeto i prilagođeno iz [25,26])

Gljive roda *Aspergillus* sekcija *Nigri* sastoji se od velikog broja vrsta, koje odlikuje mogućnost produkcije proteina i sekundarnih metabolita, koji se često koriste u biotehnologiji i prehrambenoj tehnologiji. Najčešća i najvažnija vrsta koja se koristi u industriji i ima dugu istoriju upotrebe u proizvodnji enzima je *Aspergillus niger* [3]. Prvo se koristio kao proizvođač limunske kiseline. *A. niger* služio je za dobijanje glukonske i fumarne kiseline, a sada se sve više koristi za dobijanje različitih enzima koji se primenjuju i u industriji hrane. Njegova upotreba u industriji hrane odobrena je od strane FDA (Food and Drug Administration of the United States of America).

Pektinaze, proteaze i amiloglukozidaze su enzimi koji su prvi dobijeni gajenjem ove gljive. Usavršavanjem tehnologije i procesa za dobijanje enzima koje proizvode gljive izolovano je još nekoliko enzima među kojima su celulaze i hemicelulaze [27]. Gljive roda *Aspergillus* predstavljaju

jedan od najboljih producera inulinaza s obzirom na to da imaju sposobnost produkcije kompleksa enzima koji imaju ulogu u dobijanju fruktooligosaharida (FOS) [5–8]. Istraživanja su pokazala da upravo sojevi vrste roda *Aspergillus* kao što su *A. niger*, *A. welwitschiae*, *A. japonicus* produkuju enzime inulinaznog kompleksa i imaju veliku primenu u razgradnji inulina [5–8,28].

Iako je FDA dozvolila primenu u industriji hrane brojnih industrijskih sojeva vrste roda *Aspergillus*, bilo u vidu celih ćelija, enzima ili drugih metabolita koje produkuju, kod svih novoizolovanih sojeva ključnu ulogu ima identifikacija soja na molekularnom nivou kao i ispitivanje mogućnosti sinteze mikotoksina, s obzirom da neke vrste (*A. niger*, *A. welwitschiae*, *A. flavus*) u određenim uslovima gajenja mogu proizvoditi mikotoksine, ili se smatraju parazitima (*A. parasiticus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*), dok su se drugi sojevi (*A. tubingensis*, *A. oryzae*, *A. sojae*) pokazali kao bezbedni za upotrebu u industriji [29–32].

Nekoliko zabeleženih medicinskih slučajeva jesu infekcija uha i infekcija pluća, ali se obično javlja kod pacijenata sa oslabljenim imunim sistemom usled bolesti ili korišćenja imunosupresivnih lekova [23]. Zato je pri odabiru potencijalnih producera inulinaznih enzima među izolatima iz prirodnih staništa neophodna njihova pravilna identifikacija.

2.3 Identifikacija gljiva *Aspergillus* spp.

Ranije su izolati gljiva roda *Aspergillus* identifikovani na osnovu morfoloških karakteristika. U okviru ove sekcije uočena je varijabilnost, zbog čega je klasifikacija i identifikacija vrsta sekcije *Nigri* revidirana nekoliko puta [33]. Uvođenje sveobuhvatnog pristupa koji obuhvata ispitivanje molekularnih, morfoloških, fizioloških i biohemijskih karakteristika čini osnovu savremene identifikacije gljiva roda *Aspergillus* [22].

Molekularne analize koje obuhvataju analizu različitih delova genoma postale su nezaobilazne u identifikaciji i taksonomiji gljiva [22,34,35]. Ispitivanja molekularnih karakteristika doprinela su pouzdanoj identifikaciji različitih vrsta gljiva, ali su i otkrile i veliki broj skrivenih ili kriptičnih vrsta gljiva [22,36,37].

Kao primarni barkod region za identifikaciju gljiva je ITS region ribozomalne DNA [38]. Geni koji kodiraju ribozomalnu RNA prisutni su u svim organizmima u velikom broju kopija. U nuklearnoj ribozomalnoj DNA kod gljiva postoje tri gena koji kodiraju 28S (veliku subjedinicu), 18S (malu subjedinicu) i 5.8S subjedinice, a međusobno su odvojeni sa dva intergenska regiona (ITS1 i ITS2). Rezultati sekvenciranja ITS regiona pokazuju da sadrži od 450 do 700 bp, da poseduje konzervativni deo i visoko varijabilne delove sekvencije, kao i da se ponavlja više od 250 puta što ovaj region čini dobrim kandidatom za primenu u identifikaciji velikog broja različitih vrsta. Kod vrsta roda *Aspergillus* ITS region je jedan od regiona koji se koristi u njihovoj identifikaciji. Međutim on je pouzdan u identifikaciji nekih vrsta ovog roda, ali se na osnovu njega ne mogu razdvojiti neke bliske vrste. Zbog toga je u identifikaciji *Aspergillus* spp. uveden sekundarni barkod region – gen za kalmodulin (*CaM*). Pored ovog gena u identifikaciji vrsta se koriste i gen za β -tubulin (*BenA*) i druga po veličini subjedinica RNA polimeraze II (*RPB2*) [22]. *RPB2* nije lako umnožiti, što njegovu upotrebu kao sekundarnog identifikacionog markera čini vrlo komplikovanom. Nasuprot tome, *BenA* je lako umnožiti, ali je prijavljeno da varira u broju introna i da se PCR tehnikom ponekad amplifikuju paralogni geni [39,40]. S druge strane, kada je u pitanju *CaM* marker, on se lako umnožava i razlikuje se između svih *Aspergillus* vrsta. Pored toga postoji baza podataka mnogobrojnih identifikovanih sojeva koja sadrži *CaM* sekvencije, što je još jedan od razloga zašto se preporučuje korišćenje upravo ovog identifikacionog markera kod *Aspergillus* vrste [22].

Karakteristike kolonije koje se koriste za karakterizaciju vrsta uključuju veliki broj različitih osobina (stopa rasta kolonije, tekstura, stepen sporulacije, prisustvo sklerocija ili kleistotecije, boja micelije, rastvorljivi pigmenti, eksudat, naličje kolonija i Hulle-ćelije) [22].

2.3.1 Konstruisanje filogenetskog stabla

Linije unutar stabla se nazivaju grane, a tačke sa kojima su grane povezane predstavljaju čvorove. Spoljašnji čvorovi predstavljaju postojeće taksonе (familije organizama ili individua od jedne ili od više različitih vrsta) i zovu se operativna taksonomska jedinica (od *eng.* operational taxonomic units – OTUs), dok su unutrašnji čvorovi, hipotetičke taksonomske jedinice (od *eng.* hypothetical taxonomic units- HTUs) i predstavljaju pretke taksona. Grupa taksona, koja deli istu granu čini klaster i potiče od istog pretka (monofiletičko poreklo), dok organizmi koji ne mogu da formiraju klaster bez uključenja dodatnih sojeva i nemaju istog pretka imaju parafiletičko poreklo. Grupa predaka zajedno sa svim potomcima naziva se klada (od *eng.* clade), slika 2 [42].



Za filogenetsku analizu homologa mesta se porede međusobno nakon poravnanja „alignment“ [42]. U tu srhu se koriste programi kao što je MEGA X koji imaju implementirane algoritme kao što je Clustal X [44][45]. Prikupljene informacije o sekvencijama deponuju se u različitim bazama podataka na pr. NCBI (National Center for Biotechnology Information), Traženje

homologih sekvencija, baziranih na rezultatima sličnosti, može biti urađeno pretragom u različitim bankama i servisima kao što je primer sa NCBI blast [<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>].

Za konstrukciju filogenetskog stabla se koristi nekoliko metoda. Korišćenjem metoda (character based) „Maximum parsimony method (MP)“ i „Maximum likelihood method (ML)“ se dobijaju precizni podaci za identifikaciju gljiva. Cilj MP metode je identifikacija najmanje neophodnih promena kako bi se objasnile razlike između posmatranih sekvencija koje filogenija zahteva. Prednost metode ogleda se u brzini analize stotine sekvencija, dok je nedostatak manja preciznost u slučajevima velikih varijacija u dužini grana [42,46,47]. ML metoda omogućava da se na određenom filogenetskom stablu prikaže potencijalni model evolucije datih sekvencija. Odlikuje se intenzivnom analizom tokom koje se razmatraju sva moguća filogenetska stabla. S obzirom na to da se može izabrati model evolucije, metoda može biti korisna za široko divergentne grupe. Prednost ove metode je što se mogu dobiti podaci o kompletnoj filogeniji u prikazanom modelu, iako je sam proces spor [42,47]. Obe opisane metode implementirane su u program MEGA X.

Izolovane sojeve gljiva *Aspergillus*, potencijalne producere inulinaza, pored identifikacije do nivoa vrste dalje treba okarakterisati u smislu potentnosti produkcije enzima. Iz tog razloga javlja se potreba za razvojem testova koji podrazumevaju brzu pretragu gljiva proizvođača inulinaza.

2.4 Pretraga gljiva potencijalnih proizvođača enzima inulinaznog kompleksa

Potruga za potencijalnim proizvođačima enzima među gljivama često obuhvata nekoliko faza od kojih je prva izolovanje gljiva iz različitih prirodnih staništa, zatim gajenje na indukujućim supstratima pri uslovima pogodnim za rast gljive, a nakon toga određivanje enzimske aktivnosti u dobijenim fermentacionim tečnostima i/ili ekstraktima zbog čega ovaj proces traje dugo i analizira se mali broj izolata gljiva [7,48].

Drugi pristup se zasniva na direktnoj selekciji tokom rasta gljiva na indukujućem supstratu – inulinu kao jednim izvoru ugljenika (*in situ*). Uspešnost rasta gljive na inulinu podrazumeva da gljiva poseduje i enzime koji hidrolizuju supstrat iz podloge te može da se prati rast kolonija i veličina formiranog micelijuma [49]. Drugi način detekcije je bojenje inulina nakon rasta gljiva gde se na mestima gde je inulin hidrolizovan pojavljuje prosvetljenje (neobojena zona) [50].

Oba pristupa za odabir dobrog proizvođača inulinaza podrazumevaju dug period rasta gljiva, stoga bi pronalazak odgovarajuće metode za selekciju među velikim brojem izolata skratio vreme pretrage. Sporulacija se kod gljiva roda *Aspergillus* ponekad javlja u roku od 48 sati te bi produkcija enzima tokom pretrage trebalo da traje što je kraće moguće. Kratko vreme produkcione fermentacije je veoma važno i da se dobije brz odgovor, ali i da se izbegne sporulacija, koja je nepoželjna kada se radi sa velikim brojem sojeva gljiva iz nekoliko razloga: moguće unakrsne kontaminacije, bezbednosti onih koji obavljaju posao i mogućih lažnih rezultata u produkciji enzima usled pojave sledeće generacije hifa.

Za određivanje enzimske aktivnosti većeg broja uzoraka u fermentacionim ekstraktima nakon gajenja gljiva odavno je razvijen difuzioni test na agaroznim gelovima sa inkorporiranim supstratom [51]. Mana ovog testa je upotreba agaroznog gela koji je nezgodan za rukovanje zbog svoje mekane strukture. Enzimi se nanose na površinu gela preko filter papira što ograničava njihovu difuziju do supstrata dok proizvodi reakcije nekontrolisano difunduju kroz agaroznu trodimenzionalnu mrežu [51,52].

Metode koje podrazumevaju bojenje supstrata na kome gljive rastu detektuje samo endoinulinazu [50]. Međutim, oba enzima inulinaznog kompleksa su industrijski važna za dobijanje inulooligosaharida i fruktooligosaharida i obično su oba prisutna u genomu gljiva [53]. Stoga, postoji potreba za razvijanjem difuzionog testa koji bi detektovao aktivnost svih enzima inulinaznog kompleksa (endoinulinaze i egzoinulinaze).

Nije dovoljno da gljiva bude samo dobar proizvođač enzima koji se koriste u industriji hrane, već je neophodno da zadovolji i visok standard bezbednosti. Samo sojevi koji ne proizvode mikotoksine mogu se koristiti u proizvodnji enzima čija je primena u prehrambenoj industriji [4]. Zbog toga, nakon identifikacije novoizolovanih crnih *Aspergillus* vrsta i ispitivanja mogućnosti produkcije enzima i pronalaska najboljeg proizvođača, sledeći i možda najvažniji korak, je procena mogućnosti biosinteze mikotoksina u određenim uslovima rasta, ali i potencijal za njihovu proizvodnju na genetskom nivou.

2.5 Mikotoksini filamentoznih gljiva

Pored povoljnog i velikog ekonomskog značaja vrsta roda *Aspergillus*, neke vrste imaju mogućnost produkcije mikotoksina što umanjuje njihovu upotrebu u biotehnologiji, naročito u industriji hrani. Mikotoksini su sekundarni metaboliti male molekulske mase koje proizvode filamentozne gljive i koji kada se unesu oralno, udisanjem ili preko kože ispoljavaju akutno ili hronično toksično dejstvo prema ljudima i kičmenjacima [30]. Ispitivanje prisustva mikotoksina predstavlja važan deo tokom skladištenja hrane [54] kao i u biotehnologiji jer predstavljaju bezbednosni problem u industrijskoj primeni gljiva za proizvodnju enzima ili metabolita. Dugo se *A. niger* smatrao netoksičnim u industrijskim uslovima i zbog toga je generalno priznat kao bezbedan (GRAS) [32]. Iako je to slučaj sa nekim od industrijskih sojeva, svaki novootkriveni prirodni izolat koji se identifikuje kao *A. niger* se smatra biološkim agensom klase 2 zbog svog potencijala da proizvodi mikotoksine i izaziva bolesti kod ljudi i životinja (BAUA)[30,55].

Glavni mikotoksini koje proizvodi *A. niger* i njegove blisko srodne vrste *A. welwitschiae* su ohratoksin A (OTA) i fumonizini (FB) [30,31,55], koji su klasifikovani kao mogući kancerogeni za ljude (Grupa 2B) od strane IARC-a (od eng. International Agency for Research on Cancer) [56]. Dugo vremena vrste *Fusarium* su bile poznate kao proizvođači fumonizina [57], sve dok sekvenciranje celog genoma *A. niger* 2006. godine i otkriće klastera *fum* gena nije ukazalo i na njegov potencijal da proizvodi fumonizine [53,58]. Dokazana je proizvodnja fumonizina i kod nekih sojeva *A. niger* izolovanih iz zrna kafe koji su imali primenu u industriji [59–61], kao i od nekih sojeva koji pripadaju *A. welwitschiae* vrsti [62].

Međutim, ne proizvode svi izolati ovih vrsta mikotoksine. Potencijal za njihovu sintezu je genetski kodiran klasterima biosintetičkih gena fumonizina i ohratoksina [63,64]. Zbog toga nije dovoljno utvrditi da li gljiva koja proizvodi enzime sintetizuje i opasne mikotoksine u određenim uslovima rasta, već bi bilo dobro ispitati i da li postoji mogućnost za njihovu proizvodnju na genetskom nivou. Ukoliko se utvrdi da postoji mogućnost produkcije mikotoksina, takvi sojevi se mogu koristiti za dobijanje enzima ukoliko se genetskim tehnikama izbriše ili zaključa gen odgovoran za sintezu mikotoksina [30,64].

Kada se potencijalni proizvođač potvrdi kao pogodan za produkciju enzima, a da pri tom ne dolazi do biosinteze mikotoksina, ni u jednom koraku gajenja gljive, može se pristupiti sledećoj fazi, koja podrazumeva optimizaciju uslova gajenja gljive (temperatura, vreme gajenja, sastav podloge) i produkciju enzimskih kompleksa.

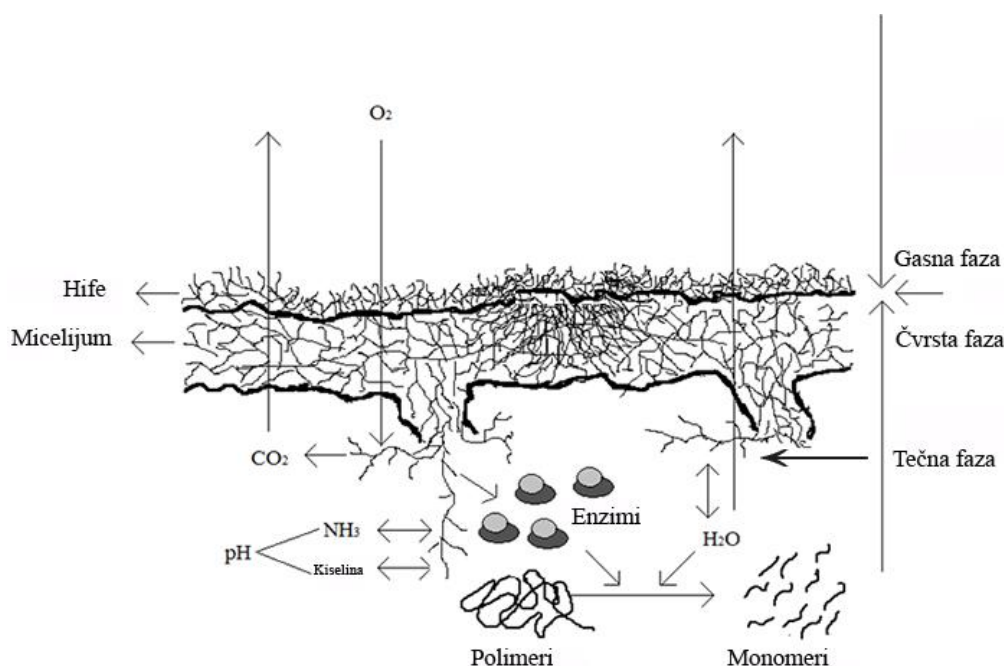
2.6 Produkcija inulinaznih enzima filamentoznim gljivama

Produkcione fermentacije filamentoznim gljivama se mogu odvijati u tečnim kulturama (SmF – od eng. submerged fermentation) i na čvrstim supstratima (SSF - od eng. solid state fermentation). SSF metoda poslednjih godina privlači sve više pažnje zbog nekoliko ekonomskih i praktičnih prednosti koje poseduje u odnosu na SmF. SmF je proces u kome mikroorganizmi rastu u tečnom medijumu sa velikom količinom slobodne vode. Prednosti ove fermentacije ogledaju se u novorazvijenim i modernim fermentorima, ali i dobroj kontroli procesa (kontrola pH, rastvorenog kiseonika, temperature, koncentracije molekula rastvornih u vodi), lakom odvajanju biomase nakon fermentacije, mešanja, aeraciji [9].

Fermentacija na čvrstom supstratu je metoda koja podrazumeva gajenje mikroorganizma sa veoma malom količinom slobodne vode [9]. Prednosti uključuju jednostavnost opreme za gajenje mikroba, smanjen prinos otpadnih voda, veću koncentraciju dobijenog proizvoda, mala početna ulaganja [65].

2.6.1 Produkcija inulinaznih enzima na čvrstim supstratima

Prirodna potreba gljiva roda *Aspergillus* je, kao i ostalih filamentoznih gljiva, da rastu pričvršćene za čvrstu površinu. U prirodnim uslovima filamentozne gljive nastanjuju vlažna lignocelulozna staništa gde u kontaktu gljive i čvrste površine preuzimaju nutrijente i ujedno je omogućen apikalni rast hifa [15]. Ova osobina je iskorišćena u industrijskim fermentacionim procesima kao što je fermentacija na čvrstoj podlozi (SSF) [27], s obzirom na to da SSF imitira uslove u kojima se one prirodno nalaze [9]. Shematski prikaz SSF-a je dat na slici 3.



Slika 3. Shematski prikaz fermentacije filamentoznih gljiva na čvrstoj podlozi (SSF) (preuzeto i prilagođeno iz [66])

SSF ima pozitivan uticaj na zaštitu životne sredine posebno ako se uzme u obzir da omogućava ponovno korišćenje agro-industrijskog otpada kao supstrata za produkciju enzima, smanjuje zagađenje zemljišta i nastanak otpadnih voda, što ukazuje na veću isplativost procesa [9]. Dobijanje novih vrednih proizvoda iz otpadne biomase je danas veoma aktuelna grana biotehnologije, a tu spada i dobijanje enzima SSF-om upravo na ovakvim supstratima.

2.6.2 Upotreba otpadne biomase i prirodnih materijala kao supstrata za produkciju enzima

Nepravilno odlaganje čvrstih otpadnih biomasa dovodi do različitih zagađenja, kao što je zagađenje zemljišta, vazduha i voda. Iako se koriste hemijski tretmani za razgradnju čvrstog otpada, poslednjih godina se ističe potreba za razvojem i unapređenjem metoda bioprocesovanja kao ekološki prihvatljivog načina uklanjanja istog [65].

Na tom polju gljive su se pokazale kao najbolji mikrobiološki organizmi koji su u stanju da razgrade kompleksna organska jedinjenja koristeći ih kao izvor energije tokom svog rasta. Agroindustrijski materijal i otpadni materijali takođe predstavljaju i inducibilne supstrate u produkciji enzima s obzirom na to da se uglavnom sastoje od složenih ugljenih hidrata i sirovih proteina [9,67,68].

Kako je svaki region širom sveta razvio različite poljoprivredne sektore, samim tim je generisan različit agrootpad. Kao posledica toga pojavio se veliki izbor novih alternativnih izvora hranljivih materija za gajenje gljiva kao i za direktno dobijanje novih visokovrednih proizvoda. Raznovrsni agroindustrijski otpad ima ulogu u produkciji FOS-ova i u produkciji enzima koji imaju ulogu u dobijaju FOS-ova [69].

Pšenične mekinje kao jeftin nusproizvod mlinске industrije, proizveden u velikoj količini, a koji se uglavnom sastoji od lignoceluloze, skroba i hemiceluloze, pronašle su ulogu indukujućeg supstrata u produkciji β -D-fruktofuranozidaze tokom gajenja *Aspergillus caespitosus* [70] i *Fusarium graminearum* [71]. *Aspergillus awamori* je gajen na agrootpadu koji se sastojao od klipa kukuruza, pšeničnih mekinja i pirinčanih mekinja u cilju produkcije FTase i FOS-ova [72].

Tritikale (*x Triticosecale*, Vittmack) je još uvek nedovoljno iskorišćena žitarica za koju se pokazalo da predstavlja dobar izvor hranljivih materija i dobar SSF supstrat za rast gljiva i proizvodnju enzima [67,73]. Uzgoj tritikalea ima mnogobrojne prednosti u poređenju sa drugim kulturama - visok prinos zrna u širokom spektru zemljišta (posebno otporan na niske pH) i klimatskim uslovima, sa prinosima od 3 do 6 t/ha u zavisnosti od geografskog regiona [74]. Gaji se i u Srbiji i daje visoke prinose [75] posebno u regionu kod Valjeva. Tritikale sadrži visoke količine skroba (oko 60%) i proteina (od 12 do 15%) [74]. Sadrži veće količine glavnih mineralnih elemenata (K, P i Mg) i nutritivno važnih sporednih elemenata (Na, Mn, Fe, Cu i Zn) od pšenice [76]. Tritikale je jeftiniji od drugih useva žitarica, malo se koristi se u ljudskoj ishrani, a dobijen otpad nakon produkcione fermentacije bi se mogao koristiti kao dobro izbalansirana stočna hrana.

Maksimalna produkcija enzima može se postići podešavanjem uslova fermentacije (temperatura, pH medijuma, aeracija) i korišćenjem odgovarajućih supstrata koji povećavaju (indukuju) sintezu enzima. Na primer, poznato je da su α – amilaza i glukoamilaza inducibilni enzimi u *Aspergillus* spp, a glavni indukujući supstrat je skrob i produkti njegove hidrolize, pre svega maltoza [67,77]. Analognom logikom je jerusalimska artičoka, kao prirodni izvor inulina [78], korišćena kao indukujući supstrat u produkciji inulinaznog kompleksa gljiva [79].

2.6.3 Indukcija inulinaznih enzima

U prirodnim staništima mikroorganizmi regulišu enzimsku produkciju u cilju što većeg i boljeg iskorišćavanja dostupnog izvora ugljenika [80]. Krajnji cilj industrije je razvoj i upotreba prirodnih mikroorganizama koji imaju mogućnost produkcije određenih enzima sa visokim prinosom i dobrom aktivnosti.

Veliki broj istraživanja je fokusiran na optimizaciju medijuma za gajenje i radnih parametara, kao što su pH, temperatura, mešanje i aeracija [81,82]. Ali jedan od važnih parametara koji se mora uzeti u obzir tokom procesa proizvodnje inulinaze, je uticaj različitih tipova izvora ugljenika i njihove koncentracije na rast mikroorganizma, a onda i na indukovanje sinteze enzima. Različiti izvori ugljenika koji se nalaze u podlozi utiču na rast, sporulaciju, morfologiju kolonije, strukturu ćelijskog zida i način skladištenja polisaharida u mikroorganizmima [83–85], što može uticati na sintezu enzima. Mehanizmi regulacije produkcije inulinaza su komplikovani i često zavise od soja i vrste mikroorganizma [86].

Inulinazu produkuju i kvasci koji pripadaju vrsti *Kluyveromyces*. Sojevi *K. marxianus* Y179, *Kluyveromyces marxianus* YX01 i *Kluyveromyces fragilis* [87–89] gajeni su pri različitim uslovima, pri čemu je primećeno da produkcija inulinaza zavisi od izvora ugljenika koji se koristi. Veća inulinazna aktivnost dobija se gajenjem kvasca na podlozi koja sadrži inulin u poređenju sa podlogama koje sadrže fruktozu i saharozu, dok je glukoza odgovorna za kataboličku represiju [90], iako mehanizam nije u potpunosti jasan.

Još jedan mikroorganizam koji se pokazao kao odličan proizvođač enzima inulinaznog kompleksa je *Aspergillus niger* [1]. Urađen je veliki broj istraživanja i optimizacija podloga u

pogledu sastava podloge, gde su se kao izvori ugljenika i induceri sinteze enzima koristili inulin i saharoza [10,91].

2.7 Inulinaze – opis enzima, podela, primena

Enzimi koji imaju ulogu u hidrolizi inulina pripadaju kompleksu inulinaza i predstavljaju jednu od važnih klasa industrijskih enzima [3]. Dele se na dve podklase: endoinulinaze InuA (2,1- β -D-fruktan fruktohidrolaza, EC 3.2.1.7), koje hidrolizuju unutrašnje veze u lancu inulina i egzoinulinaze InuE (β -D-fruktan fruktohidrolaza, EC 3.2.1.80) koje katalizuju reakciju hidrolize terminalne fruktoze sa neredukujućeg kraja inulina (FOS_h) [10,11]. Treću klasu inulinaza čine enzimi koji učestvuju u dobijanju fruktooligosaharida (FOS_s) tokom reakcije transfruktozilacije koristeći saharozu kao supstrat su β -fruktofuranozidaze (FFase; EC 3.2.1.26) i/ili fruktoziltransferaza (FTase; EC 2.4.1.99) [12].

Detaljne analize inulinaznih enzima podrazumevaju karakterizaciju i na proteinskom nivou i na genskom nivou. Analizom sekvenciranog gena koji kodira svaki inulinazni enzim se dobijaju značajni podaci o predikciji funkcionalnosti enzima u smislu njegove primarne i sekundarne strukture koje uslovljavaju ispoljavanje enzimske aktivnosti. Biohemijskim karakterizacijama enzima nakon prečišćavanja do homogenosti, se dobijaju podaci o osobinama enzima kao što su pH optimum, temperaturni optimum, molekulska masa, pI vrednost, koji su važni za postizanje maksimalne efikasnosti pri upotrebi enzima.

Nukleotidne i aminokiselinske sekvence egzoinulinaza izolovanih iz različitih organizama: kvasca [92], cikorijske [93], *Aspergillus awamori* [94] i *Geobacillus Stearothermophilus* [95] upoređene su i zaključeno je da pripadaju istoj familiji glikozid-hidrolaza 32 (GH32) [96].

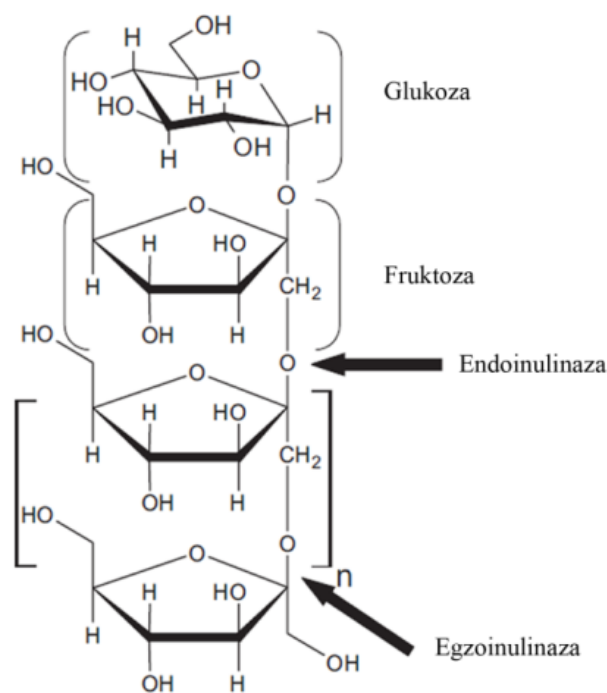
Ovoj familiji takođe pripadaju invertaze biljaka, endo- i egzoinulinaze gljiva i bakterija, levanaze, biljne fruktan egzohidrolaze (FEH) i dva tipa 1-fruktoziltransferaze [97–99]. Ovi enzimi dele konzervativni aminokiselinski deo i poseduju sličnu trodimenzionalnu strukturu proteina [99–101]. Takva struktura uslovljava i sličan mehanizam delovanja koji podrazumeva zadržavanje konfiguracije na anomernom atomu ugljenika u supstratu [96]. Hidroliza se odvija preko kisele katalize koja zahteva dva katalitička ostatka: proton donor i nukleofil [102].

Korišćenjem kristalografije ili metodama dirigovane mutacije, tri kisela aminokiselinska ostatka: aspartat ili glutamat koji se nalaze u motivu WMN(D/E)PN, aspartat koji se nalazi u RDP motivu i glutaminska kiselina (E) u ECP motivu, identifikovani su kao esencijalne aminokiseline odgovorne za enzimsku aktivnost [103–105]. I upravo ovi aminokiselinski ostaci imaju ulogu katalitičkog nukleofila, stabilizatora prelaznog stanja i opšteg kiselo-baznog katalizatora [105].

Inulin- struktura, uloga, primena

Inulin je linearni polimer koji se sastoji od 20-60 molekula fruktoze povezanih β -(2,1)-D-fruktozil-fruktoza vezom na čijem se kraju može naći molekul glukoze, prikazan na slici 4. Inulin je široko rasprostanjen polisaharid, prirodno se nalazi u različitim biljkama uključujući 1200 vrsta trave koji pripadaju 10 familijama [78]. Predstavlja rezerve ugljenih hidrata koje biljke kao što su jerusalimska artičoka (čičoka) (*Helianthus tuberosus*), cikorija (*Cichorium intybus*), dalija (Dahlia), jakon (*Smallanthus sonchifolius*), maslačak (*Taraxacum officinale*) skladište u korenu i krtolama [106]. Prinos inulina koji se dobije izolovanjem iz korenja i krtola ovih biljaka je preko 70% [1]. Dve vrste biljaka koje poslednjih godina imaju veliku primenu u industriji za izolovanje inulina su jerusalimska artičoka ili čičoka (*Helianthus tuberosus*) i cikorija (*Cichorium intybus*) [107,108].

Jerusalimska artičoka poseduje osobine kao što su visoka otpornost na različite vremenske uslove (hladnoća, suša, vetar) velika otpornost na razne bolesti i štetočine i može se uzgajati na različitim vrstama zemljišta [109]. Sadrži oko 50–70 g inulina po kg sirove mase a prinos roda je oko 5,4 t/ha [109], što govori da je čičoka jedna od najisplativijih biljaka za gajenje i izolovanje inulina na industrijskom nivou [109].



Slika 4. Deo strukture inulina sa prikazanim mestima delovanja inulinaznih enzima (preuzeto i prilagođeno iz [110])

Različiti faktori utiču na stepen polimerizacije (DP od *eng.* degree of polymerization) inulina odnosno na dužinu polisaharidnog lanca, pre svega vrsta biljke koja se koristi za izolovanje inulina. Dokazano je da struktura inulina koji se nalazi u cikoriji ima manji stepen polimerizacije od inulina izolovanog iz jerusalimske artičoke (*Cynara scolymus*) ili čička (*Echinops ritro*). Razlike koje postoje u dužini lanca inulina u različitim vrstama biljaka mogu da budu posledica drugačijih enzima i njihove aktivnosti. Na stepen polimerizacije uticaj imaju i uslovi gajenja i način izolovanja, klimatski uslovi, način skladištenja biljnog materijala [107].

2.7.1 Endoinulinaza (2,1 β -D-fruktan fruktanohidrolaza, EC 3.2.1.7)

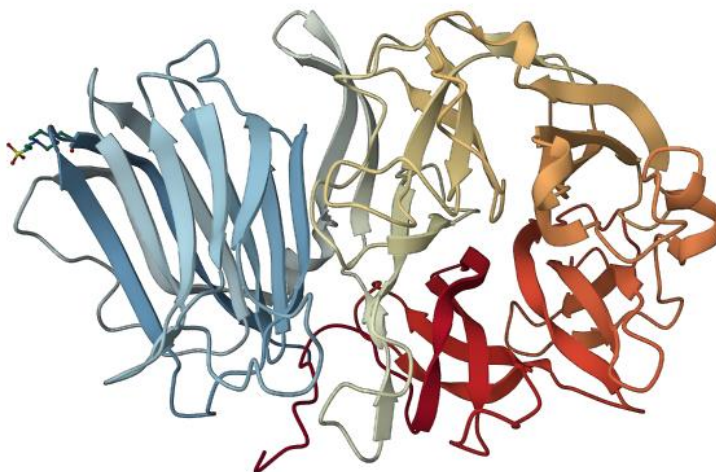
Endoinulinaza (EC 3.2.1.7) katalizuje hidrolizu β -2,1 glikozidne veze u molekulu inulina dajući kao proizvod reakcije FOS-ove koji se uglavnom sastoje od inulotrioza i inulotetraoza [111,112], što navodi na zaključak da ovi enzimi degraduju inulin hidrolizujući veze nakon trećeg i četvrtog molekula fruktoze u lancu inulina. Stabilne su u širokom opsegu pH (2,0 – 8,0), pri čemu najveću aktivnost ispoljavaju u opsegu pH od 4,0 do 6,0 i temperaturama od 50 °C do 60 °C, iako su aktivne u širokom temperaturnom opsegu od 35 °C do 70 °C. Međutim, treba uzeti u obzir da se u zavisnosti od izvora dati enzimi razlikuju, stoga je postojanje manjih razlika u vrednostima temperaturnog i pH optimuma očekivano. Kod gljive roda *Aspergillus* optimumi pH i temperature zabeleženi su na pH 5,0 i 55 °C [113]. Vrednost K_m za endoinulinazu izolovanu iz gljiva *Aspergillus* iznosi oko 540 mM kad se kao supstrat koristi inulin [114].

Endoinulinazu mogu inhibirati joni Hg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} [113]. A inhibitori takođe mogu biti EDTA i piridoksal-5-fosfat [113].

Endoinulinaza može biti lokalizovana ekstracelularno ili intracelularno u zavisnosti od organizma iz kog je izolovana. Enzim pripada grupi glikoproteina i sastoji se od jedne subjedinice (monomer) molekulske mase od 69 kDa do 64 kDa i pI 3,00 ili 3,85 [113].

Endoinulinaza ima veliku primenu u industriji hrane, za dobijanje visokofruktoznog sirupa, u industriji bioetanola, u procesu dobijanja fruktooligosaharida. Mikroorganizmi kao što su *Penicillium* spp., *Kluyveromyces* spp., *Aspergillus niger* i *Aspergillus ficuum* najviše se koriste za njenu proizvodnju, izučavanje i dalju primenu [78].

INU2 endoinulinaza iz *Aspergillus ficuum*, industrijski važan enzim, molekulske mase 54,8 kDa (monomer), je nakon izolovanja i prečišćavanja pokazala veliku specifičnost prema inulinu i inulooligosaharidima kao supstratima, pri čemu je kao proizvod reakcije najviše dobijeno inulotrioze [111,115]. Glu43 i Glu233 su identifikovani kao važni aminokiselinski ostaci u katalitičkom centru, dok je za Trp40 dirigovanom mutagenezom pokazano da je od suštinskog značaja za aktivnost enzima [112]. Opisana je i njena 3D struktura (prikazana na slici 5) i identifikovano veće katalitičko mesto u poređenju sa egzoinulinazom formiranom od konzerviranog motiva VM(I)-ND(E)-PNG, takozvane petlje 1 i petlje 4. Smatra se da je razlika u mehanizmu delovanja između egzo- i endoinulinaza upravo posledica većeg džepa u endo-enzimima. Ove dve petlje od četiri identifikovanih su konzervirane među svim endo-inulinazama sa poznatom aminokiselinskom sekvencom [116]. Strukturna analiza koja je upoređena sa strukturama drugih enzima koji pripadaju familiji GH32 ukazala je na postojanje još jednog dodatnog džepa u katalitičkom mestu INU2 enzima, što bi moglo da objasni endo aktivnost enzima, ulogu Trp40 ostatka i hidrolizu veze nakon treće monosaharidne jedinice kod inulin sličnih supstrata. Kristalna struktura INU2 u kompleksu sa molekulima fruktoze, eksperimentalni podaci i studije molekularnog modeliranja podržavaju ove hipoteze [117].



Slika 5. Model proteina endoinulinaze iz *Aspergillus ficuum* (preuzeto i prilagođeno iz [116,118])

Gljiva *A. niger* za degradaciju inulina koristi simultanu aktivnost dva enzima endoinulinaze [21] i egzoinulinaze [94,119,120].

2.7.2 Egzoinulinaza (β -D-fruktan fruktohidrolaza, EC 3.2.1.80)

Egzoinulinaza, poznata kao i β -D-fruktan fruktohidrolaza (EC 3.2.1.80), spada u grupu hidrolaza koje katalizuju hidrolizu terminalne, neredukujuće 2,1-veze i 2,6-vezu β -D-fruktofuranoznih molekula u fruktanima, pri čemu se oslobađa β -D-fruktoza. Prirodni supstrati egzoinulinaze su inulin, levan i saharoza. Pronađene su egzoinulinaze koje se razlikuju po pH optimumu, afinitetu ka supstratu, biohemijskim osobinama, kao i po lokalizaciji, koja može biti unutarćelijska (uglavnom kod biljaka) ili vanćelijska (kod mikroorganizama).

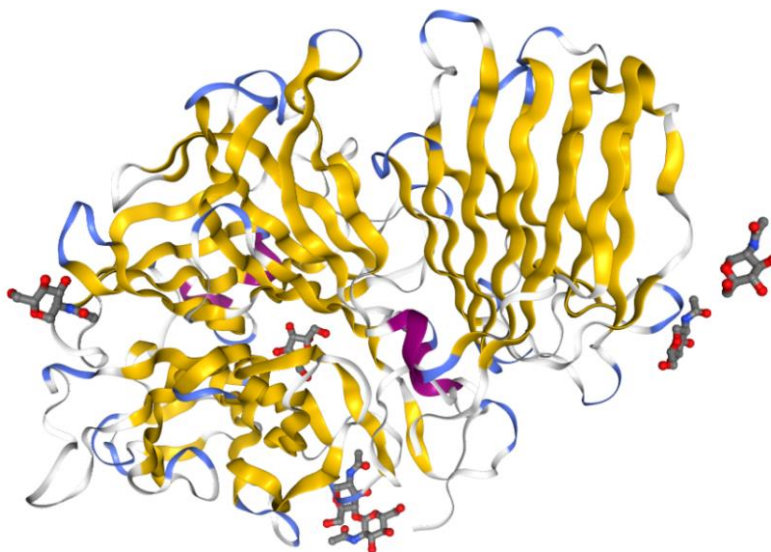
Egzoinulinaze su stabilne u širokom opsegu pH, pri čemu najveću aktivnost ispoljavaju u opsegu pH od 4,5 do 6,0 i temperaturama od 20 do 70, pri čemu su optimumi na pH 5,0 i 55 °C [121,122]. Vrednosti K_m za egzoinulinazu izolovanu iz gljive *A. awamori* razlikuju se u zavisnosti od supstrata koji se koristi u reakciji, pa je tako utvrđena K_m 40 mM ukoliko je supstrat saharoza, a samo 0,05 mM ukoliko je supstrat inulin [120]. Inhibitori egzoinulinaza su joni Hg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} ,

Mn²⁺, Mg²⁺, Ag⁺, Cu²⁺, Ca²⁺, EDTA [114,121,122]. Takođe je primećeno da inhibitor može biti i glukoza [121,122].

pI vrednosti variraju od 4,6 do 6,0 u zavisnosti od organizma iz kog je enzim izolovan. Izoelektrično fokusiranje egzoinulinaze izolovane iz gljiva roda *Aspergillus* i *Penicillium* pokazalo je vrednosti od oko 4,6 - 4,9, što se uklapa u profil enzima gljiva kiselih pI vrednosti [123]. Istraživanja su pokazala da masa proteina zavisi od organizma iz kog je izolovan i da veću masu imaju egzoinulinaze produkovane od strane mikroorganizama u odnosu na one izolovane iz biljaka. Kod gljiva roda *Aspergillus* molekulska masa egzoinulinaze varira od 63 kDa do 80 kDa na osnovu podataka dobijenih SDS PAG elektroforezom [121,122] do čak 176,5 kDa koliko je određeno nativnom elektroforezom i 200 kDa gel hromatografijom [123].

Kada su u pitanju posttranslacione modifikacije pokazano je prisustvo glikozilovanja, ali protein nije glikozilovan kod svih organizama koji ga produkuju. Egzoinulinaza iz *A. awamori* sadrži pet N – povezanih oligosaharida. Rentgenskom kristalografijom dobijena je struktura koja predstavlja kompleks enzima i fruktoze i ukazala je na postojanje 2 katalitički veoma važna aminokiselinska ostatka: Asp41 – koji predstavlja nukleofil i Glu241 – kiselinsko-bazni katalizator [99].

Tercijarna struktura egzoinulinaze izolovane iz *A. awamori* dobijena rentgenskom kristalografijom ukazuje na postojanje dva domena: većeg N-terminalnog katalitičkog domena sa β-propelerskim uvijanjem i manjeg C terminalnog domena uvijenog u β-sendvič strukturu, što je prikazano na slici 6. Struktura ovog enzima je veoma slična strukturi invertaze (β-fruktofuranozidazi) iz *Thermotoga maritime*, enzimu koji takođe pripada familiji glikozid-hidrolaza 32 [99].



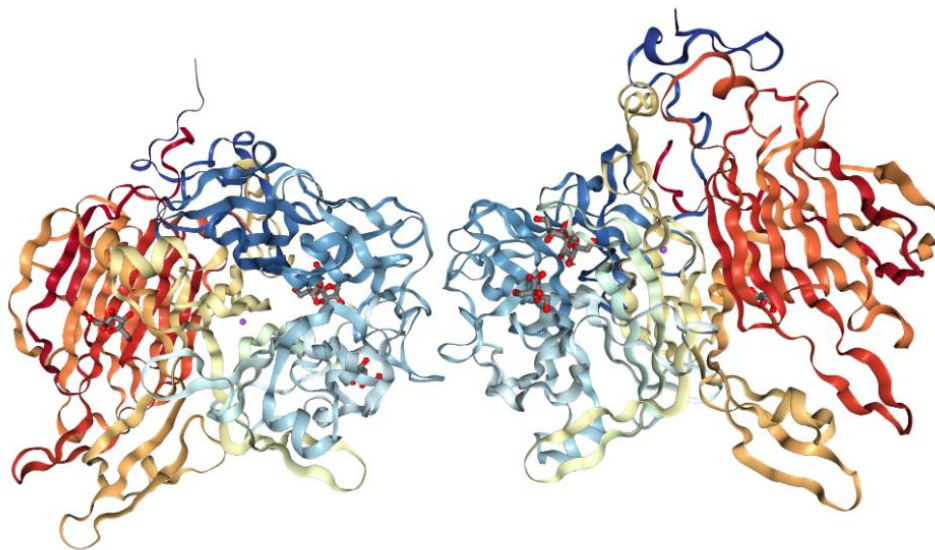
Slika 6. Model proteina egzoinulinaze iz *Aspergillus awamori* (preuzeto i prilagođeno iz [99,124])

U procesu dobijanja egzoinulinaze ulogu imaju različiti mikroorganizmi pri čemu su najispitanije egzoinulinaze dobijene iz *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus sp*, *Bacillus sp*, *Penicillium sp* [99]. Uspešna primena inulinaza u biotehnologiji i industriji hrane uticala je na povećanom interesu kako nauke tako i industrije.

Koristi se za dobijanje smeše fruktoze, glukoze, saharoze i fruktooligosaharida u koncentracijama koje su prihvatljive za upotrebu u mnogim proizvodima u industriji hrane [78].

2.7.3 Invertaza (β -D-fruktofuranozidaza, EC 3.2.1.26)

Invertaza je jedan od najšire rasprostranjenih enzima. Mikroorganizmi, kao što su *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *A. niger* i *A. japonicus*, najviše se koriste za njihovu proizvodnju, izučavanje i dalju primenu, ali se takođe može izolovati i iz biljaka [125]. Invertaza, poznata i kao β -fruktofuranozidaza (EC 3.2.1.26), koju kodira *suc1* gen [126], spada u grupu hidrolaza koje katalizuju hidrolizu β -2,1 glikozidne veze u molekulu saharoze dajući kao proizvod fruktozu i glukozu [125,127]. Pored ove aktivnosti, invertaza pokazuje i fruktoziltransferaznu aktivnost koja rezultuje nastankom fruktooligosaharida [125]. Opisana je i njena 3D struktura (prikazana na slici 7).



Slika 7. Model proteina β -fruktofuranozidaze iz *Aspergillus kawachii* (preuzeto i prilagođeno iz [128,129])

Enzim se ponaša kao hidrolaza pri niskim koncentracijama saharoze, međutim, pri visokim koncentracijama iste ispoljava fruktoziltransferaznu aktivnost. U pojedinim mikroorganizmima detektovane su različite izoforme invertaze koje se razlikuju po pH optimumu, afinitetu ka supstratu, biohemijskim osobinama, kao i po lokalizaciji, koja može biti unutarćelijska ili vanćelijska [130].

Invertaze su stabilne u širokom opsegu pH, pri čemu najveću aktivnost ispoljavaju u opsegu pH od 4,0 do 6,0 i temperaturama od 50 do 60, pri čemu su optimumi na pH 5,0 i 60 °C [130]. Vrednosti K_m za invertazu izolovane iz gljiva *A. niger* iznose oko 35 mM [130]. Naravno, treba uzeti u obzir da se u zavisnosti od izvora dati enzimi razlikuju, stoga su male varijacije u vrednostima temperaturnog i pH optimuma očekivane.

Invertaza je glikoprotein i inhibiraju je joni Hg^{2+} , Ag^{2+} , Co^{2+} i Cu^{2+} . Istraživanja su pokazala da joni bakra, kobalta i magnezijuma smanjuju aktivnost invertaze za 50%, dok iste koncentracije (5 mM) K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , NO_3^- i SO_4^{2-} smanjuju aktivnost za 30% [131]. Joni žive u potpunosti inhibiraju aktivnost enzima [131]. Takođe je primećeno da inhibitor može biti i proizvod reakcije - fruktoza [125]. Enzim koji je proizveo *A. niger* je nakon prečišćavanja okarakterisan, pri čemu je ustanovljeno da pokazuje aktivnost prema saharozi i rafinozi ali ne i prema inulinu. Optimalna invertazna aktivnost zabeležena je na pH 5,5 pri temperaturi od 50 °C. Molekulska masa određena SDS elektroforezom pri redukujućim uslovima oko 115 kDa, dok je masa dobijena SDS elektroforezom pri nativnim, nedenaturišućim uslovima između 225 kDa i 250 kDa, što ukazuje da je dobijeni enzim dimer sa identičnim subjedinicama [126].

2.7.4 Fruktoziltransferaze (EC 2.4.1.9)

Za fruktoziltransferaze se često pretpostavlja da su to β -transfuktozidaze i ponekad ih je teško razlikovati upravo zbog njihove slične prirode. Postoji pretpostavka da su to dve vrste aktivnosti različitog porekla, odnosno da su dva enzima koja ispoljavaju različitu aktivnost ili da je to jedan enzim koji ispoljava obe aktivnosti u zavisnosti od uslova reakcije [132]. Međutim, ono što ih odvaja je to da za razliku od β -transfuktozidaza, fruktoziltransferaze imaju mali afinitet ka vodi kao akceptoru fruktozil jedinice, tj. poseduju malu hidrolitičku aktivnost [132].

Komercijalno dobijanje FOS-ova podrazumeva enzimsku hidrolizu inulina izolovanog pre svega iz jerusalimske artičoke i cikorije [133]. Međutim, alternativni način dobijanja predstavlja konvertovanje saharoze u FOS-ove, korišćenjem različitih transfuktozilaznih enzima izolovanih iz biljaka, bakterija i gljiva [133]. Fruktoziltransferaza (FTF) i hidrolitički enzimi pripadaju porodici glikozid hidrolaza 32 (GH32) i porodici 68 (GH68) [96] i čine enzimski klan/klasu GH-J, koja je bazirana na zajedničkim konzervativnim domenima [134]. Za mikroorganizme karakteristična je 1-fuktoziltransferaza, dok se u biljkama pronalaze i saharoza:saharoza 1F- β -D-fuktoziltransferaza (1F-SST) i 1,2- β -D-fuktan:1,2- β -D-fuktan 1F- β -D-fuktoziltransferaza (1F-FFT).

Sinteza FOS-ova se javlja kao posledica aktivnosti invertaze (EC 3.2.1.26) [135] ili kao rezultat aktivnosti specifične fruktoziltransferaze (EC. 2.4.1.9) [127], produkovanih od strane gljive *A. niger*. Nguyen et al. pokazali su prisustvo intracelularne invertaze u soju *A. niger* IMI303386, gajenom na saharozi ili inulinu kao jedinom izvoru ugljenika. Prečišćeni enzim je hidrolizom saharoze kao proizvode dao fruktozu i glukozu, ali pored toga kao proizvodi se dobijaju 1-kestoz i nistoz, što ukazuje na postojanje fruktoziltransferazne aktivnosti [136]. Enzim koji ispoljava β -fuktoziltransferaznu aktivnost (EC 2.4.1.9), pritom ne pokazuje značajnu invertaznu aktivnost, izolovan je iz soja *A. niger* AS0023 i prečišćen korišćenjem sledećih matriksa: DEAE Sephadex A-25, Sepharose 6B, Sephacryl S-200 i concanavalin A-Sepharose 4B [127]. Ovaj enzim ima mogućnost transferovanja molekula fruktoze sa neredukujućeg kraja β -2,1 glikozidne veze u saharozi na drugi molekul saharoze ili inulina formirajući kestoz ili duže fruktooligosaharide [127]. Međutim, gen koji kodira ovaj protein nije još uvek identifikovan i okarakterisan. Enzim koji je produkovao *A. niger* je nakon prečišćavanja okarakterisan, pri čemu je ustanovljeno da pokazuje aktivnost prema saharozi i rafinozi ali ne i prema inulinu. Optimalna invertazna aktivnost zabeležena je na pH 5,5 pri temperaturi od 50 °C. Molekulska masa određena SDS elektroforezom pri redukujućim uslovima oko 115 kDa, dok je masa dobijena SDS elektroforezom pri nativnim, nedenaturišućim uslovima između 225 kDa i 250 kDa, što ukazuje da je dobijeni enzim dimer sa identičnim subjedinicama [126].

Nasledno – gensko poreklo enzima fruktoziltransferaze je aktuelan predmet istraživanja i do sada je poznato nekoliko gena koji kodiraju enzimi koji su odgovorni za produkciju FOS-ova transfuktozidaznom aktivnosti.

2.7.5 Geni koji kodiraju enzime β – fruktofuranozidazu i fruktoziltransferazu

Pravi identitet, raznolikost i osobine invertaza i fruktoziltransferaza koje je gljiva *A. niger* u mogućnosti da produkuje, mogu se okarakterisati zahvaljujući sekvenciranju kompletnog genoma *A. niger* [137]. Pored *sucA* gena koji kodira prethodno poznatu i okarakterisanu ekstracelularnu invertazu [126], u genomu *A. niger* identifikovana su još dva gena (*sucB* i *sucC*) za koje se pretpostavlja da su geni koji kodiraju za intracelularne invertaze [138]. Ovi geni su identifikovani i u genomima drugih gljiva.

Suc1 gen koji kodira za invertazu kod *Aspergillus niger* uspešno je kloniran i eksprimiran kod drugih filamentoznih gljiva koje ne poseduju gen za invertazu kao što su *Trichoderma reesei*, *Trichoderma hamatum* i *Podospira anserina*, što im je omogućilo korišćenje saharoze kao jedinog izvora ugljenika [139]. Ekspresija *suc1* gena kod *T. reesei* dovela je do produkcije heterolognog proteina koji je potpuno aktivan, ali ima drugačiju molekulsku masu od invertaze koju produkuje *A.*

niger [139]. Prečišćeni enzimi dobijeni iz različitih mikroorganizama pokazuju niz osobina i razlikuju se u mnogim aspektima uključujući molekulsku masu, strukturu subjedinica i stepen glikozilacije.

Yanai et al. su opisali ekstracelularnu β -fruktofuranozidazu iz soja *A. niger* 20611, koja je pokazala veću fruktoziltransferaznu aktivnost u poređenju sa drugim poznatim invertazama *Aspergillus* vrsta. Kasnije je ovaj soj identifikovan kao *A. japonicus* ATCC 20611 [140].

Iako ovi geni dele konzervativne aminokiselinske ostatke sa ostalim enzimima koji pripadaju GH32 familiji, filogenetski gledano grupisani su zajedno u novu grupu sa drugim enzimima za koje se pretpostavlja da su intracelularne invertaze. Ove nove invertaze sadrže sve konzervativne aminokiselinske ostatke koji imaju ulogu u katalizi [141].

SucB gen iz *A. niger* je kloniran amplifikacijom celog kodirajućeg regiona *sucB* (1,854 bp), uspešno eksprimiran, nakon čega je prečišćen i biohemijski okarakterisan. Utvrđeno je da je ekspresija *SucB* regulisana i povećana saharozom i inulinom, dok je korišćenje drugih supstrata rezultovalo malom ekspresijom enzima [138]. Molekulska masa produkovanog proteina je 75 kDa, a dobijeni podaci govore da pored invertazne aktivnosti ovaj enzim pokazuje i fruktoziltransferaznu aktivnost [138]. Invertazna aktivnost *SucB* (supstrat saharoza) detektovana je u pH opsegu od 4,5 do 7,0, sa maksimum aktivnosti na pH 5,0. Optimalna temperatura je u opsegu od 37 do 40 °C [138]. Povećanje koncentracije saharoze od 2,5 mM do 1 M za rezultat ima smanjenje hidrolitičke aktivnosti i porast fruktoziltransferazne aktivnosti od 20% do 50% od ukupne *SucB* aktivnosti. TLC metodom i HPAEC analizom je pokazano prisustvo najveće količine 1-kestoze i nistoze u manjoj koncentraciji kao proizvoda fruktoziltransferazne aktivnosti, ali i prisustvo slobodne fruktoze u malim koncentracijama [141]. Osobine *SucB* razlikuju se od svih prethodno publikovanih podataka o ekstracelularnim *A. niger* invertazama (*Suc1/SucA/INV*) [126,127,142]. Rezultati dobijeni određivanjem supstrate specifičnosti ukazuju na to da enzim *SucB* pokazuje aktivnost prema saharozi, rafinozi i oligosaharidima inulinskog tipa kao što su 1-kestoza i nistoza, oslobađajući molekul fruktoze u svakom od navedenih supstrata ali takođe pokazuje i sposobnost oligomerizacije [142]. Inkubiranjem *SucB* enzima sa 1-kestozaom u smeši sa ili bez saharoze kao proizvodi reakcije dobijaju se fruktoza, saharoza i nistoza, pokazujući da se 1-kestoza može ponašati i kao donor i kao akceptor molekula fruktoze. HPAEC analizom potvrđeno je da je nistoza najduži oligosaharid produkovan tokom enzimske reakcije *SucB* gde je kao supstrat korišćena 1-kestoza, ali je dokazana i zanemarljiva količina pentakestoze u reakciji koja se odvijala preko noći. Inkubiranjem *SucB* enzima sa nistozom ili u smeši sa saharozom kao proizvod reakcije dobijena je fruktoza, saharoza i 1-kestoza. Alternativno, nosintetizovana saharoza se dalje koristi kao donor molekula fruktoze u reakciji sinteze 1-kestoze. *SucB* enzim pokazao je aktivnost prema rafinozi hidrolizujući deo saharoze, ali nije detektovana hidroliza α -glikozidne veze u šećerima kao što je trehaloza. Istraživanja su pokazala da nijedan od korišćenih supstrata sa α -glikozidnom vezom nije imao ulogu donora/akceptora molekula u fruktoziltransferaznoj reakciji sa saharozom. Pored toga nije detektovana hidroliza velikih polisaharida kao što su inulin i levan, čak ni nakon reakcije koja je trajala preko noći [142].

Za razumevanje i analizu inulinaznih enzima se pored standardnih metoda enzimskih eseja koriste i zimografske metode koje daju potpuniju sliku o osobinama enzima.

2.7.6 Zimografska detekcija inulinaza

Termin „zimogram“ je uveden prvi put davne 1962. godine i označava vizuelizaciju enzimske aktivnosti konverzijom supstrata [143]. Enzimskom hidrolizom ili nekom drugom reakcijom supstrat se prevodi u proizvod reakcije koji se vizualizuje zimografskom metodom direktno – odnosno tzv *in situ*. Na ovaj način se mogu detektovati enzimske aktivnosti u gelovima nakon elektroforetskog razdvajanja ili bez razdvajanja, ali i direktno u tkivima, a kao supstrati se mogu koristiti proteini i peptidi, oligosaharidi i polisaharidi, lipidi i nukleinske kiseline.

Zimogramskom metodom za detekciju enzimske aktivnosti dobijaju se važni kvalitativni i kvantitativni podaci o enzimu kao što su molekulska masa proteina ili prisustvo različitih izoformi enzima. Zimogramska detekcija enzimske aktivnosti u gelu, drugačije nazvana i indirektni zimogram, nastala je 1978. godine [144]. Ova metoda se zasniva na elektroforetskom razdvajanju proteinskih uzoraka u poliakrilamidnom (PAA) gelu nakon čega se enzimi kapilarno prenose na supstratni gel gde se detektuje enzimska aktivnost. Daljim razvojem zimogramske detekcije nastali su zimogrami direktno u PAA supstratnom gelu [145–147]. Opisane metode se najčešće koriste u denaturišućim elektroforetskim uslovima (SDS PAGE) koja ima ograničenje da se mogu detektovati samo oni enzimi koji se mogu renaturisati nakon denaturacije SDS-om. Sa ciljem dobijanja što bolje rezolucije i veće količine podataka razvijane su brojne varijacije zimograma u gelu. Tako su razvijene i tehnike zimogramske detekcije nakon nativnog elektroforetskog razdvajanja proteina što uključuje i izoelektrofokusanje (IEF) i razdvajanje u dve dimenzije (2D elektroforeze). Ovakve metode omogućavaju analizu kompleksnih uzoraka, a dobijene individualne proteinske trake se dalje mogu dodatno analizirati npr. sekvenciranjem datog proteina [148,149].

Inulinaze filamentoznih gljiva se najčešće proizvode kao stabilne smeše inulinaznih enzimskih kompleksa – visoko aktivne smeše fruktanhidrolaza [150]. Većina studija gde se proučavaju ovi enzimi u primenjenom smislu je usmerena na ulogu pojedinačnih enzima u produkciji fruktooligosaharida ili hidrolizi inulina [5,6,110]. Najčešće korišćena zimogramska metoda za detekciju i karakterizaciju inulinaznih enzima podrazumeva detektovanje samo endoinulinaze. Razvijene su metode gde se u kopolimerizovanom gelu sa inulinom kao supstratu detektuje njegova hidroliza kao prosvetljenje nakon bojenja inulina Kongo crvenom bojom [151,152]. Međutim, kada se koriste enzimski kompleksi ili kada se tako proizvode zgodno je okarakterisati sve enzime prisutne u kompleksu. Na taj način se dobija više korisnih informacija o enzimima koje mogu biti iskorišćene u smislu praktične upotrebe enzima. Za neke enzimske komplekse gljiva su već razvijene simultane zimogramske metode kojima se nakon jednog elektroforetskog razdvajanja detektuju do tri enzima iz kompleksa [73,153]. U literaturi generalno nema puno opisanih zimografskih metoda za inulinaze, a ne postoji opisana simultana zimografska detekcija za sve opisane enzime inulinaze, uprkos činjenici da se obično javljaju zajedno u ekstraktima fermentacija filamentoznih gljiva. Informacije koje bi se dobile primenom simultane zimogramske detekcije inulinaznog enzimskog kompleksa bi bile značajne za praćenje produkcije ovih enzima, ali i za njihovu adekvatnu primenu u dobijanju proizvoda dodate vrednosti.

2.8 Primena inulinaza

Poslednjih godina istraživanja na polju inulinaza veoma je napredovalo upravo zbog njihove široke primene. Istraživanja inulinaza su fokusirana na dobijanje nekog od sledećih proizvoda: inulooligosaharida/fruktooligosaharida, bioetanola i visoko koncentrovanog fruktoznog sirupa razgradnjom inulina i/ili sirovih biljnih materijala koji sadrže inulin.

2.8.1 Dobijanje etanola iz inulina

Etanol predstavlja jedan od najčešće i najviše korišćenih biogoriva, a takođe je i materijal za sintezu hemikalija [154]. Velika rastvorljivost inulina u toploj vodi i mala viskoznost olakšavaju rad i optimizaciju procesa dobijanja fruktoze. Iako je skrob i dalje jedan od najvažnijih i možda najkorišćenijih materijala u bioprocima oni su i dalje komplikovani i zahtevaju veliki broj koraka [2,155–157]. Još jedna od prednosti korišćenja inulina je na nivou enzima koji se koriste za njegovu razgradnju. Tako egzoinulinaza koja katalizuje hidrolizu β -2.1 veze u inulinu, u jednom koraku daje fruktozu i manju količinu glukoze kao krajnje proizvode. Prednost se ogleda i u biljnim materijalima koji sadrže velike količine inulina (npr. jerusalimska artičoka) i ne predstavlja prehrambene namirnice, a zbog niže cene poslednjih godina se dosta ulaže u njihovo gajenje [109].

Upotreba smeše mikroorganizama pokazala se kao dobar način za dobijanje bioetanola. Korišćenjem mutiranog soja *A. niger* 12 u kombinaciji sa sojevima kvasca *S. cerevisiae* 1200 u simultanom procesu saharifikacije i fermentacije čistog inulina izolovanog iz cikoriје i dalje, odnosno jerusalimske artičoke, zapaženo je povećanje prinosa etanola za 21% (v/v), odnosno 10.4% (v/v) [158]. Ulogu u produkciji etanola iz jerusalimske artičoke imale su i inulinaze kvasca *K. fragilis*, u simbiozi sa bakterijom *Zymomonas mobilis* ili sa komercijalnim sojem kvasca *S. cerevisiae* [159].

2.8.2 Produkcija visokokoncentrovanog fruktoznog sirupa iz inulina

Fruktoza ima veliku primenu u hrani, farmaceuticima, piću. Pored toga fruktozni sirup ima pozitivan uticaj na pacijente koji boluju od dijabetesa, predstavlja dobar zaslađivač i može koristiti u ishrani gojaznih osoba. Takođe stimuliše apsorpciju jona kalcijuma, stimuliše rast *Bifidobacteria* u gastrointestinalnom traktu i umanjuje rizik od nastanka kancera debelog creva [160].

Ranije se fruktoza dobijala hemijskim metodama, ali zbog brojnih nedostataka (nisko pH dovodi do stvaranja nusproizvoda u obliku anhidrida difruktoze, dolazi do promene boje hidrolizata inulina, nastala fruktoza pri niskom pH prelazi u 5-(hidroksimetil)furfural) [1,161], počelo je korišćenje enzimskih metoda u procesu dobijanja fruktoze i to upotrebom α -amilaze, amiloglukozidaze i glukozo izomeraze [16]. Međutim, kao najbolja pokazala se upotreba mikrobnih inulinaza koje u jednom koraku hidrolizom inulina daju i do 95% čiste fruktoze. Egzoinulinaze iz različitih mikroorganizama se koriste za produkciju visoko koncentrovanog fruktoznog sirupa iz inulina i materijala bogatih inulinom. Egzoinulinaza iz *K. marxianus* YS-1 pokazala se kao veoma uspešna u hidrolizi sirovog inulina (84.8%) dajući oko 43.6 mg/mL fruktoze [162]. Inulinaze izolovane iz sojeva kvasca *C. aureus* G7a i *P. guilliermondii* [17,163], *K. marxianus* var.*bulgaricus* [164] i *B. polymyxa* MGL21 [165] razgrađuju inulin dajući monosaharide (glukoza i fruktoza) i oligosaharide zbog čega ovi enzimi ovih mikroorganizama imaju primenu u industriji hrane i u fermentacijama na industrijskom nivou.

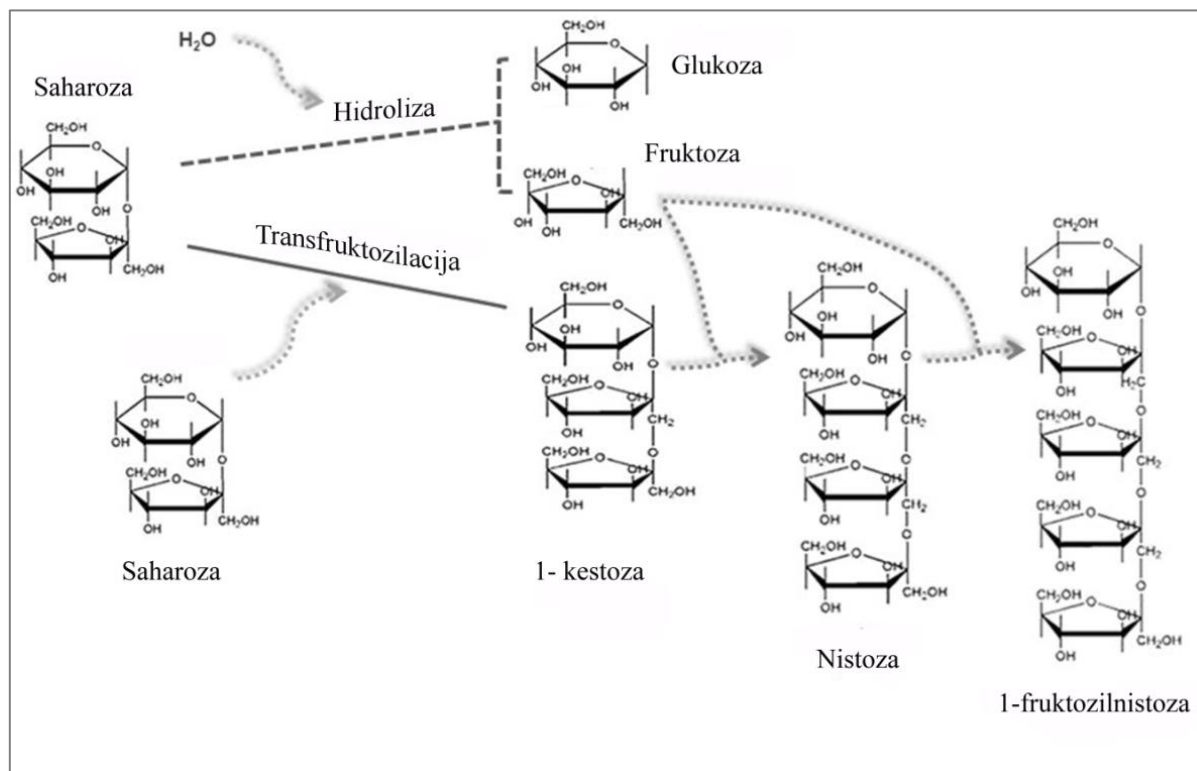
2.8.3 Produkcija fruktooligosaharida

Fruktooligosaharidi predstavljaju važne komponente funkcionalne hrane zbog njihovog pozitivnog dejstva na zdravlje ljudi. U zavisnosti od enzima koji se koriste u procesu dobijanja fruktooligosaharida mogu nastati dve klase, jedna koja se dobija hidrolizom inulina (FOS_n) i druga koja nastaje sintezom od saharoze u procesu transfruktozilacije (FOS_s) [166]. Fruktooligosaharidi (FOS) su važni prebiotici sa poznatim i dokazanim vrednostima [167].

Fruktooligosaharidi inulinskog tipa dobijaju se upotrebom enzima inulinaznog kompleksa kontrolisanom hidrolizom inulina pri čemu kao proizvode daju monosaharide fruktoze i oligo- i disaharide fruktoze povezane β (2 $\rightarrow$ 1) vezom, sa glukozom na početku lanca povezanog α (1 $\rightarrow$ 2) glikozidnom vezom [168]. Inulin može biti hidrolizovan dejstvom endoinulinaze pri čemu nastaju inulooligosaharidi, inulotrioze, inulotetraoze i inulopentaoze [21,169]. Inulooligosaharidi imaju vrlo sličnu strukturu i funkcionalnost sa fruktooligosaharidima, a pozitivni efekti koje imaju na ljude i životinje su poznati i definisani [170].

Korišćenjem endoinulinaze za hidrolizu inulina u jednom koraku dobija se prinos fruktooligosaharida koji je preko 80%. INU2 gen koji kodira za endoinulinazu iz gljive *A. ficuum* kloniran je i eksprimiran u genom kvasca *S. cerevisiae* koji ne poseduje SUC2 gen (kodira za invertazu), što za cilj ima dobijanje preparata koji sadrži samo endoinulinazu bez egzoinulinaze i ekstracelularne invertaze u medijumu. Endoinulinaza produkovana od strane rekombinantnog kvasca korišćena je za hidrolizu inulina i produkciju fruktooligosaharida. Glavni proizvod koji nastaje je 1-kestoza [171]. Endoinulinaza je prečišćena iz enzimskog inulinaznog kompleksa i korišćena za produkciju inulooligosaharida hidrolizom inulina, pri čemu u najvećoj količini nastaju oligosaharidi čiji je stepen polimerizacije (od *eng. degrees of polymerization* – DP) 3 i 4 [169].

FOS_s se mogu se dobiti od saharoze tokom reakcije transfruktozilacije dejstvom β - fruktofuranozidaze (invertaze) i/ili fruktoziltransferaze. Nastaje smeša monosaharida (u najvećoj količini sačinjena od glukoze) i smeša oligosaharida koja se sastoji od molekula fruktoze povezanih β (2 $\rightarrow$ 1) vezom, koji takođe na početku lanca sadrže i jedan molekul glukoze povezane α (1 $\rightarrow$ 2) glikozidnom vezom. Generička struktura kojom se obeležavaju dobijeni proizvodi je GF_n, gde se G odnosi na molekul glukoze, a F_n na broj molekula fruktoze – 1-kestoza (GF₂), nistoza (GF₃), 1-fruktozilnistoza (GF₄) [168] (slika 8).



Slika 8. Shema enzimske sinteze fruktooligosaharida procesom transfruktozilacije (preuzeto i prilagođeno iz [172])

Na osnovu literaturnih podataka i jedan i drugi enzim (FFase i FTase) ima ulogu u sintezi fruktooligosaharida. Jedna teorija implicira postojanje jednog enzima koji ispoljava dve aktivnosti u zavisnosti od uslova reakcije i koncentracije supstrata. Naime, pri niskim koncentracijama supstrata enzim pokazuje hidrolitičku aktivnost (FFase), dok pri većim koncentracijama ispoljava (fruktozil) transferaznu aktivnost [12,173,174]. Druga teorija govori o postojanju enzima koji ispoljava samo fruktoziltransferaznu aktivnost (FTase) [12,174].

Takođe ova dva enzima pokazuju različite kinetičke parametre potvrđujući njihovu različitu prirodu. Katalitička aktivnost ova dva enzima zavisi od koncentracije supstrata, u ovom slučaju saharoze. Fruktoziltransferazna aktivnost raste sa porastom koncentracije saharoze dok se invertazna aktivnost značajno smanjuje. Pored toga invertaza ispoljava samo hidrolitičku aktivnost dajući kao proizvode reakcije isključivo fruktozu i glukozu, dok fruktoziltransferaza katalizuje transfer fruktozil grupe dajući kao proizvod reakcije glukozu, 1-kestožu, nistožu i fruktofuranozil nistožu, pri čemu prinos dobijenih fruktooligosaharida iznosi 62% upotrebom 50% saharoze kao supstrata [127].

Oligosaharidi koji se dobijaju tokom ovih reakcija mogu da imaju različitu hemijsku strukturu koja zavisi od korišćenog supstrata (saharoza ili inulin) ali isto tako i od porekla enzima (bakterije i/ili gljive) koji se koriste u reakciji. Fruktooligosaharidi dobijeni sintezom od saharoze imaju manji stepen polimerizacije (DP 2 - 4) u odnosu na FOS-ove dobijene hidrolizom inulina kod kojih DP 3 - 7, a neretko DP bude veći od 9 [169,174,175]. Stoga prebiotske osobine i fermentacija

fruktooligosaharida od strane mikroflore creva se takođe mogu razlikovati, što je nekoliko studija i pokazalo. Fruktooligosaharide kratkog lanca fermentišu bakterije prisutne u proksimalnom crevu, dok se dugolančani FOS-ovi fermentišu u distalnom debelom crevu [174,175].

Ispitivan je uticaj različitih oligosaharida pri čemu je utvrđeno ne samo da se drugačije fermentišu već i da individualni sojevi pokazuju specifičnost prema određenim supstratima [176–178]. Korišćena su tri različita uzorka fruktooligosaharida, dva produkovana enzimima dobijenim iz *A. pullulans* (AP) i *A. ibericus* (IB) i jedan komercijalni uzorak Raftilose® P95 za ispitivanje njihovog uticaja na rast dobrih bakterija mikroflore GIT-a [179]. Sojevi *Bifidobacterium* pokazali su istu gustinu ćelija u medijumu tokom gajenja na različitim izvorima ugljenika, dok kod nekih sojeva *Lactobacillus* gustina varira u zavisnosti od vrste fruktooligosaharida koji je korišćen kao izvor ugljenika. Najveći porast u rastu bakterija zapažena je kod uzoraka kojima su dodati FOS-ovi dobijeni dejstvom enzimskih kompleksa *A. ibericus*. Manji porast bakterijskih kultura zabeležen kod uzoraka FOS-ova koji su dobijeni dejstvom enzimskih kompleksa *A. pullulans*, dok je najmanji porast u uzorcima gde su korišćeni komercijalni fruktooligosaharidi [179]. Uzimajući u obzir da razlike koje postoje u hemijskim strukturama di- i trisaharida FOSova mogu da nastanu usled različitih uslova fermentacije, supstrata i izvora enzima koji se koristi u njihovoj sintezi [180], mogu se donekle objasniti variranja tokom rasta bakterija mikroflore.

2.8.3.1 *In situ* produkcija oligosaharida

In situ produkcija krajnjih proizvoda dobijenih hidrolizom supstrata tokom rasta filamentozne gljive je novi pristup u korišćenju enzima gljiva. Uzimajući u obzir sposobnost filamentoznih gljiva da rastu na čvrstim supstratima upravo zahvaljujući enzimima koje produkuju i koji zapravo razlažu polimere supstrata do jedinjenja koja su neophodna gljivi za rast, došlo se na ideju da se i visokovredni proizvodi mogu dobiti iz direktne fermentacije. Nakon perioda rasta gljive na čvrstom prirodnom ili otpadnom materijalu pored produkovanih enzima dobijaju se i proizvodi reakcija. Neophodno je samo optimalnim metodama izolovati željene proizvode. Upravo ove pretpostavke i činjenice daju na značaju korišćenje baš filamentoznih gljiva za produkciju enzima SSF-om. A *in situ* produkcija filamentoznim gljivama postaje sve popularnija.

In situ produkcija oligosaharida tokom rasta gljive sa simultanom produkcijom enzima je relativno nova metoda koja se proučava i moći će da se primenjuje u dobijanju ksiloooligosaharida (XOS) [181]. Međutim, kad je reč o produkciji FOS-ova *in situ*, proces je nedovoljno proučen i korišćen u biotehnološkim procesima, a pored toga literaturnih podataka je veoma malo, ili se odnose na direktnu produkciju FOS-ova u namirnicama. Direktna sinteza fruktooligosaharida u namirnicama prirodno bogatih saharozom podrazumeva enzimsku konverziju saharoze u fruktooligosaharide dodavanjem fruktoziltransferaze [182]. Optimizacija procesa dobijanja fruktooligosaharida *in situ* se nameće kao zanimljiv koncept i predmet budućih istraživanja, čiji se porast može očekivati upravo zbog jednostavnosti procesa i uštede i vremena i neophodnih resursa.

2.8.3.2 Metode za kvantifikaciju fruktooligosaharida

Razvoj brze i osetljive analitičke metode za kvantifikaciju oligosaharida u hrani, u kombinaciji sa optimizacijom procesa i biološkom analizom, je ključni deo u procesu razvoja funkcionalne hrane [183]. Najkorišćenije analitičke metode za kvantifikaciju oligosaharida (OS) u hrani, praćenje procesa produkcije i karakterizacije istih uključuju tečnu hromatografiju visokih performansi (od *eng.* high-performance liquid chromatography - HPLC) i gasnu hromatografiju (od *eng.* gas chromatography - GC) sa detekcijom indeksa refrakcije (od *eng.* refractive index detection - RID), naelektrisanih čestica aerosola (od *eng.* charged aerosol detector - CAD), detekcijom rasipanje svetlosti na isparenom uzorku (od *eng.* evaporative light scattering detection - ELSD) ili detekcijom masene spektrometrije (od *eng.* mass spectrometric detection - MS) [184,185].

Tečnu hromatografiju, koja se smatra najefikasnijom metodom za kvantitativnu i kvalitativnu identifikaciju šećera, preporučuje Udruženje profesionalnih analitičkih hemičara (od *eng.* Association of Official Analytical Chemists - AOAC International) kao standardnu tehniku za rutinsku analizu ugljenih hidrata [186].

Detektori koji se koriste imaju i prednosti i nedostatke. MS detektor je izrazito skup i komplikovan za upotrebu i stoga nije pogodan za rutinsku analizu. ELSD i CAD su mnogo pristupačniji detektori, međutim ono što se javlja kao nedostatak je neophodnost korišćenja neisparljivih analita i isparljivih mobilnih faza. Korišćenje CAD detektora u analizi šećera poboljšalo je osetljivost, opseg merenja, tačnost merenja, reproduktivnost merenja, ali je tri puta skuplji od ELSD-a [187]. RID se obično smatra univerzalnim detektorom za izokratsko LC odvajanje šećera. Osetljivost ELSD-a je nešto bolja od RI detektora, ali ima nižu osetljivost za oligosaharide kratkog lanca. Takođe, ima nelinearan odziv, što rezultira nižom preciznošću od RID-a.

Mogu se naći različite validirane metode za detekciju FOS-ova kao utvrđenih prebiotika, korišćenjem HPLC-RID sistema, dostupnog u literaturi [175,188–192]. Međutim, nije izvršena potpuna validacija prema smernicama Međunarodnog saveta za usklađivanje (od *eng.* International Council on Harmonization (ICH) guidelines) [193] bilo koje od opisanih HPLC-RID metoda za FOS.

Validacija metode za detekciju OS obično je fokusirana na jedan tip OS (FOS-ovi su često ciljna grupa) i često se razvija za određeni početni materijal [191,192]. Uprkos značajnom broju opisanih metoda, od velikog značaja bi bilo i razvijanje i validiranje metode koja bi se mogla primeniti na istoj koloni sa istom mobilnom fazom za više od samo jedne vrste oligosaharida. Ovakva metoda bila bi korisna za laboratorije koje se bave istraživanjem više tipova OS i razvojem novih prebiotika.

2.9 Primena fruktooligosaharida

Primena FOS-ova kao prebiotika je široka: hrana i piće (cerealijske, hleb, peciva, kolači, fermentisano meso, suva hrana), kao suplementi u dnevnoj ishrani (hrana, ishrana, dečije formule), dodatak životinjskoj hrani. FOS-ovi se naročito koriste u kombinaciji sa veštačkim zaslađivačima, poboljšavajući slatkoću i zaostali ukus u ustima. Na osnovu studija urađenih od strane Svetske zdravstvene organizacije (od *eng.* World Health Organization – WHO) pokazano je da dnevni unos prebiotika (gde spadaju i FOS-ovi) varira od 5 do 20 g, što predstavlja 1 - 4% od ukupne količine hrane koju čovek unese na dnevnom nivou [194], pri čemu kako pokazuju studije, dnevni unos FOS-ova u Americi iznosi oko 1 - 4 g, dok u Evropi taj broj varira od 3 do 11 g [195].

Studije su pokazale da FOS-ovi imaju sposobnost povećanja apsorpcije magnezijuma, smanjuju mogućnost nastanka raka debelog creva i stimulišu povećanje laktata i kratkolančanih masnih kiselina (acetat, propionat, butirat) i pozitivno deluju na imuni sistem [13,14]. Zbog povoljnog efekta koji imaju na zdravlje ljudi njihovu upotrebu je dozvolila EFSA (od *eng.* European Food Safety Authority) [196].

Oligosaharidi koji imaju ulogu prebiotika su veoma zastupljena komponenta majčinog mleka [197]. Nalaze se i u formulama za novorođenčad kao jedna od glavnih komponenti stimulišući rast dobrih bakterija kao što su *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* [198]. Efekti ovakvog tipa ishrane ogledaju se u pravilnom razvoju gastrointestinalnog trakta i pozitivnim razvojem metabolizma [199,200].

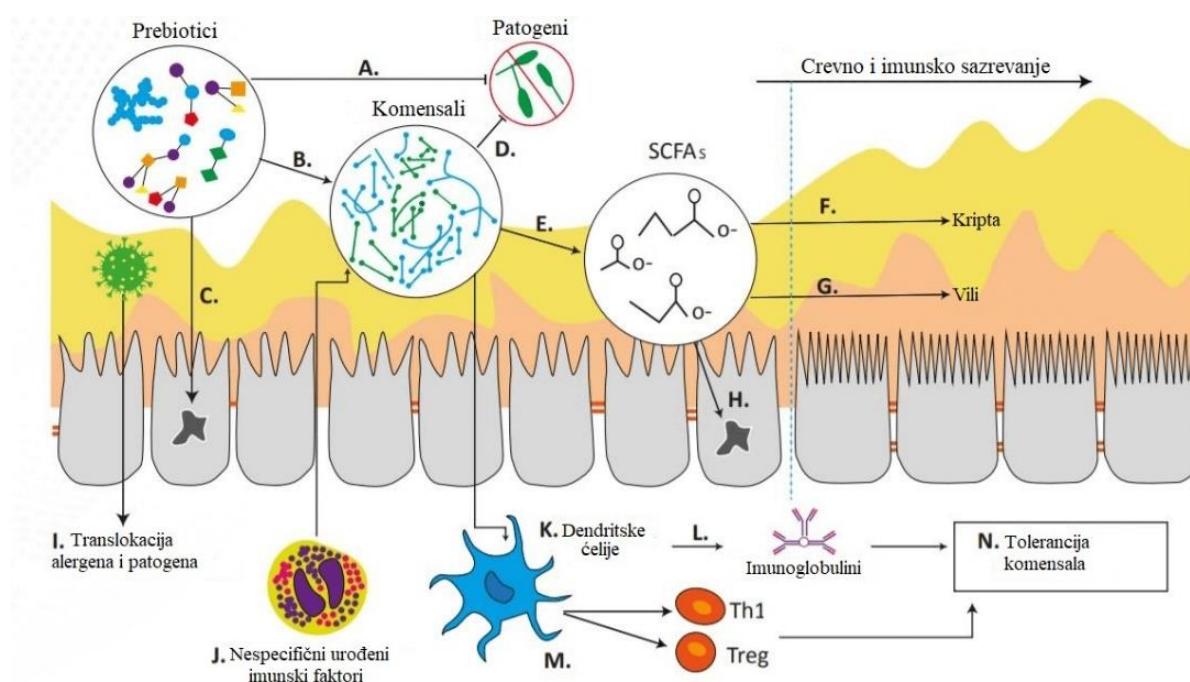
2.9.1 Prebiotici - definicija i uloga

Uzimajući u obzir način na koji utiču na probiotike, a samim tim i na čitav gastrointestinalni trakt, prebiotici poslednjih godina dobijaju sve više pažnje [201,202]. Koncept prebiotika je predstavljen pre skoro 30 godina i prvu definiciju prebiotika dali su Gibson i Roberfroid još 1995. godine [203]. Razne naučne zajednice i dalje raspravljaju o definiciji prebiotika, njihovoj ulozi u zdravlju ljudi i održavanju funkcionalnog gastrointestinalnog trakta, kao i o primeni u zdravstvu i raznim granama (prehrambene) industrije [194,201,204]

Najprihvaćeniju definiciju prebiotika predložili su Gibson et al., 2017. godine i ona pod prebiotikom podrazumeva "supstrat koji mikroorganizmi domaćina selektivno koriste i pružaju domaćinu zdravstvene benefite" [167]. Ova definicija proširuje koncept prebiotika tako da uključuje supstance koje nisu ugljeni hidrati, aplikaciju istih na drugim mestima na telu osim gastrointestinalnog trakta i različite kategorije prebiotika pored onih koji se koriste u hrani [167]. Probiotici su "živi mikroorganizmi koji pojačavaju imunološki sistem domaćina kad se daju u odgovarajućim koncentracijama i omogućavaju organizmu da proizvodi odgovarajuća antitela za odbranu od patogenih" [205,206].

Poslednjih godina se radi na sprovođenju inovativne metode koja podrazumeva razvoj i upotrebu simbiotika kako bi se domaćinu pružile odgovarajuće zdravstvene beneficije. Simbiotici su definisani kao kombinacija probiotika i prebiotika koji stimulišu aktivnost endogenih mikroba i poboljšavaju njihovo preživljavanje tokom nepovoljnih uslova u gastrointestinalnom traktu [207] (slika 9).

Svakodnevne promene koje nastaju u mikrofliori GITa prozrokovana nepravilnom ishranom, stresom, brzim načinom života, mogu dovesti do razvoja/patogeneze određenih bolesti kao što su gojaznost, inflamatorna bolest creva (od *eng.* IBD), dijabetes, bolest masne jetre (od *eng.* NAFLD), dijareja povezana sa dugotrajnom konzumacijom antibiotika, kolitis, zatvor, kolorektalni rak, hepatična encefalopatija, hiperholesterolemija, reumatoidni artritis [208–210]. Suplementi i probiotici koji sadrže prebiotike, kao što su fruktooligosaharidi (FOS), galaktooligosaharidi (GOS), izomaltooligosaharidi (IMO) mogli bi da umanje mogućnost nastajanja ovih bolesti povećavanjem rasta korisnih bakterija u mikrofliori creva [211].



Slika 9. Shematski prikaz uticaja prebiotika na neke fiziološke procese (preuzeto i prilagođeno iz [212])

Poznato je i dokazano da upotreba prebiotika pozitivno utiče na mikrofloru GIT-a a samim tim na zdravlje domaćina [167,174]. Međutim, upotreba prebiotika u ljudskoj ishrani je nedovoljna širom sveta i stoga javlja se potreba za povećanjem njihove proizvodnje i primene u prehrambenim proizvodima. Globalno se očekuje da će tržište prebiotika nastaviti da raste, što ukazuje na potrebu daljeg razvoja njihove proizvodnje [213]. Poznati prebiotici koji se koriste uključuju inulin, fruktooligosaharide, galaktooligosaharide, ksilooligosaharide, izomaltooligosaharide i laktulozu [166,214,215]. Veliki broj studija usmeren je ka inulinu, fruktooligosaharidima i galaktooligosaharidima [166,214,215]. Pokazano je da ovi saharidi imaju istoriju bezbednog korišćenja i da su bezbedni za upotrebu u ishrani [216].

To indukuje potrebu za istraživanjem novih i poboljšanih enzima inulinaznog kompleksa, uzimajući u obzir njihovi ulogu u produkciji prebiotika – fruktooligosaharida (FOS). Upravo je potreba za novim enzimima podstakla istraživače da izoluju i ispituju nove izolate gljiva iz različitih staništa, što često predstavlja važnu polaznu tačku u pronalasku novih proteina/enzima [7,48].

Jedna od važnih osobina FOS-ova i drugih prebiotika, koja im omogućava da ispolje benefit u humanom organizmu je antioksidativnost.

2.9.2 Antioksidativnost fruktooligosaharida

Pokazano je da neki FOS-ovi poseduju antioksidativnu aktivnost [217–220], što predstavlja važnu karakteristiku aditiva koji se koriste u hrani. Primećeno je da je antioksidativna aktivnost "aquamiela" četiri puta veća nakon enzimskog tretmana [221]. Do povećanja antioksidativne aktivnosti se pretpostavlja da dolazi usled parcijalne enzimske degradacije inulina i oslobađanja FOS-ova i drugih jedinjenja koja bi mogla da indukuju formiranje novih antioksidanata [220,221]. Istraživanja su pokazala da dodatak fruktooligosaharida jogurtu povećava njegov antioksidativni potencijal za čak 13% [218].

Tokom raznih metaboličkih procesa u ćeliji nastaju slobodni radikali za koje je poznato da ukoliko se ne uklone iz organizma mogu da oksiduju i oštete različite makromolekule kao što su lipidi, proteini i nukleinske kiseline, što u kasnijim fazama može da dovede do degenerativnih promena i bolesti. Ulogu u njihovom uklanjanju, pored enzima (superoksid dismutaza, peroksidaza, glutation reduktaza, katalaza), imaju i različita jedinjenja – antioksidanti, koja imaju sposobnost da slobodnom radikalu predaju jedan elektron i prevedu ga u neutralno/nereaktivno jedinjenje. S obzirom na to da su antioksidanti u stanju da neutrališu slobodne radikale, smatra se da imaju važnu ulogu u prevenciji raznih bolesti [222], što je i jedan od razloga zbog kojih se u ishranu preporučuje hrana bogata antioksidantima.

2.9.2.1 Mehanizmi delovanja antioksidanata

Testovi za određivanje antioksidativne aktivnosti zasnivaju se na različitim mehanizmima delovanja antioksidanata: transferu atoma vodonika (od eng. „hydrogen atom transfer“ HAT), elektron-transferu (od eng. „single electron transfer“ - SET) i gubitku protona koji prati reakciju antioksidanta (od eng. „sequential proton loss electron transfer“ – SPLET). Antioksidanti mogu da deluju preko HAT, SET, SPLET ili kombinacijom svih mehanizama [223]. Razlikovanje ovih mehanizama je komplikovano, pogotovo jer se često dešavaju simultano.

Iako je krajnji rezultat reakcije svih mehanizama isti, kinetika, uticaj rastvarača, promena pH imaju veliki uticaj na efikasnost antioksidanasa i na njihovom ponašanju u kompleksnim sistemima [224]. SET mehanizam je veoma brz (nekoliko femtosekundi), nije difuziono kontrolisan i pri porastu pH, zbog jonizacije, povećava se dostupnost elektrona. S druge strane, HAT mehanizam je sporiji proces uslovljen difuzijom, ne zavisi od pH, ali je inhibiran rastvaračima sa kojima stvara vodonične veze (alkohol). SPLET mehanizam zavisi od pH sredine, s obzirom da mehanizam uglavnom ispoljavaju jako kiseli molekuli kod kojih je moguća disocijacija protona [225].

2.9.2.2 Metode za određivanje antioksidativnosti

2.9.2.2.1 FRAP metoda

Redukcija antioksidanasa sa Fe (III) kompleksom tzv. FRAP test (od eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) je nespecifičan redoks kolorimetrijski test koji je povezan sa molarnom koncentracijom prisutnog antioksidansa. FRAP test zasniva se na redukciji Fe^{3+} jona u kompleksu Fe^{3+} tripiridiltriazin (Fe^{3+} -TPTZ) do Fe^{2+} (Fe^{2+} -TPTZ), pri niskim vrednostima pH. S obzirom na to da je apsorpcioni maksimum (Fe^{2+} -TPTZ) kompleksa na 595 nm, povećanje apsorpcije proporcionalno je ukupnoj redukujućoj moći testiranog uzorka. Rezultati se izražavaju kao mM ili μM ekvivalent Fe^{2+} jona. Iako je FRAP test razvijen za određivanje antioksidativnog kapaciteta plazme, koristi se za određivanje antioksidativne sposobnosti različitih uzoraka. FRAP test funkcioniše po principu prenosa jednog elektrona (SET), što mu je ujedno i mana, jer ne može da se koristi za identifikaciju potencijalnih antioksidanata koji rade preko HAT mehanizma [224].

2.9.2.2.2 DPPH metoda

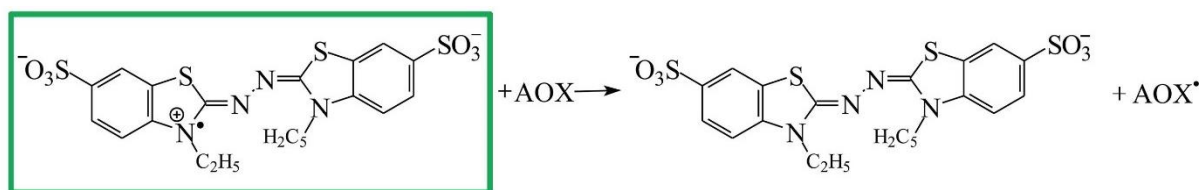
DPPH metoda koju su opisali Brand-Williams, Cuvelier i Berset [226], a kasnije modifikovali Sánchez-Moreno, Larrauri i Saura-Calixto [227], za određivanje antioksidativnog kapaciteta koristi radikale DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). DPPH $^{\bullet}$ radikal ima maksimum apsorpcije na 515 nm i predstavlja stabilan radikal sa nesparenim elektronom koji je delokalizovan kroz ceo molekul. Reakcijom sa drugim radikalom, elektronom ili atomom vodonika, dolazi do gubitka ljubičaste boje na 515 nm.

Pomoću standardne prave izračunava se koliko je radikala DPPH zaostalo. Parametar EC50 koji ukazuje na 50% smanjenja DPPH radikala izražava se kao gram uzorka po gramu DPPH radikala u reakcionoj smeši, dok se antiradikalna efikasnost (AE) izračunava kao recipročna vrednost EC50 ($\text{AE}=1/\text{EC50}$) [228].

DPPH testom se može meriti antioksidativnost jedinjenja koja reaguju po SET i HAT mehanizma. S obzirom na to da se DPPH zbog svoje lipofilne prirode rastvara u organskim rastvaračima - najčešće u metanolu, favorizovan je SET mehanizam. Jednostavna metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti malih organskih molekula. Stabilan je radikal, što omogućava da se prati uticaj drugih parametara (temperatura, reakciono vreme) na reakciju [224].

2.9.2.2.3 ABTS metoda

ABTS metoda za određivanje antioksidativnog kapaciteta se zasniva na korišćenju ABTS radikalskih katjona ($\text{ABTS}^{+\bullet}$), koji nastaju u reakciji između ABTS-a (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) i APS-a (amonijum-persulfata). Dobijeni radikali maksimum apsorpcije imaju na 734 nm. Ukoliko jedinjenje koje se ispituje vezuje slobodni radikal, doći će do obezbojavanja tamno zelenog rastvora, odnosno smanjenja koncentracije $\text{ABTS}^{+\bullet}$ radikala (Slika 10). Smanjenje apsorpcije ispitivanog uzorka na 734 nm u odnosu na kontrolu je proporcionalno njegovoj antioksidativnoj aktivnosti, u smislu neutralisanja slobodnih radikala [229]. Mehanizam antioksidativnosti ide preko HAT mehanizma, ABTS test može da se koristi i za HAT i za SET antioksidanse [224].



Slika 10. Struktura i reakcija $\text{ABTS}^{+\bullet}$ radikala (preuzeto i prilagođeno iz [230])

Rezultati dobijeni ABTS testom mogu se uporediti sa rezultatima DPPH testa i mogu se smatrati potvrdom preciznosti metode. Međutim, metoda u kojoj se koriste ABTS radikali ima prednost u odnosu na DPPH metodu, zbog mogućnosti rada na različitim pH vrednostima i određivanja antioksidativnih osobina i hidrofilnih i lipofilnih jedinjenja. Kao standard se koristi Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina), analog vitamina E rastvoran u vodi, dok se u nekim radovima koristi i askorbinska kiselina (vitamin C), zbog svoje cene i dostupnosti [228].

2.9.2.2.4 ORAC metoda

Kapacitet apsorpcije radikala kiseonika tzv. ORAC test (od *eng.* Oxygen Radical Absorbance Capacity) se zasniva na inhibiciji peroksi-radikalom ($\text{ROO}^{\bullet}$) izazvane oksidacije ciljnog molekula, pri čemu se antioksidativna aktivnost bazira na prekidu radikalskog lanca reakcija transferom atoma vodonika. Peroksi radikal ima sposobnost da direktno reaguje sa fluorescentnom probom, pri čemu nastaje oksidativno modifikovani nefluorescentni proizvod. Kada se doda antioksidant u ovakav sistem, dolazi do smanjenja brzine formiranja nefluorescentnog proizvoda, odnosno dolazi do sporijeg smanjenja fluorescencije u odnosu na kontrolnu reakciju bez antioksidanta. Kao izvor peroksi-radikala uobičajeno se koristi AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidrohlorid), a kao fluorescentna proba fluorescein. Fluorescencija se snima sve dok ne dostigne vrednost nule. Talasna dužina ekscitacije je na 493 nm, a talasna dužina emisije je na 515 nm. Mehanizam ide preko HAT transfera, a rezultati se izražavaju kao ekvivalenti Trolox-a. Može se koristiti i za lipofina i hidrofilna jedinjenja, što je naročito značajno kada se ispituju različiti biljni ekstrakti, koji imaju obe komponente [224].

3 Naši radovi

Produkcija inulinaza odgovornih za sintezu FOS-ova filamentoznim gljivama roda *Aspergillus* je kompleksan proces i veoma aktuelan. Razumevanje procesa produkcije se može postići proučavanjem nekoliko faza. U tom smislu su postavljeni sledeći ciljevi ovog rada:

- razvijanje testa za brzu selekciju inulinaznih proizvođača među izolatima gljiva iz roda *Aspergillus*,
- identifikacija izolata *Aspergillus* spp. koji su ocenjeni kao dobri proizvođači inulinaza tehnikama molekularne biologije,
- ispitivanje potencijala za sintezu mikotoksina među potencijalnim proizvođačima inulinaze,
- optimizacija uslova za produkciju inulinaznog kompleksa enzima upotrebom prirodnih i otpadnih materijala supstrata u uslovima SSF-a (solid state fermentation),
- razvijanje zimograma za simultanu detekciju inulinaznog kompleksa enzima,
- produkcija FOS-ova upotrebom inulinaznog kompleksa enzima *A. welwitschiae* FAW1
- karakterizacija dobijenih FOS_s i FOS_h
- prečišćavanje i biohemijska karakterizacija fruktoziltransferaze kao ključnog enzima za produkciju FOS-ova,
- karakterizacija gena *suc1* koji kodira fruktoziltransferazni enzim.

3.1 Odabir potencijalnih proizvođača inulinaza gljiva *Aspergillus* spp.

Pronalaženje novih proizvođača inulinaza među izolatima gljiva predstavlja veoma značajnu komponentu unapređenja na polju produkcije inulinaza i njihove primene u sintezi FOS-ova. Novi proizvođači su interesantni jer nude nove mogućnosti za uslove u kojim se enzimi inulinaznog kompleksa produkuju što zavisi od osobina i specifičnosti soja, a može da doprinese većoj efikasnosti produkcije. Takođe, novi sojevi gljiva potencijalno poseduju enzime sa novim karakteristikama što obećava efikasniju primenu u sintezi FOS-ova. Odabir ili skrining potencijalni producera među izolatima gljiva roda *Aspergillus* obuhvata nekoliko nezaobilaznih faza kao što su izolovanje gljiva iz prirodnih staništa, njihova i identifikacija do nivoa vrste i testiranje na mogućnost produkcije inulinaza. Kao nezaobilazna faza ovde je uključeno i ispitivanje odabranih sojeva na sintezu mikotoksina kako bi se postigao najvažniji uslov za korišćenje enzima u dobijanju FOS-ova, zato što se samo sojevi koji ne produkuju mikotoksine smatraju bezbednim za korišćenje u procesima proizvodnje hrane [30,64].

3.1.1 Izolovanje gljiva roda *Aspergillus* spp.

Za izolovanje čistih kultura korišćeni su uzorci iz različitih delova Srbije. Izolati *Aspergillus* spp. su izolovani sa različitih staništa, prikazano u Tabeli 1. U zavisnosti od uzorka sa kog se izoluje gljiva korišćene su različite metode izolovanja kao što su metoda serijskog razblaženja, metoda išarane ploče, metoda iscrpljenja. Za izolovanje i čuvanje kultura korišćene su čvrste podloge (sladni agar i PDA agar). Svi izolati su dobijeni kao čiste kulture i gajeni su do formiranja spora na PDA koje se čuvaju u glicerolu na -70°C.

Tabela 1. *Aspergillus* sekcija *Nigri* izolati korišćeni u ovom istraživanju

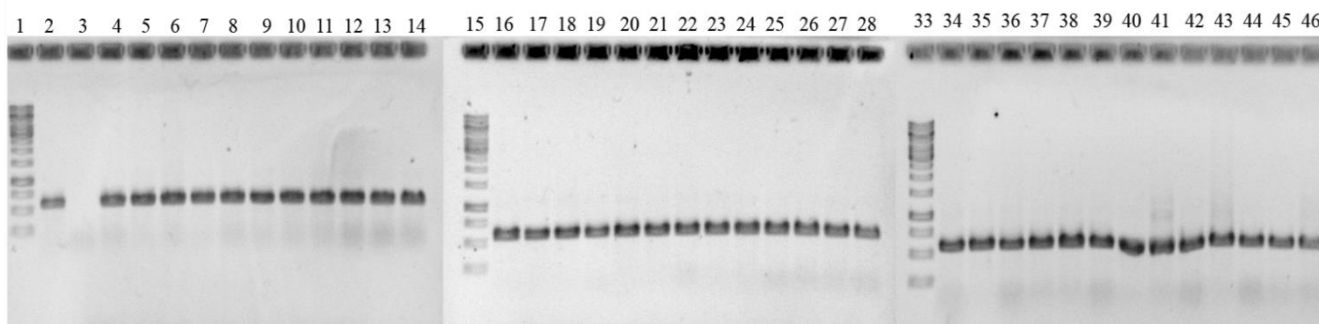
Izolat	Izvor	Vrsta
FAT 1	Sladni agar	<i>A. tubingensis</i>
FAT 2	Kora pomorandže	
FAT 25	Hleb	
FAT 26	Hleb	
FAT 27	Hleb	
FAT 28	Hleb	
FAT 29	Hleb	
FAT 30	Hleb	
FAT 31	Hleb	
FAT 32	Hleb	
FAT 33	Hleb	
FAT 34	Hleb	
FAT 35	Hleb	
FAT 36	Džem	
FAT 37	Hleb	
FAT 38	Hleb	
FAT 39	Celuloza	
FAT 40	Kesten	
FAT 41	Pirinač	
FAT 42	Smeša žitarica	
FAN 1	Limun	<i>A. niger</i>
FAN 2	Hleb	
FAN 3	Hleb	
FAN 4	Tečni medijum	
FAN 5	Skrob i ekstrakt soje	
FAN 6	<i>Sambucus racemose</i> ekstrakt	
FAN 8	Kukuruzno brašno	
FAN 9	Kukuruzno brašno	
FAN 10	Pirinač	
FAW 1	Hleb	<i>A. welwitschiae</i>
FAW 2	Hleb	
FAW 3	klindamicin	
FAW 4	Limun	
FAW 5	Džem od šljiva	
FAW 6	Pšenična slama	
FAW 7	Silaža od artičoke	
FAW 8	Želatin	
FAW 9	Sok od paradajza	
FAU 1	Zemljište	<i>A. uvarum</i>

3.1.2 Identifikacija izolovanih sojeva gljiva roda *Aspergillus* spp.

Ukupno je izolovano 39 čistih kultura sa različitih supstrata (Tabela 1) koji pokazuju morfološke karakteristike crnih *Aspergillus* vrsta (brzo rastući sa obilnom sporulacijom tamnosmeđe do crne boje) koji su podvrgnuti identifikaciji do nivoa vrste tehnikama molekularne biologije. Za identifikaciju korišćen je *CaM* marker. Pored toga što postoji baza podataka mnogobrojnih identifikovanih sojeva koja sadrži *CaM* sekvencije, ovaj identifikacioni marker se lako umnožava što je još jedan od razloga zašto se preporučuje njegovo korišćenje kod *Aspergillus* vrste [7].

Ekstrakcija genomske DNA izolata gljiva gajenih na PDA podlozi urađena je korišćenjem CTAB protokola [231]. Micelijum gljiva je homogenizovan nakon zamrzavanja u tečnom azotu. Na ovaj način razbija se ćelijski zid gljive i omogućava izlazak ćelijskog materijala. Ovo je kritičan korak jer može da dođe do delimične degradacije DNA, stoga je potrebno da se resuspendovanje ćelijskog materijala uradi brzo i efikasno uz dodatak CTAB pufera, koji sadrži 2-merkaptotanol. Nakon denaturacije proteina, pre svega DNaza koji mogu da oštete DNA, DNA je izolovana na hladno uz dodatak izopropanola. Dobijena DNA je resuspendovana u TE puferu i korišćena je u PCR (od *eng.* polymerase chain reaction) reakciji za umnožavanje *CaM* sekvencije.

Korišćenjem para prajmera CMD5/CMD6 u PCR reakciji dobijeni su amplikoni očekivane dužine (otprilike 0.6 kb) kod svih ispitanih sojeva, koji su vizuelizovani agaroznom elektroforezom, slika 11.

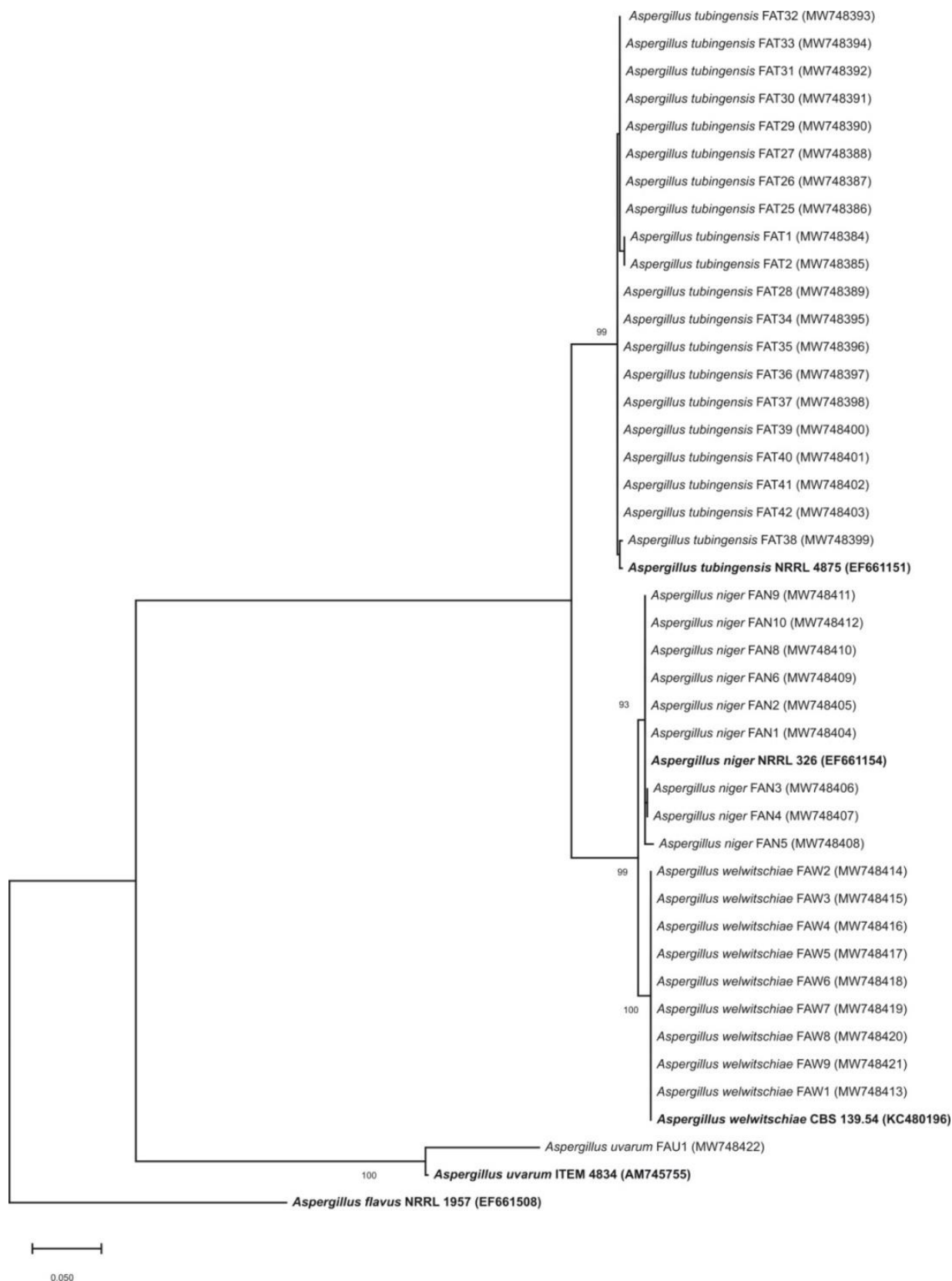


Slika 11. Detekcija gena za kalmulin umnoženog CMD5/CMD6 prajmerima, agaroznom elektroforezom; 1, 15 i 33 - 1 kb DNA markeri; 3- negativna kontrola; 2-46 redosled uzoraka sojeva *Aspergillus* opisan u Tabeli 1

Direktnim sekvenciranjem dobijeni amplikoni *CaM* gena korišćenjem istih prajmera kao i za amplifikaciju, dobijene su nukleotidne sekvencije (dužine 528-560 nt), sastavljene korišćenjem Pregap4 iz programskog paketa Staden [232], i upoređene sa sekvencama koje su javno dostupne korišćenjem MegaBlast algoritma. Dobijene sekvencije deponovane su u NCBI GenBank pod pristupnim brojevima datim na slici 12 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Sekvencije su poravnane (od *eng.* aligned) sa sekvencijama sojeva koji predstavljaju najbliže vrste koristeći ClustalX algoritam [44] i poređene u programu MEGA X [45]. Filogenetsko drvo je napravljeno na osnovu delimičnih *CaM* genskih sekvencija izolata vrsta roda *Aspergillus* sekcije *Nigri*, referentnih sojeva i *Aspergillus flavus* vrste koja je van *Nigri* sekcije, korišćenjem metode ML programa MEGA X. Model evolucije sekvencije je prvo izabran korišćenjem opcije „pronađi najbolji model“ u MEGA X. Početna stabla dobijena su primenom Neighbor-Join i BioNJ algoritama. Prikazano je drvo sa najvećom verovatnoćom. Nazivi sojeva i pristupni brojevi dati su u zagradama. Referentni sojevi su prikazani podebljano, slika 12.

U filogenetskim analizama dobijenih *CaM* sekvencija i reprezentativnih sojeva najbližih vrsta, izolati vrsta roda *Aspergillus* sekcije *Nigri* grupisani su u kladu *Aspergillus niger* i formirali su četiri odvojena podklastera sa predstavnicima četiri vrste, čime je potvrđena identifikacija 20 izolata kao *A. tubingensis*, devet kao *A. welwitschiae*, devet kao *A. niger* i jednog kao *A. uvarum* (slika 12).



Slika 12. Filogenetsko stablo od 39 sekvencija *CaM* gena izolata vrsta roda *Aspergillus* sekcije *Nigri* dobijenih u ovom radu, referentnih sojeva i *Aspergillus flavus* koji je korišćen radi ukorenjivanja. Nazivi sojeva i pristupni brojevi dati su u zagradama.

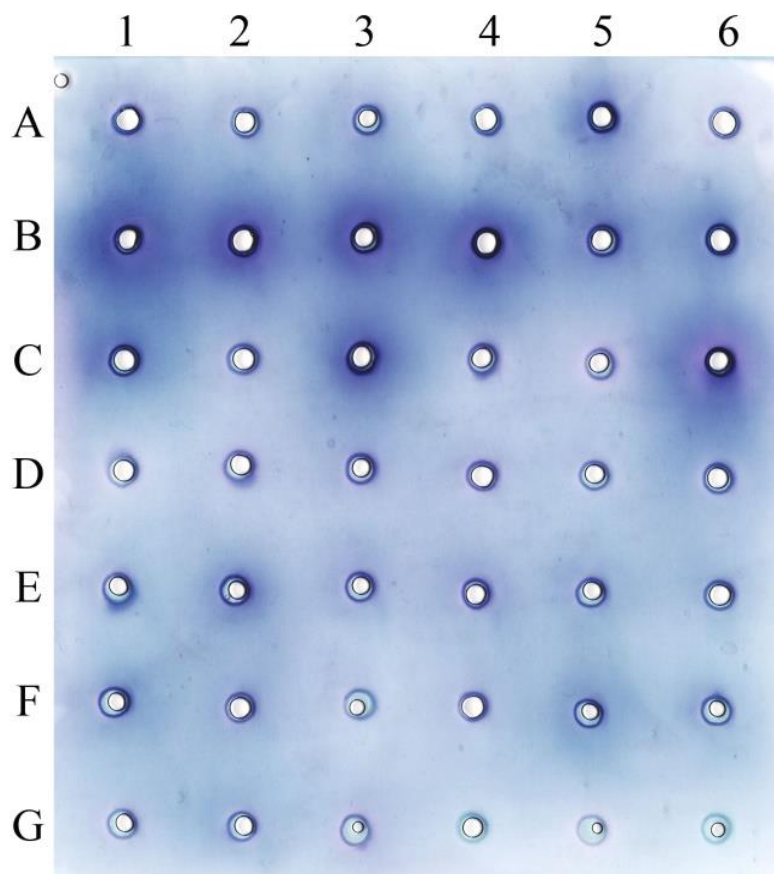
Pronalazak novih potencijalnih proizvođača među izolatima filamentoznih gljiva je značajan korak u biotehnoškom procesu produkcije enzima. Zahvaljujući genetskoj raznolikosti unutar vrsta filamentoznih gljiva pronalazak i upotreba novih proizvođača može da ponudi enzime sa drugačijim karakteristikama (supstratna specifičnost, pH i temperaturni optimumi) koje mogu biti značajne za njihovu upotrebu.

3.1.3 Razvijanje testa za brzu selekciju gljiva proizvođača inulinaznih enzima

Da bi se prevazišle mane selekcionih testova koji se koriste za izbor potencijalnih inulinaznih proizvođača među filamentoznim gljivama [7,50] za izradu ove teze razvijen je novi jedinstven test. Cilj razvoja ovog testa bio je da se za kratko vreme ispita što veći broj potencijalnih proizvođača inulinaze. Ispitivani sojevi gljiva iz naše laboratorijske banke sojeva UB483 su uzgajani na čvrstoj modifikovanoj Czapek-ovoj podlozi u kom je saharoza zamenjena ekstraktom jerusalimske artičoke bogate inulinom, koji predstavlja glavni izvor ugljenika. Fermentacija je trajala 33 h bez sporulacije. Ovako kratak period gajenja pokazao se kao dovoljan za rast gljiva i produkciju inulinaznih enzima. Kratko vreme fermentacije je veoma važno i za izbegavanje sporulacije gljiva, što je nepoželjno naročito kada se radi sa velikim brojem sojeva gljiva iz više razloga: unakrsna kontaminacija, bezbednost onih koji obavljaju posao i mogući lažni rezultati koji nastaju zbog promena u proizvodnji enzima usled pojave sledeće generacije hifa [233]. Ovom metodom može se ispitati veliki broj sojeva, smanjuje se vreme trajanja procesa, a samim tim i cena. Metoda ne zahteva upotrebu opasnih hemikalije koje ograničavaju rast, niti specijalnu opremu. Za određivanje enzimске aktivnosti se koristi fermentacioni ekstrakt.

3.1.3.1 Potraga za sojevima proizvođačima inulinaznih enzima

Sličan difuzioni kvalitativni enzimski test za ispitivanje velikog broja uzoraka poslužio je za razvijanje novog difuzionog enzimskog testa sa inkorporiranim supstratom [51]. Umesto agaroznog gela ovde je korišćen poliakrilamidni gel koji je čvršće strukture i jednostavniji za manipulaciju i dokumentovanje rezultata. Fermentacione tečnosti nanošene su u bunare napravljene na 6% poliakrilamidnom gelu sa inkorporiranim inulinom (finalna koncentracija 1%) sa međusobnim razmakom od 1 cm što omogućava ravnomernu difuziju enzima u gel i kontakt sa supstratom. Nakon inkubiranja 18 h na 37 °C, gel je obojen NBT-om u baznoj sredini, pri čemu nastaju plavo-ljubičasto obojeni precipitati proizvoda hidrolize inulina (slika 13). Za potrebe difuzionog testa optimizovana je količina dodatog enzima (20 µL), koncentracija supstrata (1% inulin) i vreme reakcije (18 h). Testirano je ukupno 39 izolata iz laboratorijske banke sojeva (prikazanih u tabeli 1) a rezultati selekcionog testa su prikazani na slici 13. Ukupno 22 izolata od 39 ispitanih su bili pozitivni: 10 izolata *A. tubingensis*, šest izolata *A. niger* i šest izolata *A. welwitschiae* (Slika 13).



Slika 13. Difuzioni test inulinazne aktivnosti izolata *Aspergillus* spp. Redosled uzoraka je naznačen shematski brojevima i slovima čiji je opis dat u tekstu

Redosled testiranih izolata je sledeći: Od A1 do B3 su izolati identifikovani kao *A. niger* (FAN1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10); od B4 do C6 su izolati identifikovani kao *A. welwitschiae* (FAW1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9); D1 je izolat identifikovan kao *A. uvarum* (FAU1); od D2 do G3 su izolati identifikovani kao *A. tubingensis* (FAT1, 2, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42); od G4 do G6 su denaturisani enzimi korišćeni kao negativna kontrola (slika 13).

Tačnost i pouzdanost difuzionog testa je potvrđena spektrofotometrijskim određivanjem enzimske aktivnosti uzoraka. Sojevima koji su pokazali aktivnost u difuzionom skrining testu potvrđena je inulinazna aktivnost enzimskim esejem [48,234], a rezultati su prikazani u Tabeli 2, predstavljeni kao U/mL. Vrednosti enzimskih aktivnosti su potvrdile pouzdanost difuzionog testa. Svi ispitani uzorci su imali inulinaznu aktivnost među kojima su uzorci sa većom vrednosti aktivnosti pokazali i veći intenzitet plavo-ljubičastih precipitata na mestu nanošenja u difuzionom gelu.

Tabela 2. Rezultati difuzionog testa i inulinazna aktivnost (U/mL)

Izolat	Vrsta	Difuzioni test	Inulinazna aktivnost (U/mL) $\pm$ SEM
FAT 1	<i>A. tubingensis</i>	-	n.t.
FAT 2	<i>A. tubingensis</i>	-	n.t.
FAT 25	<i>A. tubingensis</i>	-	n.t.
FAT 26	<i>A. tubingensis</i>	-	n.t.
FAT 27	<i>A. tubingensis</i>	+	0,098 $\pm$ 0,002
FAT 28	<i>A. tubingensis</i>	-	n.t.
FAT 29	<i>A. tubingensis</i>	+	0,101 $\pm$ 0,003
FAT 30	<i>A. tubingensis</i>	+	0,067 $\pm$ 0,006
FAT 31	<i>A. tubingensis</i>	+	0,123 $\pm$ 0,003
FAT 32	<i>A. tubingensis</i>	+	0,119 $\pm$ 0,002
FAT 33	<i>A. tubingensis</i>	-	n.t.
FAT 34	<i>A. tubingensis</i>	+	0,075 $\pm$ 0,003
FAT 35	<i>A. tubingensis</i>	+	0,104 $\pm$ 0,002
FAT 36	<i>A. tubingensis</i>	-	n.t.
FAT 37	<i>A. tubingensis</i>	-	n.t.
FAT 38	<i>A. tubingensis</i>	+	0,096 $\pm$ 0,004
FAT 39	<i>A. tubingensis</i>	+	0,122 $\pm$ 0,002
FAT 40	<i>A. tubingensis</i>	-	n.t.
FAT 41	<i>A. tubingensis</i>	+	0,193 $\pm$ 0,005
FAT 42	<i>A. tubingensis</i>	-	n.t.
FAN 1	<i>A. niger</i>	+	0,079 $\pm$ 0,007
FAN 2	<i>A. niger</i>	-	n.t.
FAN 3	<i>A. niger</i>	+	0,064 $\pm$ 0,011
FAN 4	<i>A. niger</i>	-	n.t.
FAN 5	<i>A. niger</i>	+	0,118 $\pm$ 0,007
FAN 6	<i>A. niger</i>	-	n.t.
FAN 8	<i>A. niger</i>	+	0,180 $\pm$ 0,009
FAN 9	<i>A. niger</i>	+	0,140 $\pm$ 0,007
FAN 10	<i>A. niger</i>	+	0,163 $\pm$ 0,005
FAW 1	<i>A. welwitschiae</i>	+	0,472 $\pm$ 0,004
FAW 2	<i>A. welwitschiae</i>	+	0,127 $\pm$ 0,005
FAW 3	<i>A. welwitschiae</i>	+	0,144 $\pm$ 0,007
FAW 4	<i>A. welwitschiae</i>	+	0,135 $\pm$ 0,006
FAW 5	<i>A. welwitschiae</i>	-	n.t.
FAW 6	<i>A. welwitschiae</i>	+	0,468 $\pm$ 0,002
FAW 7	<i>A. welwitschiae</i>	-	n.t.
FAW 8	<i>A. welwitschiae</i>	-	n.t.
FAW 9	<i>A. welwitschiae</i>	+	0,366 $\pm$ 0,004
FAU 1	<i>A. uvarum</i>	-	n.t.

n.t. – nisu testirani

SEM – Standardna greška u merenju (od eng. standard error measurement)

Među svim ispitivanim vrstama pronađeni su izolati koji proizvode i oni koji ne proizvode inulinaze. Većina izolata *A. niger* i *A. welwitschiae* i polovina izolata *A. tubingensis* dali su pozitivne rezultate u difuzionom testu. Nakon određivanja inulinazne aktivnosti spektrofotometrijskom metodom, tri soja *A. welwitschiae* (FAW1, FAW6, FAW9) pokazali su se

kao najbolji produceri inulinaznih enzima. S obzirom da je poznato da gljive roda *Aspergillus* imaju sposobnost produkcije mikotoksina [62], određivanje produkcije mikotoksina, bio je neophodan korak, ne bi li se omogućila njihova bezbedna upotreba kao proizvođača enzima čija bi primena bila u prehrambenoj industriji [4].

3.2 Mikotoksini

Potencijalni inulinazni proizvođači su ispitivani na mogućnost produkcije glavnih mikotoksina, ohratoksin A (OTA) i fumonizini (FB).

3.2.1 Produkcija enzima i mikotoksina

Svi izolati *A. welwitschiae* podvrgnuti su daljim analizama, a prvi korak je bio da se utvrdi da li se mikotoksini proizvode u uslovima koji su optimalni za proizvodnju enzima. SSF (fermentacija u čvrstom stanju) je dobar izbor za gajenje gljiva i proizvodnju enzima zahvaljujući svojim prednostima, kao što su niska cena, visoka efikasnost, smanjena katabolička represija, lako održavanje, jednostavno povećanje količine [235]. Agroindustrijski otpad i/ili nusproizvodi sastoje se uglavnom od složenih ugljenih hidrata i sirovih proteina koji mogu biti korisni nutrijenti za rast mikroba, ali i kao inducibilni supstrat za proizvodnju enzima [9,68]. Lomljeno zrno tritikalea, koji se u ranijim eksperimentima pokazao kao dobar inducer različitih enzimskih kompleksa [77] korišćen je za gajenje izolata *A. welwitschiae*.

Ekstrakcione tečnosti dobijene nakon fermentacije korišćene su za ispitivanje prisustva mikotoksina i za određivanje inulinazne aktivnosti. Pored toga svim uzorcima je određena koncentracija proteina Bradfordovom metodom (Tabela 3). Najveća inulinazna aktivnost dobijena je u uzorcima FAW1 i FAW6 (Tabela 3).

Tabela 3. Inulinazna aktivnost *A. welwitschiae* sojeva gajenih na čvrstoj podlozi (lomljeno zrno tritikalea) u 96 satu produkcije

Izolat	Koncentracija proteina (mg/mL)	Inulinazna aktivnost (U/mL)	Specifična inulinazna aktivnost (U/mg)	Produktivnost (U/mL/h)	Mikotoksini (µg/mL)
FAW 1	0,22±0,01 ^a	10,4±0,8 ^a	46,057±3,527 ^a	0,11±0,01 ^a	0 ^a
FAW 3	0,326±0,012 ^b	1,087±0,035 ^b	3,437±0,115 ^b	0,01±0,00 ^b	1,87 ^b
FAW 4	0,257±0,015 ^{bc}	0,890±0,026 ^{bc}	3,443±0,107 ^{bc}	0,01±0,00 ^{bc}	2,62 ^c
FAW 6	0,33±0,02 ^d	6,353±0,337 ^d	18,943±1,017 ^d	0,063±0,006 ^d	0 ^{ad}
FAW 9	0,309±0,001 ^{bce}	1,450±0,095 ^{bce}	4,613±0,301 ^{bce}	0,013±0,006 ^{bce}	0.39 ^e

Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost tri nezavisna merenja ± sd (*eng.* standard deviation).

Vrednosti obeležene istim slovom se statistički ne razlikuju značajno prema Tukey-ovom testu ($p < 0,05$).

Svi dobijeni ekstrakti sojeva *A. welwitschiae* podvrgnuti su HPLC analizi koja za cilj ima utvrđivanje prisustva mikotoksina u podlozi odnosno u dobijenoj ekstrakcionoj tečnosti.

3.2.1.1 HPLC analiza mikotoksina

Analizirano je prisustvo fumonizina (FB1 i FB2) kao i prisustvo ohratoksina (OTA). Proizvodnja FB2 je potvrđena u izolatima FAW2, FAW3, FAW4, FAW5 i FAW9 nakon HPLC analize njihovih fermentacionih tečnosti, dok ni u jednom od analiziranih izolata nije otkrivena proizvodnja FB1 (Tabela 4).

Da bi se proizvođač enzima koji se koristi u hrani mogao okarakterisati kao bezbedan nije dovoljno ispitati prisustvo mikotoksina u enzimskom preparatu (fermentacionoj tečnosti) već je neophodno ispitati i njegov genetski potencijal za produkciju mikotoksina kako bi se obezbedilo da u slučaju malih promena u produkcionoj fermentaciji ne postoji mogućnost produkcije mikotoksina [30,55]. Ova analiza je podrazumevala ispitivanje prisustva klastera gena odgovornih za ekspresiju mikotoksina ohratoksin A (OTA) i fumonizina (FB).

3.2.1.2 Analiza klastera gena mikotoksina

Svi izolati *A. niger* i *A. welwitschiae* analizirani su na prisustvo šest gena u *fum* klasteru i četiri gena u *ota* klasteru i dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 4. HPLC analiza pokazala je da nijedan od testiranih sojeva *A. welwitschiae* nije proizveo ohratoksin, što je potvrđeno i PCR analizama klastera *ota* gena. Štaviše, naši rezultati ukazuju na skoro potpuno brisanje *ota* klastera u *A. welwitschiae* sojevima što je u saglasnosti sa prethodno objavljenim rezultatima Susca et al [63]. Iako je dokazano da postoje izolati koji ne produkuju ohratoksin i pored nepotpune delecije *ota* klastera [236], potpuno brisanje *ota* klastera ukazuje na gubitak sposobnosti za proizvodnju ohratoksina pod bilo kojim uslovima. U većini studija procenat sojeva *A. welwitschiae* koji produkuju ohratoksin je veoma nizak i varira od 0 do 1% [236–238], dok ređe ide i do 25% identifikovanih gljiva [63].

Kod svih izolata *A. niger* došlo je do umnožavanja svih šest *fum* gena, dok se kod izolata *A. welwitschiae* javljaju dva obrasca amplifikacije. Prvi obrazac amplifikacije prisutan je kod dva izolata (FAW1 i FAW6), kod kojih je potvrđeno prisustvo samo *fum1* i *fum15* gena za razliku od šest izolata (FAW2, FAW3, FAW4, FAW5, FAW7 i FAW9) kod kojih je prisutan drugi obrazac amplifikacije kojim je potvrđeno prisustvo *fum1*, *fum7*, *fum10*, *fum15* i *fum21I* gena. Amplifikacija *fum21I* gena nije dobijena ni u jednom od *A. welwitschiae* izolata (Tabela 4).

Direktno sekvenciranje dobijenih *fum1* amplicona iz *A. niger* i *A. welwitschiae* dalo je nukleotidne sekvence dužine 630-678 nt, koje su deponovane u NCBI GenBank pod pristupnim brojevima datim na slici 14. Filogenetske analize zasnovane su na parcijalnim *fum1* sekvencama gena 19 sojeva *A. niger* i 18 sojeva *A. welwitschiae* sojeva iz naše laboratorijske banke sojeva pri čemu su upoređene sa drugim, prethodno opisanim i okarakterisanim sojevima. Neukorenjeno *fum1* filogenetsko stablo ukazuje na grupisanje sojeva *A. welwitschiae* u dva odvojena klastera. Jedan klaster obuhvata samo sojeve koji ne proizvode FB, dok drugi klaster sadrži i jedne i druge sojeve. Međutim, nisu formirani posebni klasteri za *A. niger* i *A. welwitschiae* izolate.

Ni kod jednog od testiranih izolata *A. niger* i *A. welwitschiae* nije došlo do amplifikacije nijednog od *ota* gena. HPLC analiza potvrdila je rezultate dobijene analizom gena i pokazala da analizirani izolati *A. welwitschiae* ne proizvode ohratoksin u ovim uslovima gajenja (Tabela 4). Takođe dobijeni rezultati pokazuju da je od osam testiranih sojeva *A. welwitschiae* pet proizvelo fumonizin B2 (FB2), dok su ostala tri (FAW1, FAW6, FAW7) bila negativna (Tabela 4).

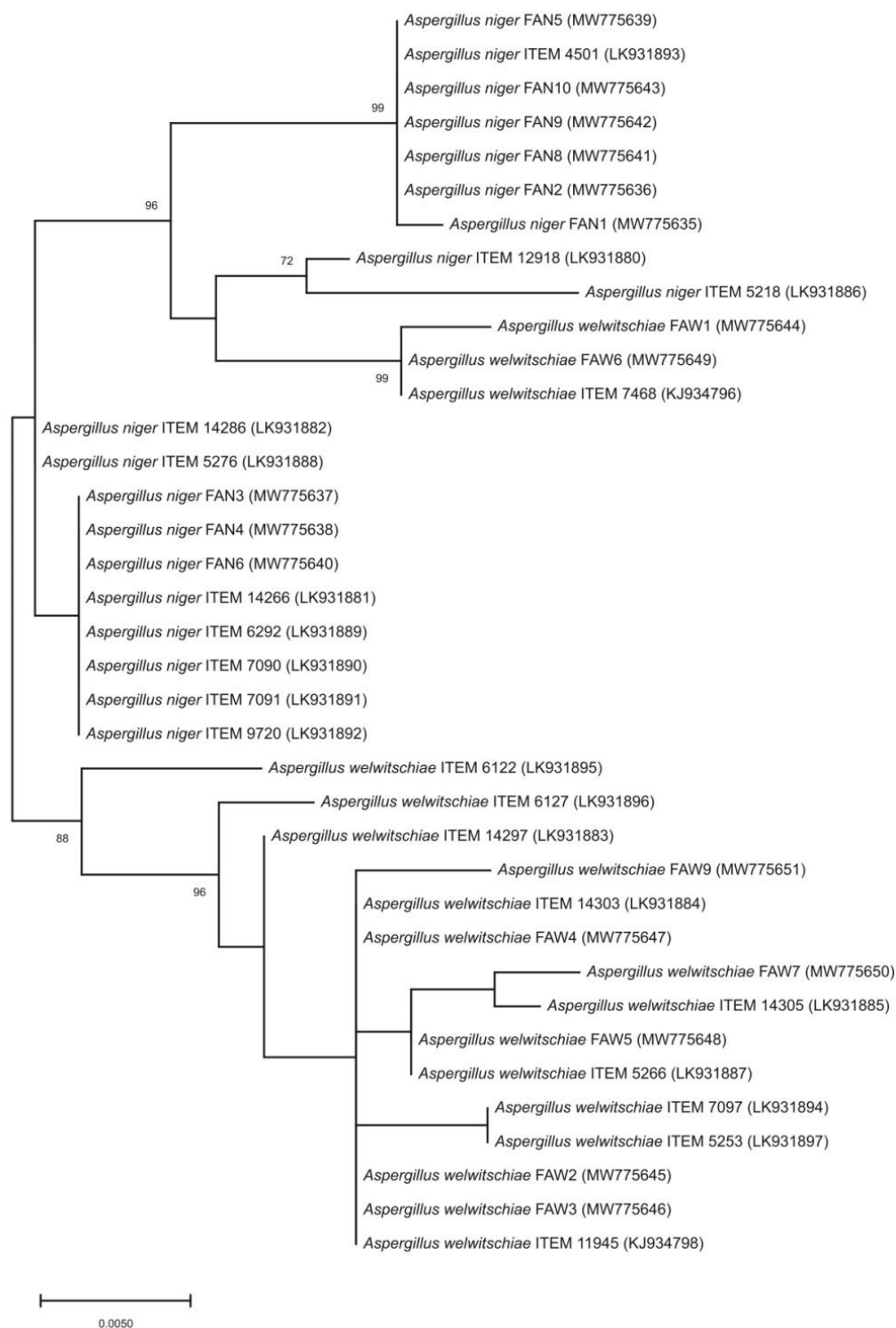
Tabela 4. Produkcija fumonizina (FB1, FB2) i ohratoksina A (OTA) i umnožavanje gena koji kodiraju mikotoksine kod *A. niger* i *A. welwitschiae* izolata

Vrsta	Izolat	Mikotoksini (µg/mL)			Klaster gena za fumonizin						Klaster gena za ohratoksin
		FB1	FB2	OTA	<i>fum</i> 1	<i>fum</i> 7	<i>fum</i> 10	<i>fum</i> 15	<i>fum21</i> I	<i>fum21</i> II	<i>Ota</i> 1,2,3,5
<i>A. niger</i>	FAN 1	n.t.	n.t.	n.t.	+	+	+	+	+	+	-
<i>A. niger</i>	FAN 2	n.t.	n.t.	n.t.	+	+	+	+	+	+	-
<i>A. niger</i>	FAN 3	n.t.	n.t.	n.t.	+	+	+	+	+	+	-
<i>A. niger</i>	FAN 4	n.t.	n.t.	n.t.	+	+	+	+	+	+	-
<i>A. niger</i>	FAN 5	n.t.	n.t.	n.t.	+	+	+	+	+	+	-
<i>A. niger</i>	FAN 6	n.t.	n.t.	n.t.	+	+	+	+	+	+	-
<i>A. niger</i>	FAN 8	n.t.	n.t.	n.t.	+	+	+	+	+	+	-
<i>A. niger</i>	FAN 9	n.t.	n.t.	n.t.	+	+	+	+	+	+	-
<i>A. niger</i>	FAN 10	n.t.	n.t.	n.t.	+	+	+	+	+	+	-
<i>A. welwitschiae</i>	FAW 1	0	0	0	+	-	-	+	-	-	-
<i>A. welwitschiae</i>	FAW 2	0	2,85	0	+	+	+	+	-	+	-
<i>A. welwitschiae</i>	FAW 3	0	1,87	0	+	+	+	+	-	+	-
<i>A. welwitschiae</i>	FAW 4	0	2,62	0	+	+	+	+	-	+	-
<i>A. welwitschiae</i>	FAW 5	0	2,38	0	+	+	+	+	-	+	-
<i>A. welwitschiae</i>	FAW 6	0	0	0	+	-	-	+	-	-	-
<i>A. welwitschiae</i>	FAW 7	0	0	0	+	+	+	+	-	+	-
<i>A. welwitschiae</i>	FAW 9	0	0,39	0	+	+	+	+	-	+	-

n.t. - nisu testirani

Međutim, kod jednog *A. welwitschiae* soja (FAW7) otkriven je nedostatak proizvodnje FB, čak i u prisustvu kompletnih gena *fum* klastera. Dva su moguća razloga takvog ishoda: I) proizvodnja fumonizina može varirati pod različitim uslovima, stoga se ne može isključiti da soj može proizvesti FB pod nekim drugim uslovima gajenja gljive II) na proizvodnju FB mogu uticati regulatorni geni koji se nalaze izvan *fum* klastera, kao što je slučaj sa *Fusarium* sp [239].

Rezultati analize dobijenih sekvenci gena *fum1*, koji se smatra ključnim genom u biosintetskom putu FB, jer kodira poliketid sintazu [240], u skladu su sa rezultatima filogenetske analize *fum1* i *fum15* nukleotidnih sekvenci, objavljenim ranije [64]. Filogenija delimične *fum1* nukleotidne sekvence, pokazala je razdvajanje sojeva *A. welwitschiae* u dve dobro podržane klade, od kojih se jedna sastojala isključivo od sojeva koji ne proizvode fumonizine, dok se druga sastojala od sojeva koji u zavisnosti od uslova mogu da proizvode ili ne proizvode fumonizine (Slika 14).



Slika 14. Filogenetsko stablo 17 *fum1* sekvencija izolata vrsta roda *Aspergillus* sekcije *Nigri* dobijenih u ovom radu. Nazivi sojeva i pristupni brojevi dati su u zagradama.

Evoluciono drvo napravljeno je korišćenjem ML metode i Kimura 2-parametarskog modela od 17 *fum1* sekvencija izolata vrsta roda *Aspergillus* sekcije *Nigri* dobijenih u ovom radu. Prikazano je drvo sa najvećom verovatnoćom. Stablo je nacrtano u razmeri, sa dužinama grana merenim brojem promena, slika 14.

Za razliku od rezultata analize *ota* gena koji su u potpunosti konzistentni sa prethodno objavljenim rezultatima [63], analiza fumonizina je otkrila nešto drugačiju situaciju. U našem radu, sojevi *A. welwitschiae* sa nekompletnim PCR uzorkom klastera *fum* gena (u poređenju sa *A. niger* i f-1 obrascem *A. welwitschiae*) pokazali su se sposobnim da proizvedu FB, iako se nepotpunost ogledala kao prisustvo samo delimične amplifikacije *fum 21* gena. U radu Susca et al [63] samo sojevi *A. welwitschiae* sa intaktnim klasterom *fum* (u poređenju sa *A. niger*) i šablonom amplifikacije f-1 *fum* gena su u stanju da proizvode fumonizine. Nedostatak amplifikacije *fum 21I* gena kod *A. welwitschiae* koji produkuje fumonizin možda ne znači nefunkcionalni *fum 21*, s obzirom da su Sun et al. [241] pokazali da je funkcionalni *fum 21* neophodan za sintezu FB u *Fusarium proliferatum*.

Soj FAW7 je prvobitno izabran kao dobar proizvođač inulinaze i to pri uslovima u kojima nije dolazilo do koprodukcije mikotoksina (FB). Međutim, analizom gena ustanovljeno je postojanje *fum* klastera što u nekim uslovima gajenja može dovesti do produkcije mikotoksina, pa samim tim ovaj soj predstavlja značajan rizik ukoliko se upotrebljava kao proizvođač enzima za ishranu. Ohrabruje činjenica da među odabranim proizvođačima inulinaza dva soja FAW1 i FAW6 ne produkuju ni jedan od mikotoksina (OTA i FB) i ne poseduju potencijal za njihovu produkciju potencijal za dalju evaluaciju i moguću upotrebu u proizvodnji inulinaza.

Gajenjem na prirodnom supstratu (lomljeno zrno tritikala) navedeni soj FAW1 ne produkuje nijedan potencijalni mikotoksin. Potpuno odsustvo *ota* genskog klastera i dela *fum* genskog klastera, pokazano i na molekularnom nivou, potvrđuje da ne postoji mogućnost produkcije toksina čak i ukoliko se gljiva gaji na nekoj podlozi drugačijeg sastava. Uz rezultate dobijene difuzionim testom (Slika 13) i određivanjem inulinazne aktivnosti DNS-om (Tabela 3) došli smo do zaključka da FAW1 predstavlja najpogodniji soj za optimizaciju produkcije enzima inulinaznog kompleksa za upotrebu u prehrambenoj industriji.

3.3 Produkcija enzima odabranim sojem *A. welwitschiae* FAW1

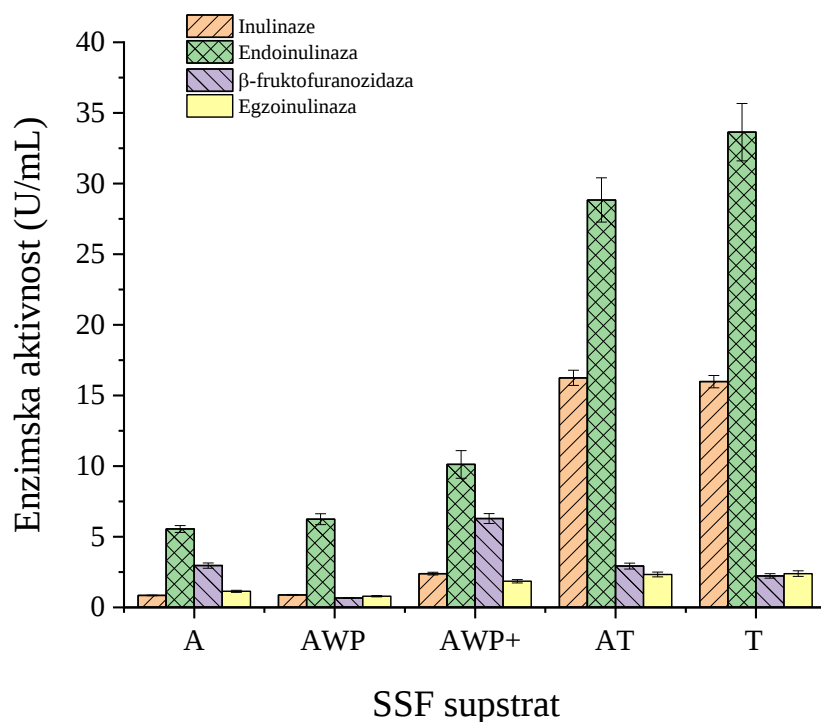
Izolat FAW1 je korišćen za produkciju inulinaznog kompleksa koji čine InuA, InuE, FTase, FFase, na različitim prirodnim i otpadnim materijalima. Korišćeni su tritikale, jerusalimska artičoka i pšenične mekinje. Svi materijali predstavljaju bogat izvor ugljenih hidrata i minerala neophodnih za rast filamentoznih gljiva. Ispitivan je njihov uticaj na produkciju inulinaznih enzima pojedinačno i u kombinovanim supstratima. Produkcione fermentacije su postavljene kao SSF na 28 °C i RH 60% tokom 96 h.

U podlozi je korišćena jerusalimska artičoka koja je u daljem tekstu i slikama označena kao A. Podloge koje u svom sastavu uključuju jerusalimsku artičoku, pšenične mekinje i pepton (u manjoj i većoj koncentraciji) u daljem tekstu i slikama označene su sa AWP i AWP+, redom. Podloga koja sadrži lomljeno zrno tritikalea u daljem tekstu i slikama označena je sa T, dok je podloga čiji sastav podrazumeva jerusalimsku artičoku i lomljeno zrno tritikalea u daljem tekstu i slikama označena sa AT. Opis podloga je dat u Tabeli 18 u Poglavlju 4.3.

Sastav supstrata koji se koristi tokom gajenja gljive utiče na različitu produkciju inulinaznih enzimskih kompleksa. Dobijeni enzimski kompleksi su okarakterisani pri čemu su spektrofotometrijski određene aktivnosti svih produkovanih enzima. Ukupna inulinazna aktivnost određena je korišćenjem 0,5% inulina kao supstrata, dok je za određivanje β -fruktofuranozidazne aktivnosti (FFase) korišćena 10% saharoza. Endoinulinazna aktivnost (InuA) određena je korišćenjem 2% rastvora azo-fruktana, a za određivanje egzoinulinazne aktivnosti (InuE) korišćen je 1% rastvor inulooligosaharida. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri nezavisna eseja $\pm$ SEM (od eng. standard error measurement).

Aktivnost produkovanih enzima inulinaznog kompleksa InuA, InuE, FTase, FFase zavisi od supstrata korišćenog tokom gajenja soja FAW1. Ukoliko se soj FAW1 gaji na podlozi koja sadrži jerusalimsku artičoku (A i AWP), dobija se najmanja aktivnost za svaki od testiranih enzima.

Povećanje proizvodnje enzima se dobija povećanjem sadržaja azota (peptona) u supstratu pa tako uzorak AWP+ ima najveću aktivnost FFase (6,3 U/mL). Gajenjem soja na podlozi koja sadrži lomljeno zrno tritikalea i ekstrakt jerusalimske artičoke (AT) ili na podlozi koja sadrži samo lomljeno zrno tritikalea (T) dobija se najveća egzoinulinazna aktivnost (InuE) (2,3 U/mL i 2,4 U/mL) kao i najveća endoinulinazna aktivnost (InuA) (29 U/mL i 34 U/mL). S druge strane, uzorci A, AWP i AWP+ pokazuju nisku aktivnost InuE, slika 15.



Slika 15. Enzimске aktivnosti (U/mL) *A. welwitschiae* FAW1 inulinaznog kompleksa produkovanog tokom SSF-a na podlogama različitog sastava (A, AWP, AWP+, AT i T) prikazanog u Tabeli 18 (Poglavlje 4.3).

Uzorci dobijeni gajenjem FAW1 na podlozi sa tritikaleom (AT i T) pokazuju visok nivo aktivnosti InuA određen spektrofotometrijskom metodom, slika 15. Rezultati pokazuju da FAW1 soj produkuje dominantno egzoinulinazu (InuE) i endoinulinazu (InuA) kada se uzgaja na supstratu tritikalea.

Ranija istraživanja su pokazala da jerusalimska artičoka indukuje produkciju inulinaza kod gljiva, [79,242]. U ovom istraživanju smo pokazali da i supstrat koji sadrži samo lomljeno zrno tritikalea indukuje produkciju inulinaznih enzima (InuA i InuE) pri čemu je njihova aktivnost znatno veća u poređenju sa aktivnostima koje su dobijene gajenjem soja na supstratima baziranim na jerusalimskoj artičoki.

Tritikale se u ranijim eksperimentima pokazao kao dobar supstrat za gajenje gljiva i produkciju enzimskih kompleksa (amilaze, lakaze, ksilanaze, celulaze) [67,77,243], a ovim eksperimentima smo utvrdili da ovako kompleksni supstrat predstavlja dobar supstrat i za produkciju inulinaznih enzima. Pšenične mekinje su takođe pogodan supstrat za gajenje gljive i produkciju enzima [69]. Obogaćivanje supstrata od homogenizovane jerusalimske artičoke mekinjama i peptonom (povećanje izvora azota) je dovelo do povećanja produkcije inulinaza, slika 15.

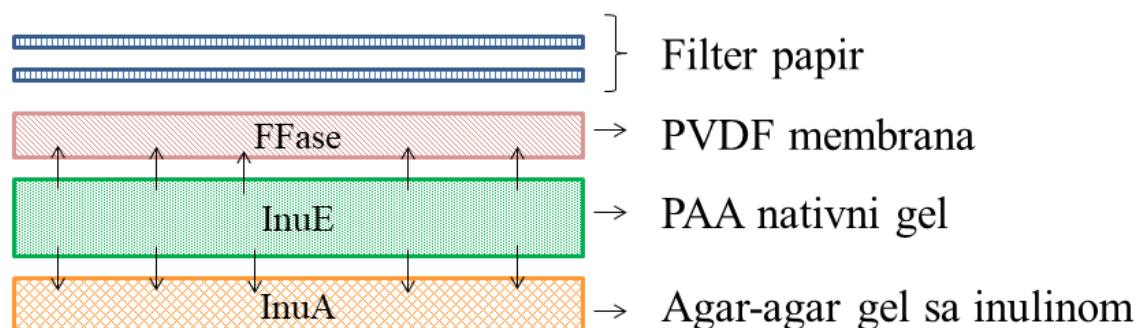
Dobijen inulinazni kompleks je bilo potrebno dodatno okarakterisati. Nepostojanje adekvatne zimografske metode kojom bi se utvrdilo prisustvo svih vrsta inulinaza u kompleksu je

nametnulo sledeći cilj ovog rada, a to je razvoj jedinstvene zimografske metode za simultanu detekciju enzima inulinaznog kompleksa.

3.3.1 Zimografska detekcija enzima inulinaznog kompleksa

Razvijena je metoda koja podrazumeva simultanu detekciju enzima koji pripadaju inulinaznom kompleksu (InuA, InuE, FTase) nakon samo jednog elektroforetskog razdvajanja enzima iz fermentacione tečnosti. Nakon native PAG elektroforeze gel sa razdvojenim proteinima se istovremeno printuje na PVDF membranu (detekcija fruktofuranozidaze) i agar-agar gel sa inkorporiranim inulinom (detekcija endoinulinaze), slika 16.

Iako smo tokom pretrage sojeva za difuzioni test koristili poliakrilamidni gel sa inkorporiranim supstratom (opisano u poglavlju 3.1.3.1) za simultanu zimografsku detekciju se kao bolji pokazao agar-agar gel sa inkorporiranim inulinom koji je obezbedio lakšu i bržu difuziju enzima iz PAA nativnog gela zbog većih unutrašnjih trodimenzionalnih pora koje nastaju polimerizacijom agar-agra.



Slika 16. Shema "sendviča" za simultanu zimografsku detekciju enzima inulinaznog kompleksa (FFase, InuE i InuA). Strelice na slici pokazuju smer kretanja enzima tokom transfera. PVDF – poliviniliden-difluorid; PAA-poliakrilamid.

Kada je u pitanju detekcija endoinulinaze Kongo crvena boja koja je u ranijim testovima korišćena za detekciju endoinulinazne aktivnosti u agaroznom gelu [151,152] zamenjena je nekancerogenim Lugolovim rastvorom. Kao rezultat dobija se braon narandžasti gel sa svetlim zonama na mestu gde je inulin degradovan ukazujući na postojanje endoinulinazne aktivnosti (slika 17b). Gel koji se koristi za detekciju endoinulinazne aktivnosti je agar-agar gel (1,5%) sa inkorporiranim inulinom (finalna konc. inulina 1%) kao supstratom. Zbog svoje strukture ovaj gel se pokazao kao čvršći što omogućava lakše rukovanje u odnosu na agarozni gel, pri čemu se preciznost i rezolucija u enzimskoj detekciji ne smanjuju.

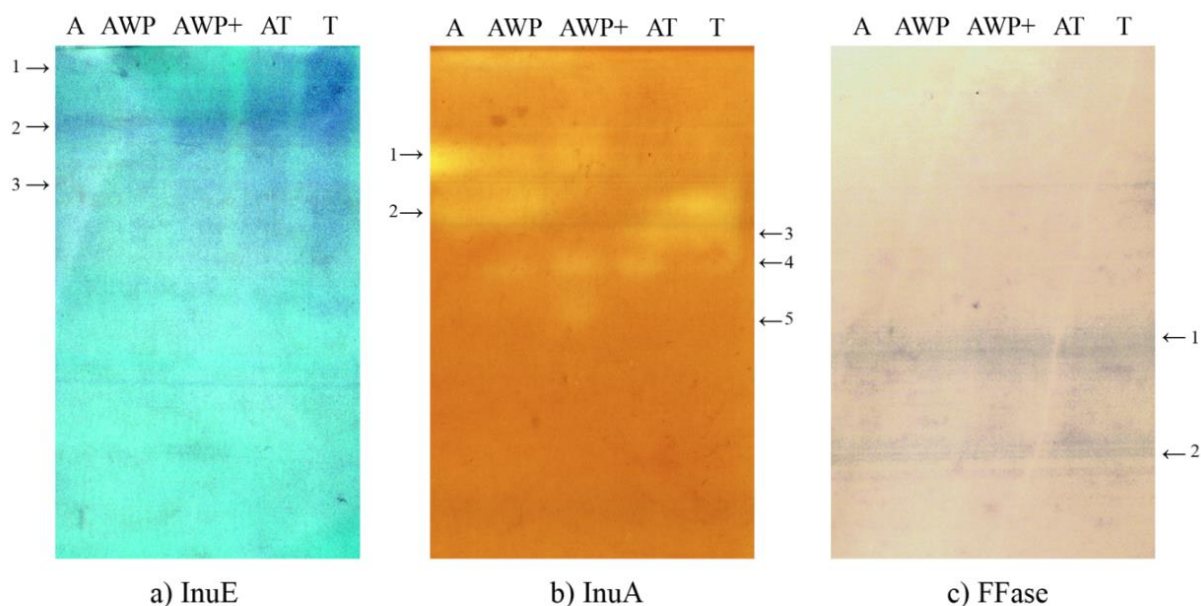
Za detekciju β -fruktofuranozidaze korišćena je PVDF membrana, inkubirana u 1% rastvoru saharoze, a redukujući šećeri nastali enzimskom aktivnošću detektovani su rastvorom NBT-a (od *eng.* nitro blue tetrazolium). Kao rezultat nastaje nerastvoran kompleks između NBT-a i redukujućih šećera plavo ljubičaste boje (slika 17c), ukazujući na postojanje enzimске aktivnosti.

Egzoinulinazna aktivnost detektovana je na PAA gelu nakon završenog transfera. Gel je inkubiran u 1% rastvoru inuloooligosaharida, a redukujući šećeri nastali enzimskom aktivnošću detektovani rastvorom NBT-a, pri čemu je nastao nerastvoran kompleks plavo-ljubičaste boje (slika 17a).

U uzorcima T i AT detektovane su tri izoforme InuE gde je njihov intenzitet bio najizraženiji u poređenju sa ostalim uzorcima (slika 17a). Intenzitet ostalih uzoraka bio je u korelaciji sa InuE aktivnošću detektovanom DNS metodom (slika 15).

Svi testirani uzorci pokazuju endoinulinaznu aktivnost i ukupno je detektovano 5 InuA izoformi (slika 17b). Izoforme InuA1 (glavna izoforma/najintezivnija) i InuA2 detektovane su u uzorcima A i AWP. Kod uzoraka AT and T dobijene su tri izoforme od kojih je InuA2 najintezivnija, a javljaju se i InuA3 i InuA4 izoforme. Uzorak AWP+ se razlikuje od ostalih uzoraka zbog prisustva izoforme InuA5. Najveća endoinulinazna aktivnost detektovana spektrofotometrijskom metodom je u uzorku T, što odgovara intenzitetu izofome InuA2 istog uzorka, nakon zimogramske detekcije.

Svi uzorci pokazuju β -fruktofuranozidaznu aktivnost i kod svih su detektovane dve izoforme pri čemu se nijedna od njih ne poklapa sa prethodno opisanim InuA i InuE izoformama (slika 17c).



Slika 17. Simultana zimogramska detekcija inulinaznih kompleksa (InuE, InuA i FFase) dobijenih gajenjem gljive *A. welwitschiae* FAW1 na SSF-u korišćenjem različitih supstrata; A, AWP, AWP+, AT i T opis uzoraka preuzet iz opisa korišćenih podloga (prikazano u Tabeli 18); strelice označavaju pozicije enzimskih izoformi.

Zimogramska detekcija enzima nakon native elektroforeze ukazala je na postojanje različitih izoformi inulinaznih enzima (InuA, InuE, FFase), čija se produkcija i količina razlikuju i zavise od podloge na kojoj je gljiva gajena. Tako soj *A. welwitschiae* FAW1 dominantno proizvodi InuA kada se gljiva gaji na supstratu tritikalea, dok je produkcija FFase dominantna ukoliko se gljiva gaji na supstratima jerusalimske artičoke i pšeničnih mekinja.

Poznato je da gljive mnoge enzime proizvode u vidu više izoformi [244], ali su do skoro inulinaze gljiva obično detektovane kao jedna izoforma [151,245], što može biti posledica neadekvatne zimogramske metode za analiziranje fermentacionih ekstrakta. Novorazvijena zimogramska tehnika pomogla bi da se prevaziđu opisana ograničenja i ujedno proširi znanje o inulinazama gljiva.

Dobijeni okarakterisani inulinazni kompleksi su zatim korišćeni za ostvarivanje sledećeg cilja ovog rada u produkciji fruktooligosaharida.

3.4 Upotreba dobijenih enzimskih kompleksa za sintezu fruktooligosaharida

Egzoinulinaza (InuE) predstavlja jedan od važnih enzima u produkciji fruktooligosaharida hidrolizom inulina, tačnije hidrolizom jedne fruktozne jedinice sa redukujućeg kraja oligosaharida prethodno dobijenog aktivnošću endoinulinaze (InuA) [5]. Uobičajeno se za sintezu FOS-ova koriste pojedinačni inulinazni enzimi (InuA i InuE) [6,110].

Pored ovih enzima upotrebu u dobijanje FOS-ova imaju i FFase i FTase [141]. Fruktofuranozidazna (FFase) i fruktoziltransferazna (FTase) aktivnost detektovane su u uzorku AWP+. Poređenjem sa drugim uzorcima u kojima je aktivnost navedenih enzima bila manja, zaključeno je da je podloga obogaćena peptonom (AWP+) najbolja za produkciju FFase i FTase.

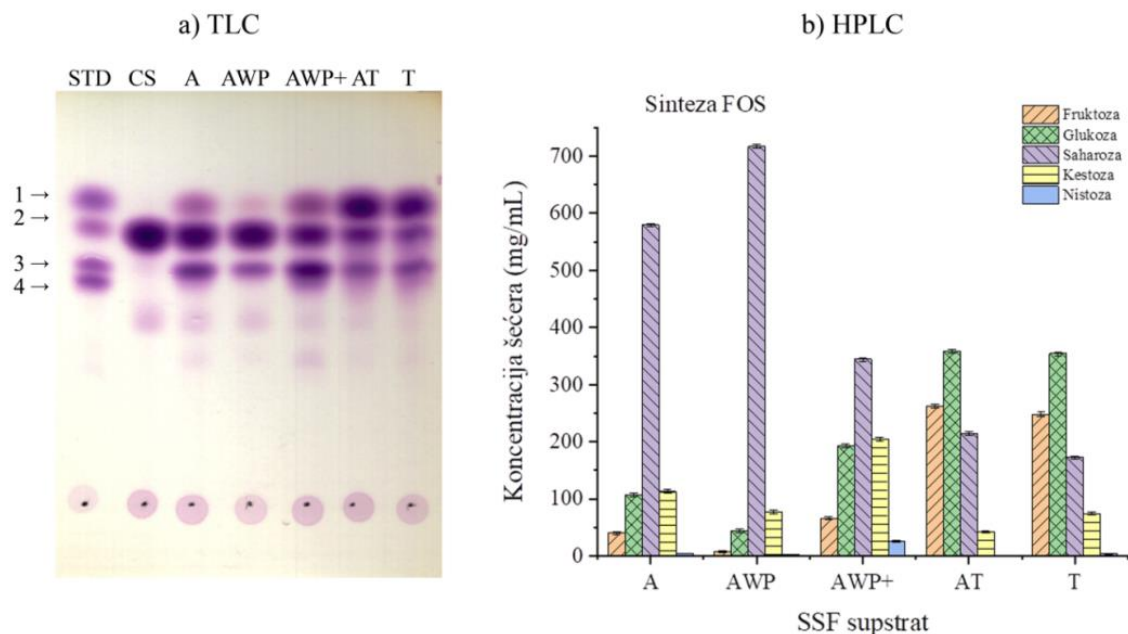
Tabela 5. Enzimske aktivnosti InuA, FFase i InuE *A. welwitschiae* FAW1 (U) korišćene u reakcionoj smeši za dobijanje fruktooligosaharida (FOS_s i FOS_h)

Enzimski kompleks	Endoinulinaza (InuA) (U)	β-fruktofuranozidaza (FFase) (U)	Egzoinulinaza (InuE) (U)
A	1,54	0,825	0,314
AWP	1,70	0,184	0,217
AWP+	2,75	1,732	0,495
AT	7,98	0,798	0,632
T	9,35	0,605	0,660

Upotreba inulinaznog enzimskog kompleksa u proizvodnji FOS-ova bez prethodnog prečišćavanja pojedinačnih enzima je prednost u odnosu na uobičajenu praksu, naročito kad se uzme u obzir da se oni najčešće ekspimiraju i produkuju zajedno [53]. Promenom inducibilnog supstrata pokazali smo da je moguće uticati na sastav proizvedene smeše enzima. Koprodukcijom kompleksa inulinaznih enzima pokazano je da se ista gljiva može koristiti za obe metode dobijanja FOS-ova u zavisnosti od podloge na kojoj se uzgaja. Ovo je naročito značajno za praktičnu industrijsku upotrebu opisanih enzima zato što se na jednostavan način može postići da se produkovani enzimi veoma efikasno iskoriste za produkciju različitih vrsta FOS-ova. Prevazilaženje prečišćavanje samo jednog enzima iz kompleksa predstavlja iskorak u osmišljavanju novih pravaca u produkciji FOS-ova.

3.4.1 Produkcija fruktooligosaharida sintezom iz saharoze

Fruktooligosaharidi (FOS_s) sintetizovani su korišćenjem FAW1 enzimskih kompleksa i saharoze kao početnog supstrata. Reakcije su trajale 24 h, na pH 6,0 i temperaturi od 60 °C. Dobijeni FOS_s analizirani su TLC-om i HPLC-om, slike 18. Svi testirani enzimski kompleksi pokazuju mogućnost sinteze FOS-ova upotrebom saharoze kao supstrata. Korišćenjem enzimskog kompleksa AWP+ dobijaju se FOS-ovi optimalnog sastava. Isti uzorak pokazao je najveću β-fruktofuranozidaznu aktivnost (FFase), slika 15, a uspešna sinteza FOS_s ukazuje na prisustvo fruktoziltransferazne aktivnosti (FTase).

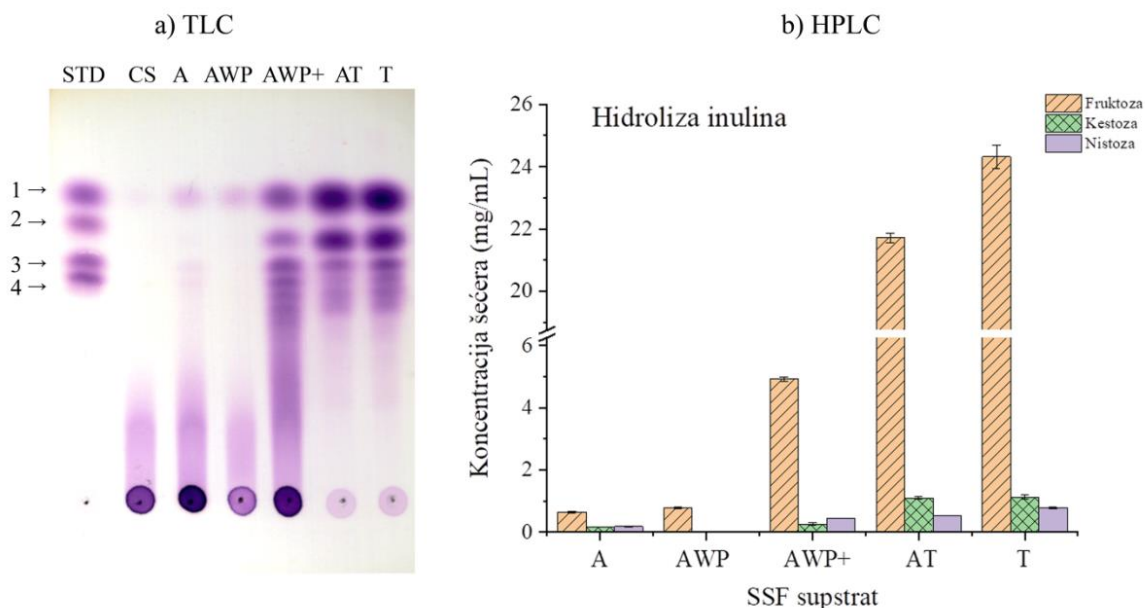


Slika 18. Analiza fruktooligosaharida (FOS_s) produkovanih *A. welwitschiae* FAW1 enzimskim kompleksima. A, AWP, AWP+, AT i T opis uzoraka preuzet iz opisa korišćenih podloga (prikazano u Tabeli 18). (a) TLC detekcija. Strelice pokazuju položaj standardnih šećera (STD): 1-fruktoza; 2-saharoza; 3-kestoza; 4-nistoza (1 mg/mL svaki). CS – je kontrolni uzorak (početni rastvor saharoze); (b) Koncentracije šećera (mg/mL) dobijene HPLC analizom

Gajenje soja FAW1 na supstratima bogatim proteinima kao što su AWP+, AT i T za rezultat ima višu produkciju FTase, a samim tim i veću količinu FOS_s, naročito kestoze i nistoze (Slika 18). Ukoliko se gljiva gaji na supstratu sa manjim izvorom azota, tj. pri niskim koncentracijama peptona (A i AWP) manja je koncentracija produkovanog enzima FFase na šta ukazuje viša koncentracija saharoze prisutna u produkovanim FOS-ovima, detektovana HPLC-om i TLC-om (Slika 18).

3.4.2 Produkcija fruktooligosaharida hidrolizom inulina

Rezultati aktivnosti (Tabela 5) i zimogramska detekcija (Slika 17) pokazali su da soj FAW1 proizvodi dva enzima inulinaznog kompleksa (InuA i InuE) koji deluju sinergistički na degradaciju inulina. Reakcije dobijanja FOS_h su trajale 2 h, na pH 6,0 i temperaturi od 45 °C. Najveća količina FOS_h dobijenih hidrolizom 5%-tnog inulina potiče od enzimskih kompleksa dobijenih gajenjem FAW1 soja na podlogama AWP+, AT i T, slika 19.



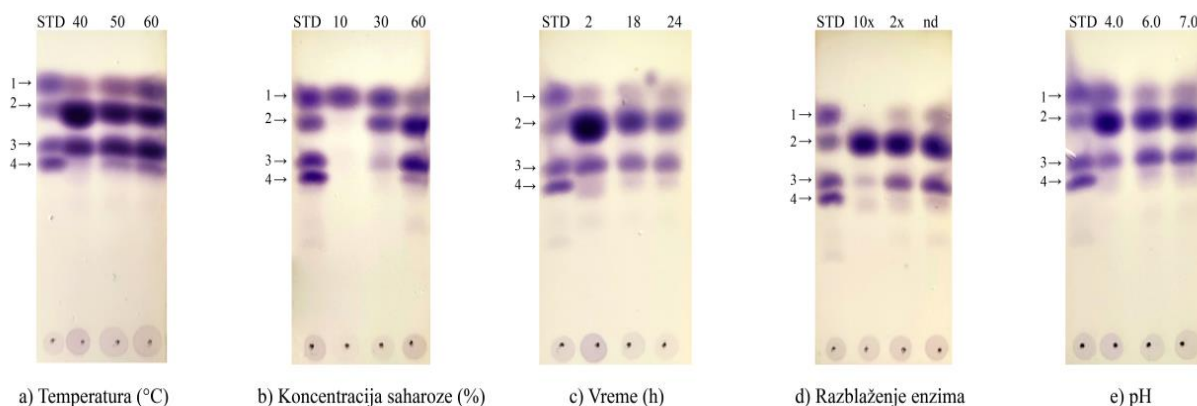
Slika 19. Analiza fruktooligosaharida (FOS_h) produkovanih *A. welwitschiae* FAW1 enzimskim kompleksima. A, AWP, AWP+, AT i T opis uzoraka preuzet iz opisa korišćenih podloga (prikazano u Tabeli 18). (a) TLC detekcija. Strelice pokazuju položaj standardnih šećera (STD): 1-fruktoza; 2-saharoza; 3-kestoza; 4-nistoza (1 mg/mL svaki). CS – je kontrolni uzorak (početni rastvor inulina); (b) Koncentracije šećera (mg/mL) dobijene HPLC analizom

Zbog male koncentracije produkovanih enzima, uzorci A i AWP pokazuju jedva приметnu hidrolizu inulina do fruktoze i fruktooligosaharida (FOS_h). Uzorak AWP+ pokazuje određenu produkciju FOS_h, međutim TLC analizom je detektovano prisustvo velikih oligosaharida, ukazujući na malu hidrolizu inulina tokom 2 h, što je potvrđeno nižom aktivnošću InuA. Uzorci AT i T dobijeni gajenjem FAW1 soja na prirodnoj podlozi koja sadrži lomljeno zrno tritikalea (T), kao i na podlozi koja je pored tritikalea obogaćena ekstraktom jerusalimske artičoke (AT), pokazali su najveću proizvodnju FOS_h (Slika 19), što je u skladu sa prethodno određenom enzimskom aktivnošću (Slika 15).

3.4.3 Optimizacija reakcije sinteze fruktooligosaharida

Ispitivano je nekoliko faktora koji mogu uticati na reakciju formiranja fruktooligosaharida: a) Temperatura (40, 50 i 60 °C); b) Koncentracija saharoze (10, 30 i 60%); c) Vreme trajanja reakcije (2, 18 i 24 h); d) Razblaženje enzima/koncentracija enzima (10x – 10 puta razblažen, 2x - 2 puta razblažen i nd – nerazblažen); e) pH (4,0, 6,0, i 7,0), slika 20. Produženje vremena reakcije pozitivno je uticalo na proizvodnju FOS-ova, pri čemu su posle 24 h dobijeni najbolji rezultati. Tokom optimizacije produkcije pokazano je da aktivnost fruktoziltransferaze veoma zavisi od koncentracije saharoze [141,246,247]. Povećanje koncentracije saharoze omogućava reakciju transfruktozilacije kompleksa AWP+, dostizanjem maksimalne aktivnosti pri koncentraciji saharoze od 60% pri čemu se kao proizvodi dobijaju kestoza i nistoza. Sintaza fruktooligosaharida je poznata kao spora reakcija koja traje po nekoliko sati ili se odvija preko noći [247]. U ovom radu je pokazano da je za dobijanje optimalne smeše fruktooligosaharida potrebno da reakcija traje 24 h. Slika 20 pokazuje da je koncentracija saharoze koja se koristi kao supstrat jedan od najznačajnijih ispitivanih faktora koji utiče na sintezu FOS-ova, ali u kombinaciji sa visokom temperaturom. Naime, rastvor visoke koncentracije saharoze (60%) na visokoj temperaturi (60 °C), postaje manje viskozan, a samim tim supstrat postaje pristupačniji enzimu pri čemu se aktivira reakcija

transfruktozilacije. Dobijeni pH i temperaturni optimumi tokom reakcije optimizacije slični su optimumima koje ispoljavaju prečišćeni enzimi [141,247].



Slika 20. Optimizacija produkcije fruktooligosaharida (FOS_s) korišćenjem AWP+ enzimskog kompleksa. Strelice pokazuju položaj standardnih šećera (STD): 1-fruktoza; 2-saharoza; 3-kestoza; 4-nistoza (1 mg/mL svaki); brojevi iznad uzoraka označavaju korišćene uslove reakcije

Pokazano je da reakcioni parametri, uključujući nerazblaženi enzimski kompleks AWP+, 60% saharoza koja se koristi kao supstrat, na pH 6,0 i temperaturi 60 °C tokom 24 h, predstavljaju optimalne uslove za dobijanje optimalne smeše FOS-ova, slika 20. Prikazani rezultati procesa optimizacije sinteze fruktooligosaharida dodatno naglašavaju pretpostavku da se enzimski kompleks dobijen neposredno nakon kultivacije gljiva može uspešno koristiti za sintezu FOS-ova, bez prethodnog prečišćavanja i razdvajanja enzima.

3.4.4 Kvalitativna i kvantitativna analiza sintetisanih fruktooligosaharida

Fruktooligosaharidi (FOS_s i FOS_h) dobijeni delovanjem enzima inulinaznog kompleksa (InuA, InuE, FTase, FFase), detektovani su i kvantifikovani korišćenjem dve metode – TLC i HPLC (Slike 18 i 19). Poređenjem rezultata pokazano je da su metode u korelaciji. Analize dobijenih smeša fruktooligosaharida ukazuju na to da FOS-ovi dobijeni sintezom od saharoze (FOS_s) sadrže oligosaharide sa manjim brojem monomernih jedinica (Slika 7) u odnosu na FOS-ove dobijene hidrolizom inulina (FOS_h) (Slika 19). Takođe zapaža se veća količina glukoze koja nastaje hidrolizom supstrata saharoze i transferovanjem fruktozil grupe na molekul fruktoze (Slika 18).

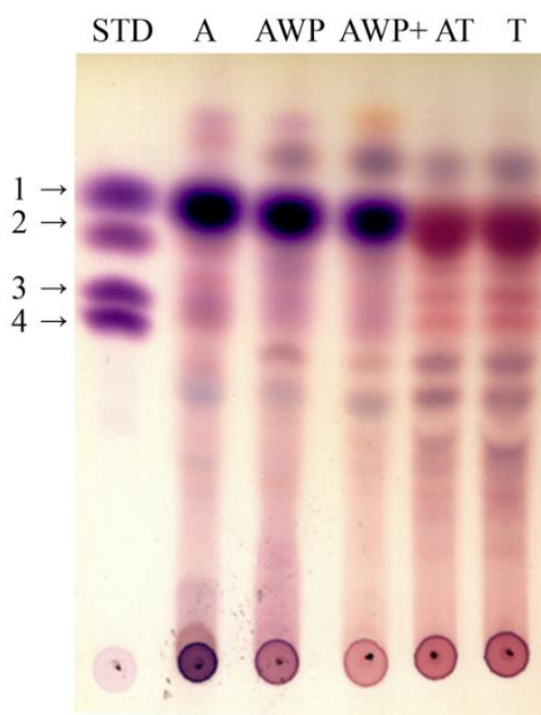
Jedan od nedostataka je prisustvo saharoze kao startnog materijala koja nije utrošena tokom sinteze fruktooligosaharida, dok je kod FOS-ova dobijenih hidrolizom inulina povećano prisustvo fruktoze kao posledica egzoinulinazne aktivnosti. Dalje korišćenje ovakve smeše fruktooligosaharida podrazumeva dodatno prečišćavanje i uklanjanje nečistoća (saharoze i fruktoze), kao i kontrolisanje uslova enzimskih reakcija. I pored navedenih nedostataka oba pristupa za dobijanje fruktooligosaharida imaju veliki potencijal za primenu u industriji.

Još jedan novi pravac u istraživanjima koja podrazumevaju upotrebu otpadnih biomasa kao supstrata za produkciju fruktooligosaharida je dobijanje gotovih proizvoda „*in situ*“ – u mestu. Ovaj postupak predstavlja istovremenu produkciju enzima i proizvoda tokom rasta gljiva na kompleksnom prirodnom supstratu.

3.4.5 *In situ* produkcija fruktooligosaharida

Tokom gajenja *A. welwitschiae* FAW1 soja na opisanim supstratima - jerusalimska artičoka i tritikale (A i AT), pored produkcije enzimskih kompleksa dolazi i do produkcije fruktooligosaharida *in situ*. S obzirom na to da je jerusalimska artičoka prirodni izvor inulina pretpostavlja se da su fruktooligosaharidi verovatno nastali hidrolizom inulina iz supstrata gde glavnu ulogu u hidrolizi imaju endo- i egzoinulinaza.

Kod svih uzoraka zapaženo je prisustvo fruktoze kao finalnog proizvoda hidrolize, ali takođe i prisustvo oligosaharida. Kod uzoraka A, AT i T detektovani su FOS-ovi koji se sastoje od 3, 4 i 5 monomernih jedinica, a TLCom je pokazano prisustvo nekih oligosaharida čiji položaj odgovara položaju korišćenih standarda (slika 21).



Slika 21. TLC analiza oligosaharida produkovanih *in situ* tokom gajenja *A. welwitschiae* FAW1 na raznim prirodnim supstratima, opis uzoraka preuzet iz opisa korišćenih podloga (prikazano u Tabeli 18); strelice pokazuju položaj standardnih šećera (STD): 1-fruktoza; 2-saharoza; 3-kestoza; 4-nistoza (1 mg/mL svaki).

Zbog veoma kompleksne strukture podloga koje se koriste za gajenje gljiva kao i mnogobrojnih jedinjenja koja nastaju tokom rasta gljiva teško je zaključiti koja vrsta FOS-ova nastaje, što otvara nova pitanja u vezi sa ovom metodom produkcije fruktooligosaharida.

Kako bi se mogli razmatrati u smislu njihove potencijalne upotrebe u ishrani potrebno je odrediti kvalitet produkovanih FOS-ova. Jedna od važnih karakteristika fruktooligosaharida kao aditiva koji se koriste u hrani je antioksidativnost [217–220], stoga je važno ispitati antioksidativni kapacitet produkovanih FOS-ova.

3.4.6 Antioksidativni kapacitet fruktooligosaharida

Antioksidativni kapacitet FOS-ova analiziran je ABTS metodom, određivanje kapaciteta po SET (od *eng.* single electron transfer) mehanizmu i ORAC metodom, određivanje kapaciteta po HAT (od *eng.* hydrogen atom transfer) mehanizmu [248].

ABTS esej je urađen prema modifikovanoj metodi koja je ranije opisana u literaturi [249]. Kao standard korišćen je rastvor askorbinske kiseline. Ukupna antioksidativna aktivnost izražena je u $\mu\text{mol/L}$ askorbinske kiseline ekvivalenta (AAE – od *eng.* ascorbic acid equivalent), tabela 6.

ORAC esej je urađen na osnovu metode koje je prethodno opisana u literaturi [250,251]. Kao standard korišćen je rastvor Trolox-a. Rezultati su dobijeni korišćenjem ScanIt RE 2.3 softvera. Antioksidativna aktivnost izražena je kao mmol/L Trolox ekvivalent (TE – od *eng.* trolox equivalent), tabela 6. Statistički značajne razlike između uzoraka po pitanju antioksidativnog kapaciteta su potvrđene upotrebom testa „Two-way ANOVA with post-hoc“ ($p < 0.05$) za obe korišćene metode. Rezultati su prikazani korišćenjem tzv malih slova iznad rezultata u tabeli 6.

Svi uzorci fruktooligosaharida dobijeni različitim inulinaznim kompleksima *A. welwitschiae* FAW1 soja ispoljavaju antioksidativnu aktivnost. Međutim, bez obzira na način dobijanja FOS-ova, sintezom od saharoze ili hidrolizom inulina, najveći antioksidativni kapacitet detektovan je kod uzoraka fruktooligosaharida u čijem su dobijanju učestvovali enzimski kompleksi dobijeni nakon gajenja gljive na podlogama AT i T. Prisustvo tritikalea u podlozi tokom rasta gljive rezultiralo je produkcijom enzimskih kompleksa koji sintetizuju fruktooligosaharide sa višim antioksidativnim kapacitetom u poređenju sa drugim uzorcima, što ih čini pogodnim za potencijalnu upotrebu u ishrani.

Antioksidativne karakteristike su u korelaciji sa količinom nastale fruktoze, kestoze i nistoze (Slike 18 i 19). Istraživanja su pokazala da jedinjenja sa terminalnom fruktozom kao i monosaharidi koji imaju redukujuće osobine učestvuju u antioksidativnim reakcijama. S tim u vezi veća količina ovih molekula u smeši utiče na ukupni antioksidativni potencijal FOS-ova [219,221].

Antioksidativna sposobnost FOS-ova, posebno niže molekulske mase, dokazana je kao njihova sposobnost uklanjanja peroksil radikala i sprečavanja *in vitro* oksidacije LDL-a [219]. Pored toga, visoka antioksidativnost fruktoze određena ABTS testom u direktnoj je korelaciji sa antioksidativnim potencijalom koji potiče od prisustva fruktoze kod biljaka [252]. Prisustvo nistoze i kestoze u smeši FOS-ova dobijenih u ovom istraživanju takođe doprinosi antioksidativnom delovanju, što potvrđuje njihova antihidroksilna aktivnost [253]. Druge studije takođe pružaju dokaze o antioksidativnosti FOS-ova na osnovu nekoliko često korišćenih testova [220,254].

Tabela 6. Antioksidativni kapacitet fruktooligosaharida (FOS_s i FOS_h) dobijenih korišćenjem *A. welwitschiae* FAW1 enzimskih kompleksa

Uzorak		ABTS ($\mu\text{mol/L AAE}$)	ORAC (mmol/L TE)
FOS _s	A	159,4 $\pm$ 0,5 ^a	17,1 $\pm$ 0,6 ^a
	AWP	98,0 $\pm$ 0,5 ^b	14,27 $\pm$ 0,06 ^b
	AWP+	135,6 $\pm$ 0,5 ^c	12,0 $\pm$ 0,2 ^c
	AT	291,2 $\pm$ 0,5 ^d	28,0 $\pm$ 0,5 ^d
	T	200,5 $\pm$ 0,7 ^e	18,2 $\pm$ 0,5 ^{ae}
FOS _h	A	148,1 $\pm$ 0,5 ^f	0,12 $\pm$ 0,01 ^f
	AWP	179,8 $\pm$ 0,3 ^g	1,07 $\pm$ 0,01 ^{fg}
	AWP+	227,9 $\pm$ 0,9 ^h	1,85 $\pm$ 0,03 ^{gh}
	AT	272,2 $\pm$ 0,8 ⁱ	2,64 $\pm$ 0,03 ^{hi}
	T	288,1 $\pm$ 0,8 ^j	2,25 $\pm$ 0,02 ^{ij}

Vrednosti za ABTS test su predstavljene kao srednje vrednosti dve nezavisne analize $\pm$ sd (standardna devijacija).

Vrednosti za ORAC test predstavljene su kao srednje vrednosti tri nezavisne analize $\pm$ sd (standardna devijacija).

Vrednosti obeležene istim slovom se statistički ne razlikuju značajno prema Tukey-ovom testu ($p < 0,05$).

Pokazano je da se inulinazni kompleks koji je proizvodio soj *A. welwitschiae* FAW1 može se koristiti za proizvodnju oba tipa fruktooligosaharida sa visokim antioksidativnim potencijalom. Prinos FOS_s dobijenih sintezom iz saharoze korišćenjem enzimskog kompleksa bio je veći od FOS_h dobijenih hidrolizom inulina. Inulinazni kompleks koji sintetiše najveću koncentraciju FOS_s od saharoze sadržao je kao najaktivniji enzim fruktoziltransferazu. U literaturi je prisutno i dosta urađeno na polju endoinulinaze i egzoinulinaze čija je uloga i primena u proizvodnji FOS-ova [6,78,110], zato je fokus daljeg rada bio na istraživanjima uloge fruktoziltransferaze u sintezi FOS-ova. Naredni korak podrazumevao je upotrebu soja FAW1 za produkciju ovog enzima, njegovo prečišćavanje i biohemijsku karakterizaciju.

3.5 Produkcija, prečišćavanje i karakterizacija fruktoziltransferaze iz *Aspergillus welwitschiae* FAW1

Soj FAW1, identifikovan kao *A. welwitschiae*, gajen je na supstratu koji sadrži lomljeno zrno tritikala pri određenim uslovima za koje je prethodno pokazano da najviše pogoduju rastu gljive, smanjenoj sporulaciji iste i povećanoj produkciji enzima (opisano u poglavlju 4.4.1). Po završetku gajenja, smeša enzima ekstrahovana je iz podloge 20 mM acetatnim puferom pH 5,0. Ekstrakciona tečnost je centrifugirana i profiltrirana kroz stakleni mikrofilter u cilju uklanjanja zaostalih spora i micelijuma i korišćena za dalje prečišćavanje enzima.

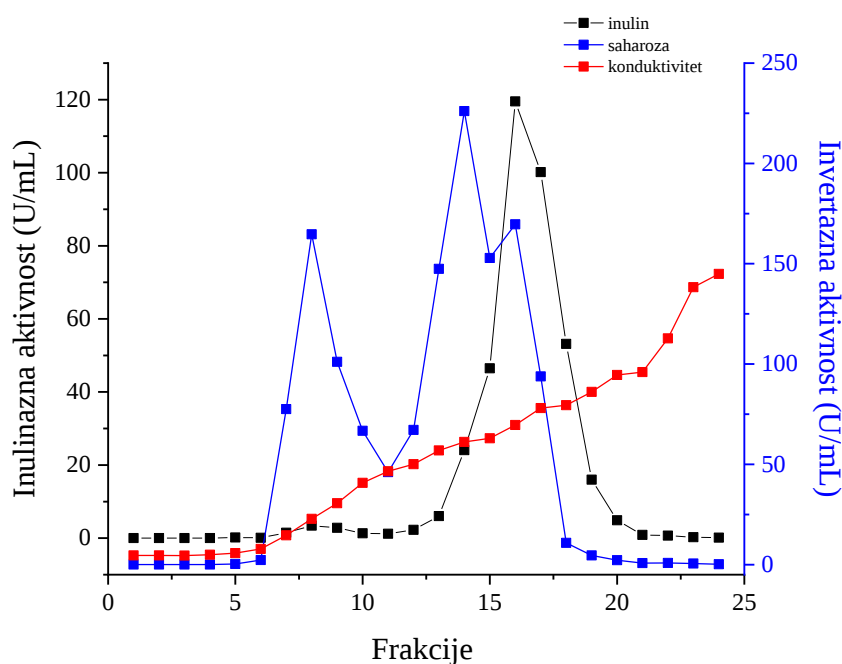
3.5.1 Prečišćavanje fruktoziltransferaze iz *A. welwitschiae* FAW1

Sirovi ekstrakt enzima dobijen u SSF-u je sadržavao sve enzime inulinaznog kompleksa (InuA, InuE, FFase, FTase) i prateće komponente. Cilj prečišćavanja je bio da se odvoje pojedinačni enzimi inulinaznog kompleksa kako bi se detaljnije ispitao njihov značaj i uloga glavnih enzima u proizvodnji FOS-ova. Za prečišćavanje enzima korišćene su klasične hromatografske tehnike jonoizmenjivača i gel hromatografije, a tokom prečišćavanja određivane su aktivnosti InuA, FFase i FTase u svakom koraku i u svakoj dobijenoj frakciji.

3.5.1.1 Jonoizmenjivačka hromatografija

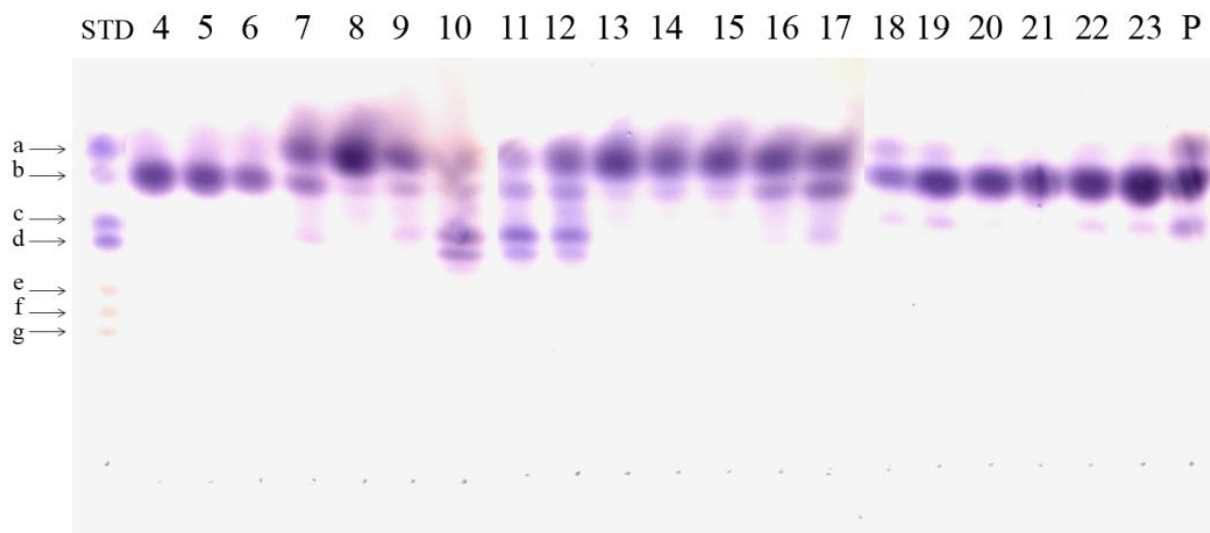
Za razdvajanje enzima inulinaznog kompleksa korišćena je jonoizmenjivačka hromatografija (IEX) na QAE Sephadex matriksu. Uzorak je pripremljen dijalizovanjem prema acetatnom puferu pH 6,0 koji je korišćen i za razdvajanje proteina, pri čemu su se uklonili mali molekuli - rastvorni šećeri, soli i drugi molekuli koji su se nalazili u ekstraktu. Nakon određivanja kapaciteta vezivanja matriksa, podešavanje odgovarajućeg pH (6,25) i konduktiviteta (1546 $\mu\text{S}/\text{cm}$) kako uzorku tako i matriksu kao i određivanje koncentracije proteina (0,246 mg/mL), na kolonu zapremine 435 mL nanešeno je 2,8 L uzorka, čija je aktivnost bila 6,44 U/mL. Nevezani proteini eluirani su startnim puferom, dok je desorpcija enzima postignuta promenom jonske sile startnog pufera, odnosno step-elucijom (od 0,1 M do 0,5 M rastvora NaCl u startnom puferu). U dobijenim frakcijama određena je koncentracija proteina i enzimске aktivnosti enzima inulinaznog kompleksa – InuA, FFase i FTase.

Za određivanje inulinazne i β -fruktofuranozidazne (invertazne) aktivnosti korišćen je 0,5% inulin i 10% saharoza. Frakcije koje pokazuju invertaznu aktivnost (6-18 frakcije) ne pokazuju aktivnost prema inulinu, dok je kod frakcija 14-18 zabeležena aktivnosti i prema jednom i prema drugom supstratu, sa pikom inulinazne aktivnosti u frakciji 16 (Slika 22).



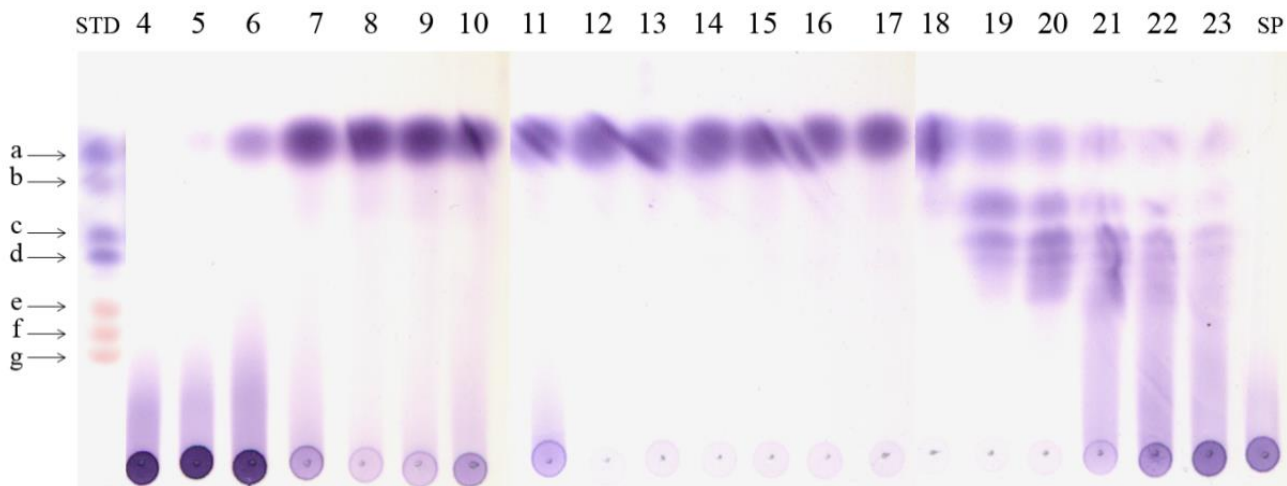
Slika 22. Inulinazna i invertazna aktivnost (U/mL) u frakcijama nakon jonoizmenjivačke hromatografije na QAE Sephadex matriksu

Za određivanje fruktoziltransferazne aktivnosti kao supstrat korišćena je 60% saharoza. TLC analiza dobijenih proizvoda tokom reakcije koja se odvija 24 h, pokazuje da je najveća fruktoziltransferazna aktivnost dobijena u frakcijama 10-12. Iste frakcije pokazale su malu invertaznu aktivnost, dok je aktivnost prema inulinu zanemarljiva. Frakcije 7-9 i 13-18 pokazuju delimičnu ili potpunu razgradnju saharoze do monosaharida, dok se u ostalim frakcijama (4-6 i 19-23) ne zapaža značajnija razgradnja saharoze kao ni sinteza FOS-ova (Slika 23).



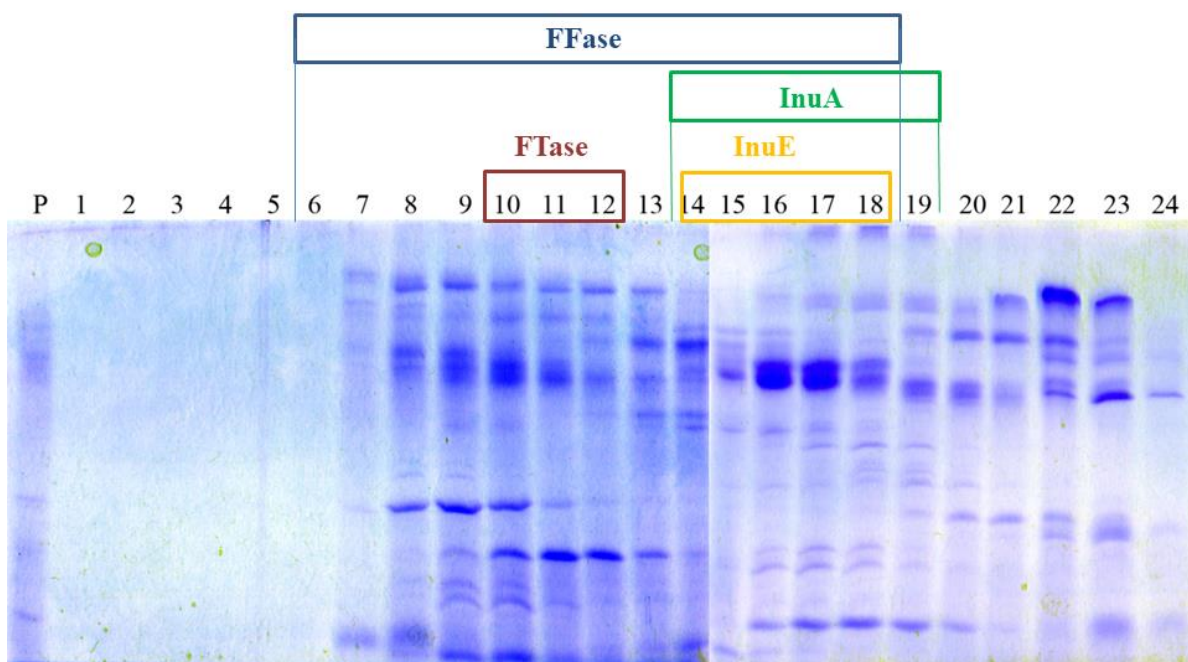
Slika 23. Analiza FTase aktivnosti (sinteza FOS_s od saharoze) u frakcijama nakon jonoizmenjivačke hromatografije; STD – standardi šećera (1 mg/mL svaki), označeni su strelicama; P-početni uzorak; 4-23 frakcije dobijene nakon jonoizmenjivačke hromatografije

Za određivanje endoinulinazne aktivnost (InuA) kao supstrat korišćen je 5% inulin. TLC analiza dobijenih proizvoda tokom reakcije koja se odvija 24 h, pokazuje da je najveća endoinulinazna aktivnost dobijena u frakcijama 12-18. Rezultati takođe ukazuju na to da enzim koji sintetiše FOS-ove koristeći saharoze, ne produkuje FOS-ove ukoliko se kao supstrat koristi inulin, već isti samo delimično razgrađuje do monosaharida, dok frakcije 19 i 20 u potpunosti razgrađuju inulin do mono- i oligosaharida (Slika 24).



Slika 24. Analiza InuA aktivnosti (produkcija FOS_h hidrolizom inulina) frakcijama nakon jonoizmenjivačke hromatografije; STD – standardi šećera (1 mg/mL svaki), označeni su strelicama; P-početni uzorak; 4-23 frakcije dobijene nakon jonoizmenjivačke hromatografije

Provera stepena prečišćenosti enzima nakon IEX usledila je nakon određenih enzimskih aktivnosti. Dobijena SDS PAG elektroforeza i dobijeni proteinski profil frakcija prikazan je na slici 25.

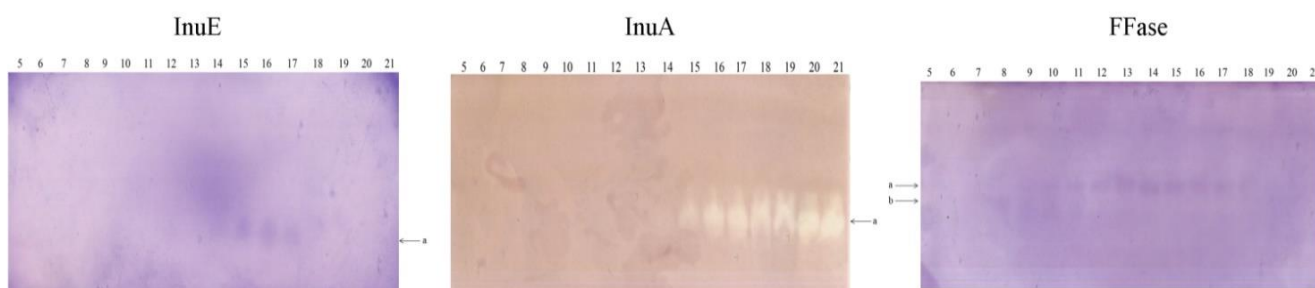


Slika 25. Proteinski profil frakcija nakon jonoizmenjivačke hromatografije na SDS PAA gelu; P-početni uzorak; 1-24 – frakcije nakon jonoizmenjivačke hromatografije; frakcije sa detektovanim aktivnostima enzima inulinaznog kompleksa su označene iznad slike

Frakcije sa endoinulinaznom aktivnosti pokazuju drugačiji proteinski profil od frakcije gde je fruktoziltransferazna aktivnost dominantna, slika 24. Jonoizmenjivačkom hromatografijom je postignuto delimično razdvajanje enzima inulinaznog kompleksa. U frakcijama od 6 do 18 je zabeležena značajna invertazna (FFase) aktivnost. Frakcije od 10 do 12 pokazuju najveću fruktoziltransferaznu aktivnost (FTase). Endoinulinazna (InuA) aktivnost dominira u frakcijama od 14 do 19. Enzimske aktivnosti inulinaznog kompleksa su analizirane i upotrebom zimogramske metoda za simultanu detekcije razvijene za potrebe izrade ovog doktorata.

3.5.1.1.1 Zimogramska detekcija endo-, egzoinulinazne i β -fruktofuranozidazne aktivnosti

Nakon izoelektričnog fokusiranja gel sa razdvojenim proteinima je istovremeno printovan na PVDF membranu (detekcija β -fruktofuranozidaze) i agar-agar gel sa inkorporiranim inulinom (detekcija endoinulinaze). Zatim je po završenom transferu detektovana egzoinulinazna aktivnost na PAA gelu. Postupak detekcije enzima opisan je u poglavlju 3.3.1.



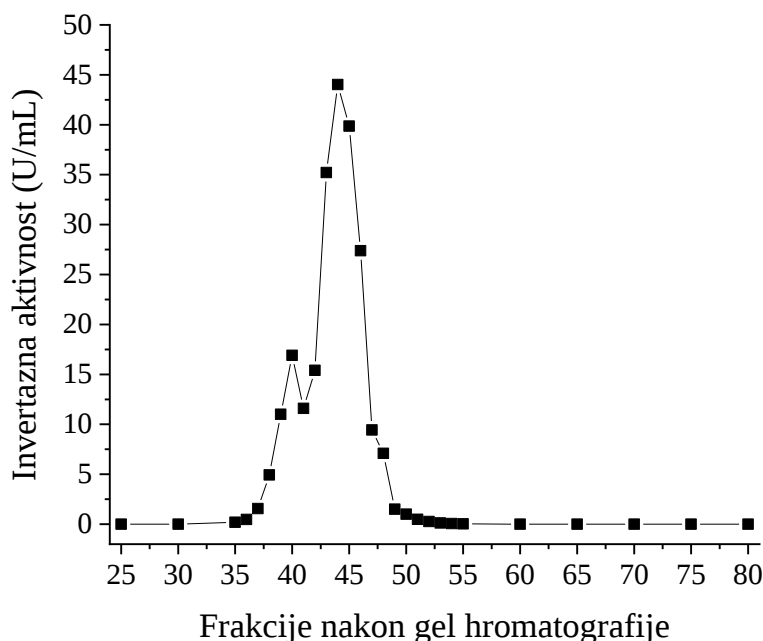
Slika 26. Simultana zimogramska detekcija enzima inulinaznog kompleksa (InuE, InuA i FFase) u frakcijama nakon jonoizmenjivačke hromatografije; strelice pokazuju pozicije enzimskih izoformi.

Najintenzivnija traka koja ukazuje na InuE aktivnost detektovana je u frakcijama 14-17. Intenzitet traka u ostalim frakcijama je veoma mali ili aktivnost nije detektovana, slika 26a. Dobijeni rezultati su u korelaciji sa InuE aktivnošću određenom DNS metodom (slika 22). Endoinulinazna aktivnost detektovana je u frakcijama 15-21 (Slika 26b), što odgovara rezultatima dobijenim nakon hidrolize 5% inulina (slika 24). Aktivnost prema saharozi (β -fruktofuranozidazna aktivnost) detektovana je u frakcijama 8-17 (izoforma a) što je u skladu sa rezultatima enzimskog eseja određenog spektrofotometrijski DNS metodom (slika 22). Pored toga, u frakcijama 8-11 detektovana je još jedna traka (izoforma b) što ukazuje na postojanje dva enzima ili na izoforme koje koriste saharozu kao supstrat (slika 26c). Poređenjem rezultata utvrđeno je da se nijedna od navedenih izoformi ne poklapa sa prethodno opisanim InuA i InuE izoformama, slika 26c.

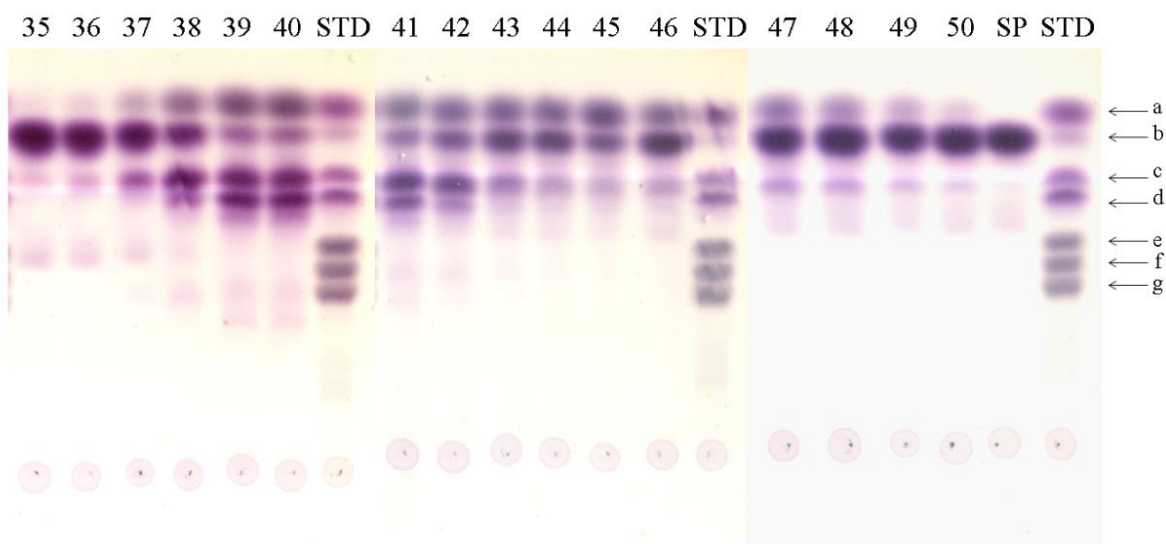
Zimogramska detekcija pojedinačnih enzima inulinaznog kompleksa je potvrdila da se oni međusobno razlikuju po pI vrednostima. Takođe je dala preciznije rezultate o aktivnostima InuA, InuE i FFase u frakcijama u kojima su već zabeležene ove enzimske aktivnosti.

3.5.1.2 Gel hromatografija

Frakcije sa najvećom fruktoziltransferaznom aktivnosti (10, 11, i 12) pokazuju različite proteinske profile u SDS PAGE, pri čemu su u sve tri prisutni proteini različitih molekulskih masa. Zbog toga smo se odlučili na dalje prečišćavanje FTase iz ove proteinske smeše, gel hromatografijom na koloni Sephacryl S300 HR, na sistemu hromatografije pod visokim pritiskom – FPLC (od *eng.* Fast protein liquid chromatography) koja obezbeđuje visoku rezolutivnost. Dobijenim frakcijama određene su invertazna (Slika 27) i fruktoziltransferazna aktivnost (Slika 28). Proteinski profil i stepen prečišćenja određen je SDS PAG elektroforezom (Slika 29).

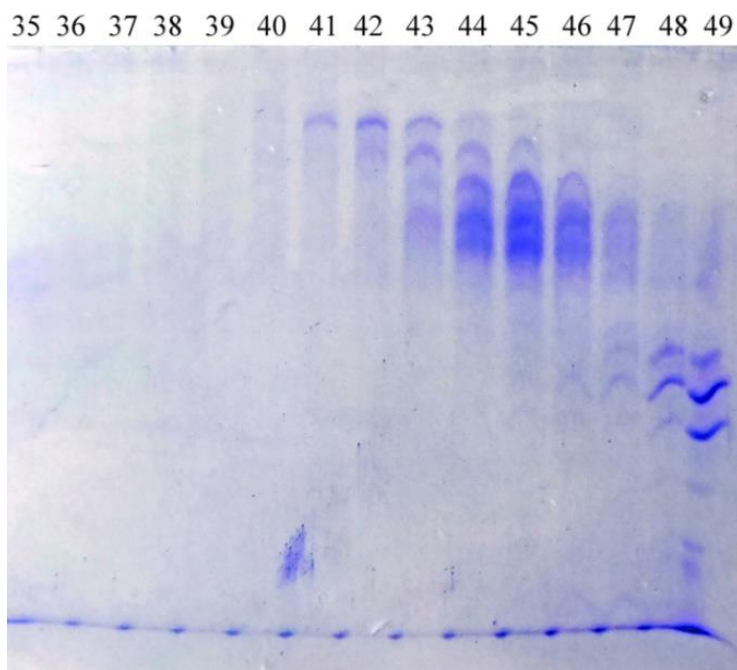


Slika 27. Invertazna aktivnost u frakcijama nakon gel hromatografije na Sephacryl S 300 HR matriksu



Slika 28. Analiza FTase aktivnosti (sinteza FOS_s od saharoze) u frakcijama nakon gel hromatografije; STD – standardi šećera (1 mg/mL svaki), označeni su strelicama; P-početni uzorak; 35-50 frakcije dobijene nakon hromatografije

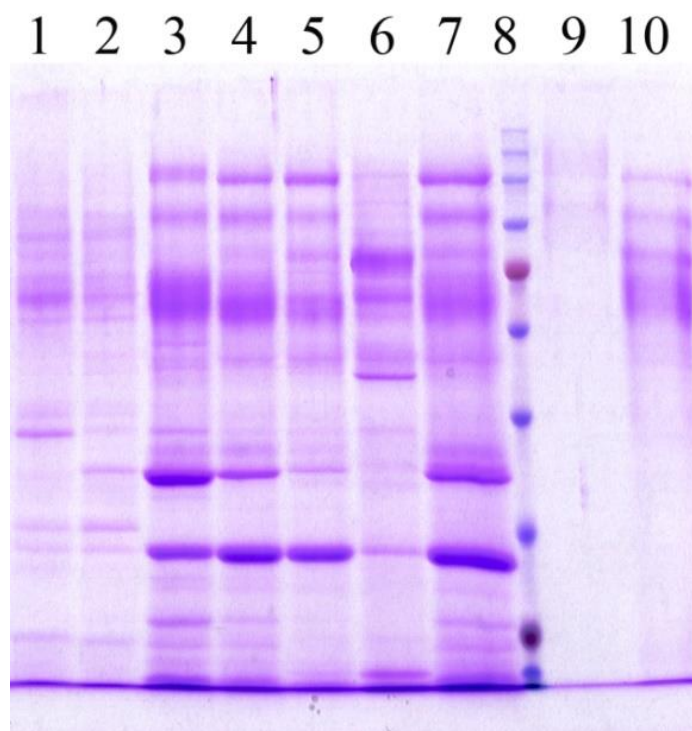
Najveća invertazna aktivnost je od 38. do 48. frakcije, sa pikom aktivnosti u 44. frakciji (Slika 27), dok je najveća fruktoziltransferazna aktivnost i produkcija FOS-ova dobijena u frakcijama 39, 40 i 41 (Slika 28). Poređenjem ovih rezultata može se zaključiti da pik invertazne aktivnosti ne odgovara piku fruktoziltransferazne aktivnosti.



Slika 29. Proteinski profil frakcija na SDS PAA gel nakon gel hromatografije; 35-49 frakcije nakon gel hromatografije

Rezultati SDS elektroforeze pokazuju da frakcije koje imaju najveću fruktoziltransferaznu aktivnost (frakcije 39-41) imaju vrlo malu količinu proteina u odnosu na frakcije koje imaju invertaznu aktivnost. Pored toga molekulske mase, samim tim i položaj proteinskih traka u analiziranim frakcijama se međusobno razlikuje, ukazujući na razdvajanje proteina, slika 29.

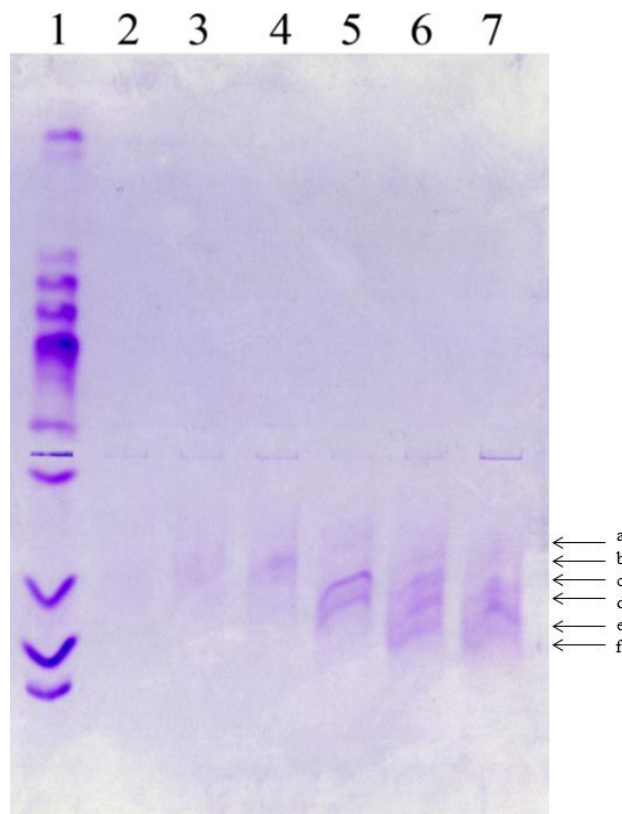
Svi koraci u prečišćavanju fruktoziltransferaze od sirovog ekstrakta do gel hromatografije i njeno odvajanje od ostalih enzima inulinaznog kompleksa analizirani su SDS PAG elektroforezom, slika 30. Redosled uzoraka nanošenih na SDS PAA gel je sledeći: 1) Sirovi ekstrakt; 2) Uzorak nakon dijalize tj. pre jonoizmenjivačke hromatografije na QAE Sephadex matriksu; 3-5) Frakcije 10, 11 i 12 nakon jonoizmenjivačke hromatografije, sa najvećom fruktoziltransferaznom aktivnošću; 6) Frakcija 16 nakon jonoizmenjivačke hromatografije, sa najvećom endoinulinaznom aktivnošću; 7) Spojene frakcije 10-12 sa IEX za gel hromatografiju na Sephacryl S300 HR matriksu; 8) Markeri (MM markera kDa: 245, 180, 135, 100, 75, 63, 48, 35, 25, 20, 17, 11); 9) Frakcija 40 nakon gel hromatografije - najveća fruktoziltransferazna aktivnost; 10) Frakcija 44 nakon gel hromatografije - najveća invertazna aktivnost



Slika 30. Proteinski profil enzima inulinaznog kompleksa tokom prečišćavanja na SDS PAA gelu. 1-10 redosled uzoraka je opisan u tekstu; 8- molekulski markeri

Na položajima 9 i 10 na slici 30 su prikazani proteinski profili prečišćene fruktoziltransferaze (traka 9) i invertaze (traka 10). SDS proteinski profil ukazuje na to da su ovi enzimi razdvojeni od ostalih proteina koji su bili prisutni u sirovom ekstraktu. Uspešno razdvajanje proteina potvrđeno je i detekcijom proteinskih traka CBB-om nakon završenog izoelektričnog fokusiranja (Slika 31). Redosled nanošenih uzoraka je sledeći: 1) Markeri; 2-4) Frakcije 39, 40 i 41, nakon gel hromatografije, koje pokazuju fruktoziltransferaznu aktivnost; 5-7) Frakcije 43, 44 i 45, nakon gel hromatografije, koje pokazuju invertaznu aktivnost, slika 20.

U uzorcima se zapaža postojanje različitih izoformi u frakcijama koje pokazuju fruktoziltransferaznu aktivnost (2,3 i 4) u odnosu na frakcije kod kojih je određena invertazna aktivnost (5,6,7). Iako bliskih pI vrednosti izoforme ovih enzima se ne poklapaju. U uzorcima 2, 3 i 4 zapažaju se izoforme a i b, dok su kod uzoraka 5, 6 i 7 prisutne ostale četiri izoforme (c,d,e i f), pri čemu su trake koje pripadaju izoformama c i d najintenzivnije u uzorku 5, slika 31.

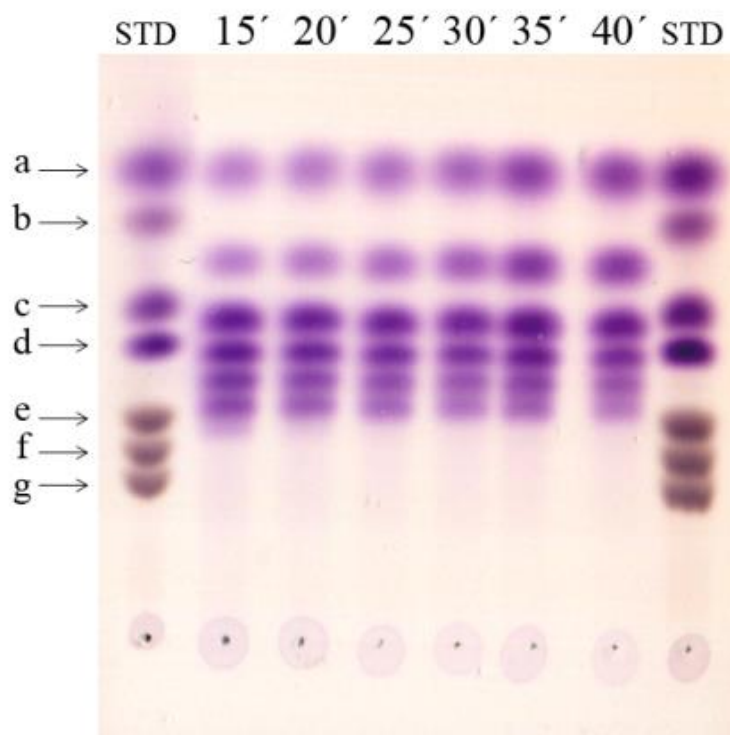


Slika 31. Proteinski profil prečišćenih fruktoziltransferaze i invertaze nakon gel hromatografije na PAA gelu nakon izoelektričnog fokusiranja; opis uzoraka je dat u tekstu; strelice pokazuju pozicije enzimskih izoformi.

Možemo zaključiti da su prečišćavanjem uspešno razdvojeni glavni enzimi inulinaznog kompleksa odgovorni za produkciju FOS-ova – InuA za dobijanje FOS_h i FTase za dobijanje FOS_s. Frakcija 40 (nakon gel hromatografije), koja pokazuje najveću fruktoziltransferaznu aktivnost i koja ima veoma malu koncentraciju ostalih proteina na SDS PAG elektroforezi, koristi za enzimsku karakterizaciju (određivanje temperaturnog i pH optimuma, pI enzima, supstratne specifičnosti) i produkciju FOS_s. A frakcija 16 posle jonoizmenjivačke hromatografije koja je imala najveću endoinulinaznu (InuA) aktivnost je iskorišćena za produkciju FOS_h kontrolisanom hidrolizom inulina.

3.5.2 Produkcija fruktooligosaharida hidrolizom inulina prečišćenom endoinulinazom

Iako je dosta urađeno i poznato na polju endoinulinaze pre svega zbog uloge koju ima u industriji, cilj ovog eksperimenta je produkcija FOS-ova prečišćenom endoinulinazom i praćenje kinetike reakcije hidrolize inulina. Korišćena je frakcija 16 nakon jonoizmenjivačke hromatografije na QAE Sephadex matriksu, koja predstavlja pik inulinazne aktivnosti (119,53 U/mL). Literaturni podaci pokazuju da je pH optimum za maksimalnu efikasnost hidrolize inulina endoinulinazom gljiva roda *Aspergillus* na pH 5,0 i temperaturi 55 °C (Skowronek & Fiedurek, 2006). Reakcije dobijanja FOS_h urađene su na pH 6,0 i temperaturi od 45 °C, korišćenjem 5% inulina sa ciljem dobijanja oligosaharida različitih dužina, a ne potpune hidrolize inulina (do fruktoze). Hidroliza inulina ispraćena je u vremenu, u opsegu od 15 do 40 minuta, pri čemu je reakcija prekidana na svakih 5 minuta. Proizvodi reakcije analizirani su TLC-om, slika 32.



Slika 32. TLC analiza fruktooligosaharida dobijenih hidrolizom inulina prečišćenom endoinulinazom u vremenu. Strelice prikazuju položaj standardnih šećera (STD – (1mg/mL))

Rezultati pokazuju da je reakcija produkcije FOS-ova razgradnjom inulina kinetički zavisna. Sa povećanjem vremena reakcije povećava se koncentracija mono- i disaharida. Već u 15-om minutu reakcije dobijen je profil FOS-ova sa oligosaharidima većeg stepena polimerizacije (DP) slika 32. Najveća količina sintetisanih FOS_h je postignuta između 15. i 25. minuta reakcije pri čemu dobijena smeša sadrži manje mono- i disaharida.

Kontrolisanjem vremena trajanja reakcije može se varirati sastav produkovanih fruktooligosaharida (FOS_h) u zavisnosti od potreba njihove eventualne primene u industriji.

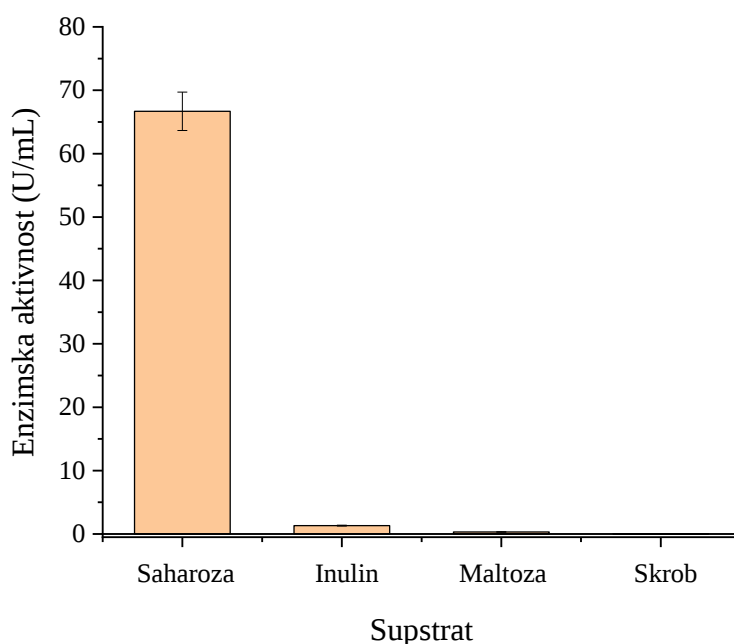
3.5.3 Biohemijska karakterizacija fruktoziltransferaze

Fruktoziltransferaza (FTase) kao najznačajniji enzim za proizvodnju FOS_s je biohemijski okarakterisana sa ciljem da se njene osobine iskoriste za što je moguće efikasnije dobijanje FOS-ova.

3.5.3.1 Određivanje supstratne specifičnosti

U literaturi je pokazano da enzim koji ima ulogu u sintezi fruktooligosaharida hidrolizuje glikozidnu vezu u molekulu saharoze, a dobijenu fruktozil grupu u reakciji tranferovanja koristi za sintezu oligosaharida [172].

Cilj ovog eksperimenta je da se ispita da li izolovani i prečišćeni enzim, sa potvrđenom transferaznom aktivnošću prema saharози, može da hidrolizuje oligosaharide povezane α (1→4) glikozidnom vezom. U tu svrhu korišćeni su maltoza i skrob. Takođe je ispitana i mogućnost razgradnje inulina i hidroliza β (2→1) veze kojom su molekuli fruktoze povezani. Postavljene reakcione smeše sadržale su enzim sa fruktoziltransferaznom aktivnošću i supstrate inulin, maltozu i skrob (0,5%, 10% i 1%, redom).

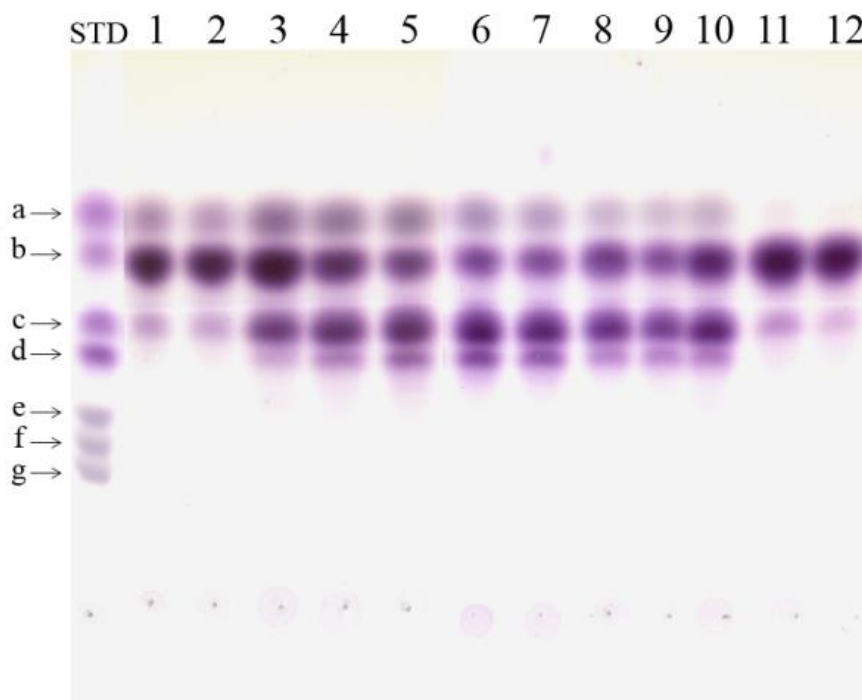


Slika 33. Aktivnost enzima FTase (U/mL) prema različitim supstratima

Najveća aktivnost enzima bila je prema saharozi kao supstratu i zanemarljiva aktivnost prema inulinu. Enzim ne pokazuje aktivnost prema maltozi i skrobu, što govori da nema sposobnost hidrolize α (1 $\rightarrow$ 4) glikozidne veze (Slika 33). Supstratna specifičnost FTase iz *A. welwitschiae* FAW1 je najbližija supstratnoj specifičnosti enzima SucB, koji hidrolizuje β -glikozidnu vezu u malim supstratima kao što su saharoza, kestoza i nistoza, dok kod inulina i levana nije zabeležena hidrolitička aktivnost kao ni raskidanje α -glikozidne veze u trehalozi, turanozi, melizitozi [141]. Dalja karakterizacija enzima podrazumevala je određivanje pH i temperaturnog optimuma fruktoziltransferaznog enzima.

3.5.3.2 Određivanje pH optimuma fruktoziltransferaze

Fruktoziltransferazna aktivnost ispitivana je na različitim pH vrednostima, tačnije u opsegu pH od 3,0 do 8,5. Kao supstrat je korišćen 60% rastvor saharoze. Nakon reakcije koja je trajala 24 h na 60 °C uzorci su razblaženi 60 puta, a dobijeni proizvodi analizirani su TLC hromatografijom. Redosled fruktooligosaharida produkovanih radom enzima na različitim pH vrednostima prikazanih na slici 34 je: 1 – pH 3,0; 2 – pH 3,5; 3 – pH 4,0; 4 – pH 4,5; 5 – pH 5,0; 6 – pH 5,5; 7 – pH 6,0; 8 – pH 6,5; 9 – pH 7,0; 10 – pH 7,5; 11 – pH 8,0; 12 – pH 8,5. Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da je aktivnost enzima, a samim tim i produkcija FOS-ova pH zavisna reakcija. Iako je enzim aktivan u širokom opsegu pH vrednosti (pH 4,0 – pH 7,5), o čemu nam govore produkovani FOS-ovi, njihov sastav zavisi od pH sredine.



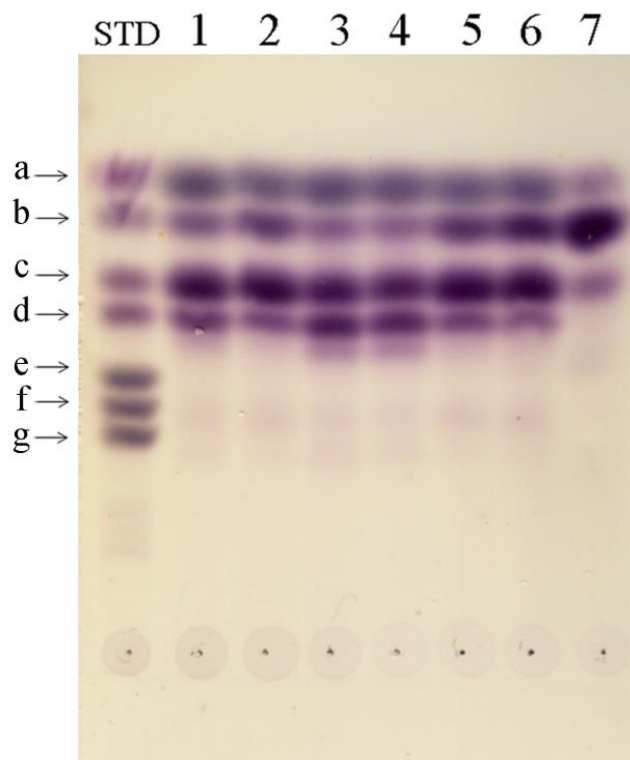
Slika 34. TLC analiza FOS_s dobijenih dejstvom FTase na različitim pH; STD – standardi šećera (1 mg/mL) označeni su strelicama od a-g. 1-12 su uzorci dobijeni na pH vrednostima koje su opisane u tekstu

Najveća aktivnost fruktoziltransferaze je dobijena na pH 5,5. Na ovoj pH vrednosti je dobijena najveća količina kestoze i nistoze, dok je količina mono- i disaharida vidno manja u poređenju sa uzorcima dobijenim pri drugim pH vrednostima. Literaturni podaci pokazuju da je pH optimum i drugih fruktoziltransferaza između 4,5 i 6,5 [127,173,174].

3.5.3.3 Određivanje temperaturnog optimuma fruktoziltransferaze

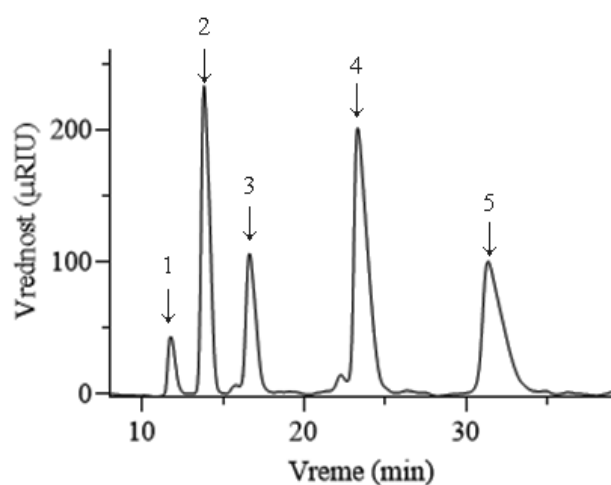
Fruktoziltransferazna aktivnost ispitivana je na različitim temperaturnim vrednostima, u opsegu 40 °C do 70 °C, pri čemu je svaka reakcija postavljana na temperaturi većoj za 5 °C. Kao supstrat je korišćen 60% rastvor saharoze na pH 5,5. Nakon reakcije (24 h) uzorci su razblaženi 60 puta, a dobijeni proizvodi detektovani su TLC hromatografijom. Redosled fruktooligosaharida produkovanih radom enzima na različitim temperaturnim vrednostima prikazanih na slici 35 je: 1- 40 °C; 2 - 45 °C; 3- 50 °C; 4 - 55 °C; 5- 60 °C; 6 - 65 °C; 7 - 70 °C.

Na osnovu dobijenih rezultata (Slika 35) zaključeno je da je aktivnost fruktoziltransferaze, a samim tim i produkcija FOS-ova zavise od temperature na kojoj se reakcija odvija. Dokazano je da je enzim aktivan u širokom temperaturnom opsegu (40 °C – 65 °C), što pokazuju i literaturni podaci dobijeni analizom drugih fruktoziltransferaza [174]. Najveća količina ukupnih FOS-ova dobijena je na temperaturama 50 °C i 55 °C (Slika 35). Najveća fruktoziltransferazna aktivnost je nađena i kod *A. niger* AS0023 na 50 °C [127].



Slika 35. TLC analiza FOS_s dobijenih dejstvom FTase na različitim temperaturama; STD – standardi šećera (1 mg/mL) označeni su strelicama od a-g. 1-7 su uzorci dobijeni na temperaturama koje su opisane u tekstu

Dalja analiza fruktooligosaharida dobijenih na temperaturama 45, 50, 55 i 60 °C urađena je HPLC metodom. Optimalni uslovi reakcije (pH 5,5) i povećana fruktoziltransferazna aktivnost kao rezultat daju veću količinu fruktooligosaharida, pretežno kestoze i nistoze. Najveća količina ovih oligosaharida sintetisana je u reakciji koja se odvijala na 50 i 55 °C, slika 36. HPLC analiza potvrdila je rezultat dobijen TLC analizom. Pojedinačne komponente u smeši fruktooligosaharida su uspešno razdvojene, omogućavajući preciznu kvantifikaciju svake komponente, korišćenjem standardnih kriva za fruktozu, glukozu, saharozu, kestoze i nistoze.



Slika 36. HPLC hromatogram FOS_s dobijenih na 55°C; strelicama su označeni pikovi koji odgovaraju standardima 1 – fruktoza; 2 – glukozu; 3 – saharozu; 4 – kestoza; 5 – nistoza

Pored oligosaharida detektovana je i određena koncentracija monosaharida, od kojih veći udeo ima glukozu koja zaostaje nakon reakcije hidrolize saharoze. Nije primećeno preklapanje pikova ili ometajućih jedinjenja koja se mogu naći u smeši sa enzimima korišćenim u procesu dobijanja fruktooligosaharida. Komponente smeša su identifikovane poređenjem retencionih vremena koja su dobijena za dostupne standarde i uzorke u uslovima razvijene metode.

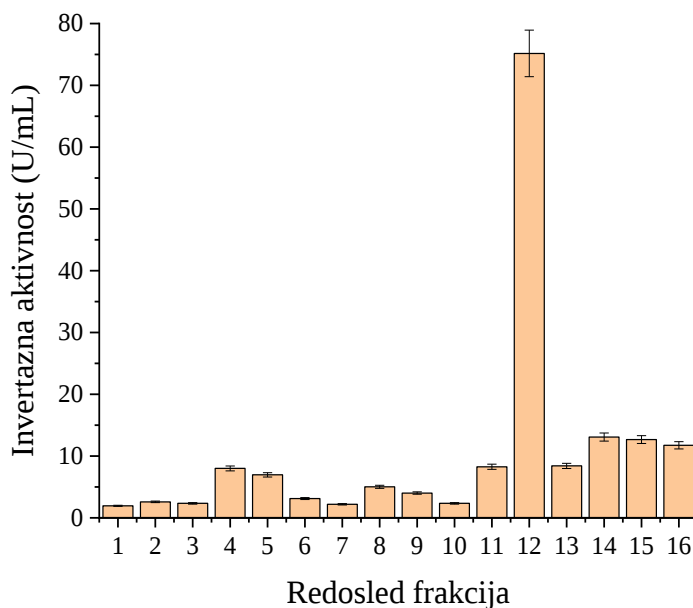
Optimalni uslovi pri kojima se dobijaju FOS_s upotrebom FTase *A. welwitschiae* FAW1 podrazumevaju reakciju sa 60% saharozom u rastvoru pH 5,5 pri temperaturi od 55 °C u trajanju od 24 h.

HPLC i TLC analize su pokazale da je udeo zaostale neiskorišćene saharoze veoma mali što ukazuje na visoku efikasnost enzima. Kontrolisana reakcija na različitim temperaturama i pri različitim uslovima će usloviti dobijanje različitih FOS profila. Ovo je značajno jer se u zavisnosti od potreba potencijalnog tržišta FOS-ova upotrebom jednog istog enzima – fruktoziltransferaze iz *A. welwitschiae* FAW1 mogu dobiti različiti profili FOS-ova.

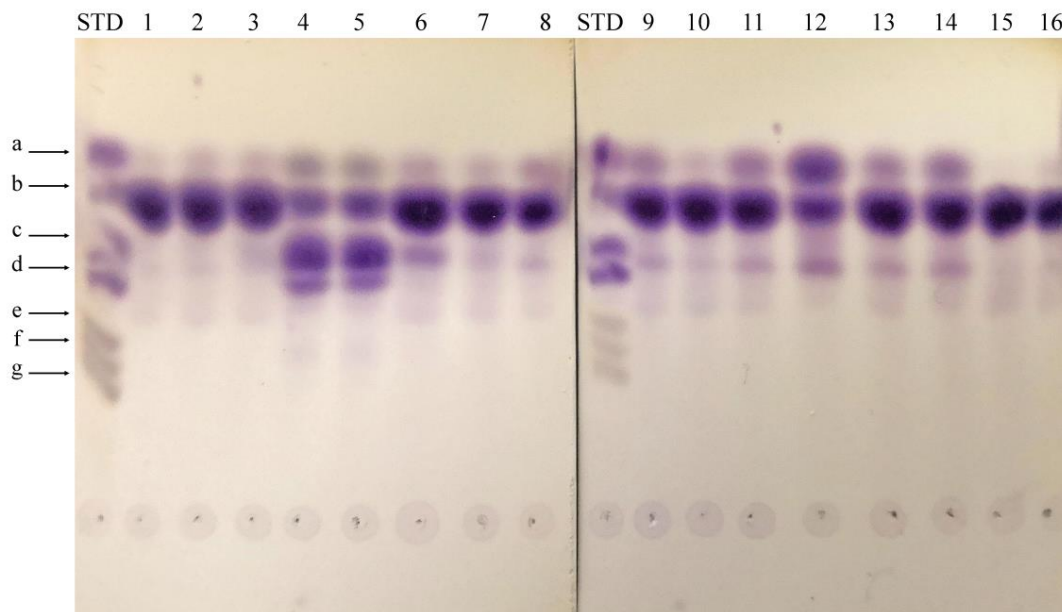
3.5.3.4 Određivanje pI vrednosti fruktoziltransferaze

Pored određivanja pI enzima, a vođeni nedovoljnim preciznim podacima iz literature o postojanju jednog enzima sa dvojakom funkcijom ili prisustvom dva enzima (FTase i FFase), pokušali smo da elektroforetskim razdvajanjem po pI vrednosti eventualno nađemo odgovor na ovo pitanje. Proteini iz frakcije 40 nakon gel hromatografije sa najvećom fruktoziltransferaznom aktivnosti su razdvojeni izoeletričnim fokusiranjem. Iz gela su ekstrahovani svi razdvojeni proteini po pH zonama, tako da svaki uzorak može da sadrži samo proteine jedne pI vrednosti.

Ekstraktima je određena fruktoziltransferazna aktivnost i rezultati su prikazani na slici 38. Pored toga urađena je i invertazna aktivnost, ne bi li ustanovili da li isti uzorci pokazuju jednaku aktivnost u reakciji sa manjom koncentracijom saharoze, a rezultati su prikazani na slici 37. Rezultati bi ukazali na to da li je u pitanju isti enzim koji ispoljava dve aktivnosti u zavisnosti od koncentracije supstrata ili dva različita enzima.



Slika 37. Invertazna aktivnost (U/mL) u uzorcima ekstrahovanim iz gela nakon izoelektičnog fokusiranja; 1-16 uzorci dobijeni ekstrakcijom enzima iz horizontalno sečenih traka IEF PAA gela po pH vrednostima



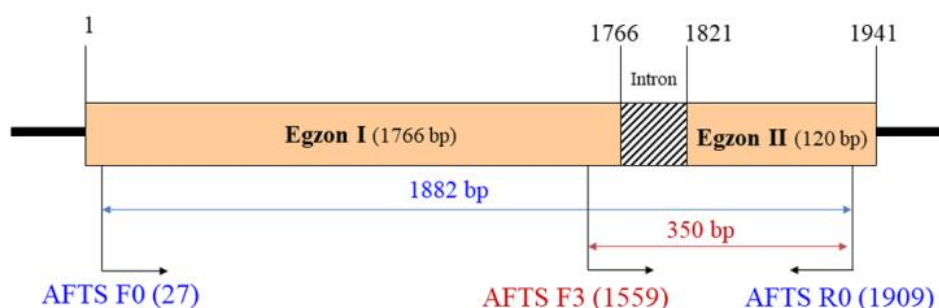
Slika 38. FTase aktivnost u uzorcima ekstrahovanim iz gela nakon izoelektričnog fokusiranja; TLC analiza FOS_s. Redosled uzoraka: STD – standardi šećera (1-fruktoza; 2-saharoza; 3-kestoza; 4-nistoza; 5-maltopentaoza; 6-maltoheksaoza; 7-maltoheptaoza (1 mg/mL svaki); 1-16 uzorci dobijeni ekstrakcijom enzima iz horizontalno sečenih traka IEF PAA gela po pH vrednostima

Najveća invertazna aktivnost određena je u frakciji 12 (Slika 37), dok uzorci 4 i 5 imaju vrlo malu, skoro zanemarljivu invertaznu aktivnost. Proizvodi dobijeni u reakciji sinteze FOS-ova korišćenjem 60% saharoze kao supstrata analizirani su tankoslojnom hromatografijom (TLC) (Slika 38). Rezultati aktivnosti pokazuju sintezu FOS-ova samo u uzorcima 4 i 5 ukazujući na postojanje fruktoziltransferazne aktivnosti. Dobijeni rezultati pokazuju da je pI frakcija koje pokazuju fruktoziltransferaznu aktivnost i pI frakcija koje pokazuju invertaznu aktivnost vrlo bliska, ali da se ne poklapa, što može da ukazuje na prisustvo različitih enzima. S obzirom na to da je prethodno određena pH vrednost svih frakcija dobijenih izolovanjem iz gela pI enzima sa fruktoziltransferaznom aktivnošću je između 4,46 i 4,85. A pI vrednost invertaze odgovara određenoj pH vrednosti 6,8. Detektovanje traka sa različitim pI vrednostima može da ukazuje na prisustvo dva enzima, ali takođe može i da ukazuje na prisustvo jednog enzima (kodiranog jednim genom) koji se eksprimira u nekoliko različitih proteina – izoenzimi. Sledeći korak u karakterizaciji fruktoziltransferaze je bio pronalaženje i analiza gena odgovornog za eksprimiranje enzima.

3.5.4 Karakterizacija enzima za produkciju fruktooligosaharida na nivou gena

Za detaljniju karakterizaciju FTase pristupili smo pronalaženju gena koji je odgovoran za njegovu ekspresiju u *A. welwitschiae* FAW1. U literaturi se geni *sucA* i *suc1* vezuju za detektovane FTase i FFase aktivnosti u *Aspergillus* spp. *SucA* gen nađen u *A. niger* je po objavljenoj sekvenciji odgovarao genu *suc1* [138]. U prethodnim istraživanjima *suc1* gen iz *A. niger* B60 je kompletno sekvenciran, a nakon translacije dobijena aminokiselinska sekvenca sadrži oko 566 aminokiselina, dajući molekulsku masu od oko 61 kDa, što kad uporedimo sa podacima dobijenim za molekulsku masu govori da ugljeno hidratna komponenta čini oko 50% ukupne mase proteina [126]. Zbog detaljnih dostupnih podataka o genu *suc1* izabrali smo da u sekvenciranom genomu *A. welwitschiae* FAW1 analiziramo prisustvo i ekspresiju ovog gena.

Za potrebe pronalaženja gena koji kodira enzim odgovoran za sintezu FOS_s kod *A. welwitschiae* izolovana je DNA CTAB metodom, opisanom u poglavlju 4.1.1.1 koja je dalje korišćena za umnožavanje *suc1* gena. Izolatu *A. welwitschiae* FAW1 je sekvenciran genom (MicrobesNG, Birmingham, UK). Dobijena sekvencija izolata FAW1 je analizirana korišćenjem programa Artemis [255]. Pregledom javno dostupne sekvencije *A. niger* (CBS 513.88 assembly ASM285v2) potvrđeno je prisustvo *suc1* gena i ta sekvencija je korišćena za pronalaženje gena u sekvenciji genoma *A. welwitschiae* FAW1 dobijenoj sekvencioniranjem NGS-om. Korišćenjem ove dve sekvencije *suc1* gena u *A. niger* i *A. welwitschiae*, dizajnirani su prajmeri u intronu što je bliže bilo moguće 5' odnosno 3' kraju, specifični za ovaj gen kod obe vrste. Dizajnirani su i sintetisani prajmeri sledećih sekvencija: Forward prajmer (Afts F0) (5'-TGC TCG GCA GTG CTG CTG-3') i reverse prajmer (Afts R0) (5'-TCC GGC CAA GCA TCA TAC AA-3') koji su korišćeni za umnožavanje *suc1* gena. Prajmeri se vezuju za deo sekvencije kao što je prikazano na slici 39.

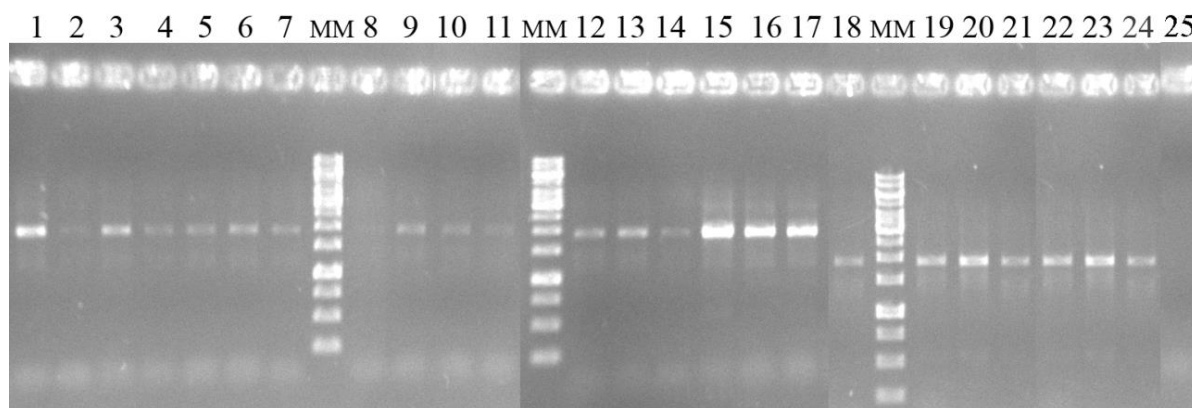


Slika 39. Shematski prikaz *suc1* gena za sa naznačenim mestima vezivanja prajmera

Tokom optimizacije PCR reakcije isprobane su različite temperature anealing koraka (od 45 °C do 65 °C) kao i različito vreme anealinga (od 30, 45 i 60 sekundi). Najbolji rezultat dobijen je u reakciji gde korak anealing-a traje 45 sekundi na 65 °C. Pored uobičajenih komponenti PCR smeša je sadržala BSA i DMSO za koje je pokazano da povećavaju umnožavanje ciljanog gena.

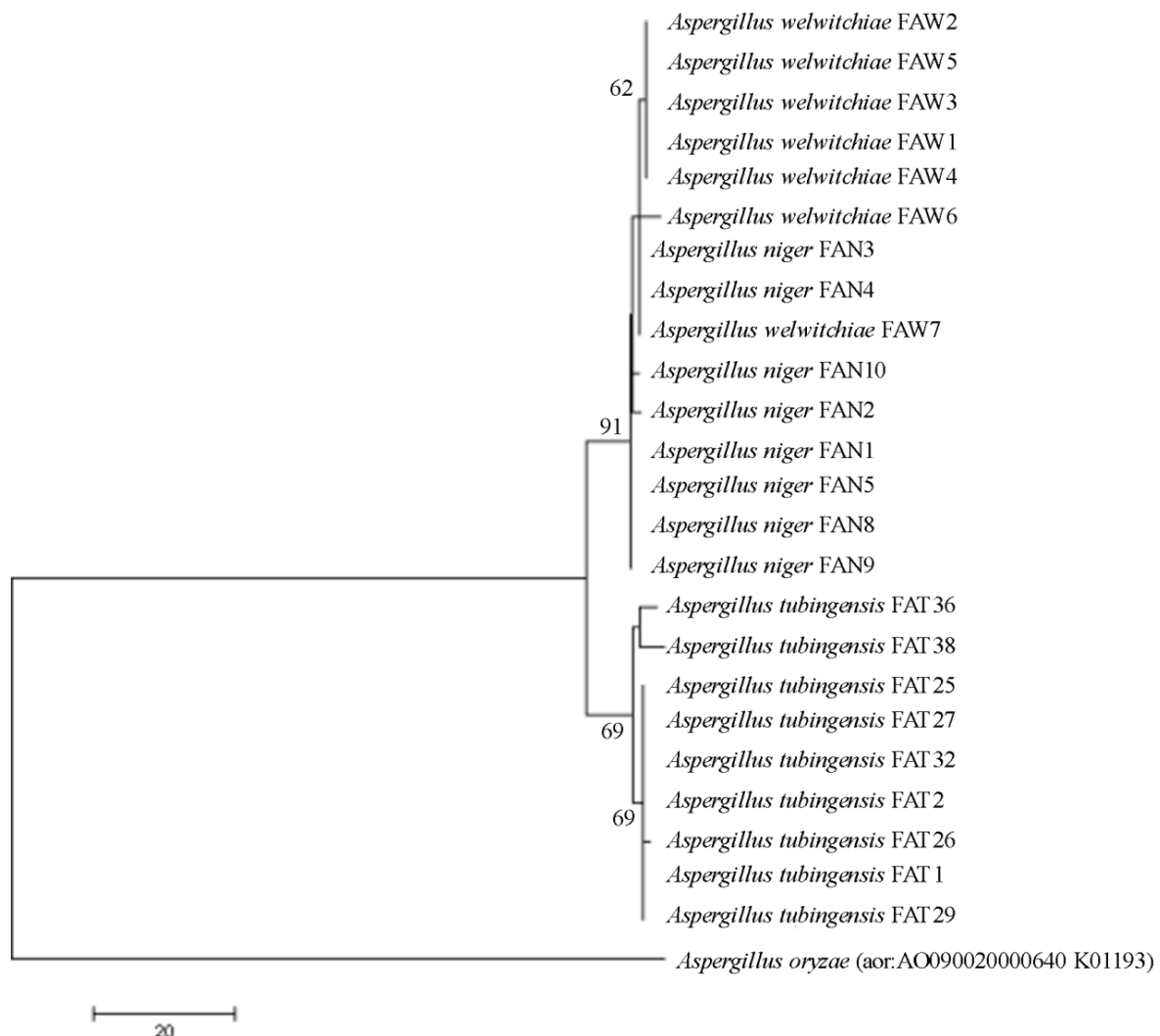
3.5.4.1 Analiza sekvencije *suc1* gena

Novodizajniranim prajmerima uspešno je umnožen *suc1* gen kod svih analiziranih izolata *A. niger*, *A. welwitschiae* i *A. tubingensis*. Dobijeni amplikoni su vizuelizovani u 1% agaroznom gelu, rezultati su prikazani na slici 40. Veličina proizvoda dobijenog PCR umnožavanjem gena korišćenjem gore navedenih prajmera bi trebala da bude oko 1882 bp, slika 40.



Slika 40. Detekcija umnoženog *suc1* gena agaroznom elektroforezom kod izolata *A. niger*, *A. welwitschiae* i *A. tubingensis*. MM - 1 kb DNA markeri; 1-8 *A. niger*; 9-16 *A. welwitschiae*; 17-24 *A. tubingensis*; 25- negativna kontrola

Dobijeni amplikoni su sekvencionirani nakon čega su sekvencije poređene sa javno dostupnim sekvencijama korišćenjem BLAST algoritma, i potvrđene kao sekvencije *suc1* gena. Nukleotidne sekvencije su prevedene u aminokiseline sekvencije (MegaX) i korišćene za konstrukciju proteinskog filogenetskog stabla prikazanog na slici 41. Evoluciona istorija zasnovana na *suc1* genu od 24 sekvencija dobijenih u ovoj tezi, referentnih sojeva *A. niger*, *A. welwitschiae* i *A. tubingensis* je izvedena korišćenjem metode Maximum likelihood (MEGA X) primenom Hasegawa-Kishino-Yano modela koji koristi Gama distribuciju kao najprikladniji model zamene. Inicijalna stabla dobijena su primenom Neighbor-Join i BioNJ algoritama. *Suc1* gen iz soja *Aspergillus oryzae* (acc. No. u KEGG bazi podataka aor:AO090020000640 K01193) korišćen je kao takson van grupe za koren drveta. Da bi se procenio statistički značaj pretpostavljenih klada, urađeno je 1.000 bootstrapova. U filogenetskom stablu *suc1* gena, sojevi *A. niger* i *A. welwitschiae* grupisali su se u zajednički klaster, dok su se sojevi *A. tubingensis* grupisali u svoj poseban klaster, slika 41.



Slika 41. Filogenetsko stablo *suc1* aminokiselinskih sekvencija izolata vrsta roda *Aspergillus* sekcije *Nigri*. *Aspergillus oryzae* koji ne pripada sekciji *Nigri* predstavlja koren stabla.

Rezultati dobijeni međusobnim upoređivanjem grupa pokazuju da su razlike u aminokiselinskim sekvencijama eksprimiranog *suc1* gena koje postoje između ispitivanih vrsta veoma male. Sekvencije *A. welwitschiae* i *A. niger* poklapaju se 99,6%. Aminokiselinske sekvencije *A. tubingensis* sojeva se poklapaju sa *A. welwitschiae* 97,5% a sa *A. niger* vrstama

97,6%. Korelacijom rezultata enzimske aktivnosti i prikazanim sekvencijama među vrstama je moguće u daljim istraživanjima doći do odgovora na pitanje mehanizma dejstva enzima odgovornog za produkciju FOS.

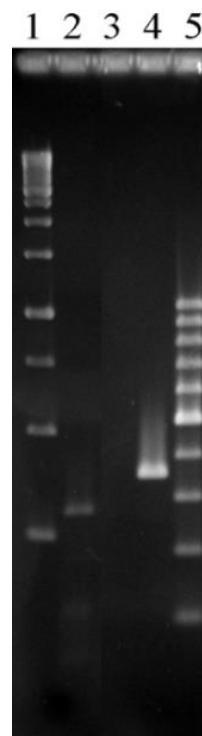
3.5.4.2 Provera ekspresije *suc1* gena

Nakon poređenja nukleotidnih sekvencija *suc1* u drugim sojevima vrsta roda *Aspergillus* napravljen je forward prajmer Afts F3 koji ima veću specifičnost i bolje vezivanje za određeni deo nukleotidne sekvence (slika 39). Prajmer je dizajniran tako da prepozna i vezuje se bliže 3' kraju sekvencije egzona I i obuhvata intron, kao što je naznačeno na slici 39 da bi mogli da se razlikuju ampliconi iz rtPCRa na mRNA i PCRa na DNA.

Da bismo analizirali i ispitati ekspresiju gena *suc1* bilo je potrebno detektovati odgovarajuću RNA koja nastaje transkripcijom gena. Iz micelijuma *A. welwitschiae* FAW1 odgajenog na PDA je izolovana ukupna RNA. Izolovana RNA je tretirana enzimom dezoksiribonukleazom (DNaza) da bi se osiguralo prisustvo samo RNA. Korišćenjem reverse prajmera Afts R0 je iz ukupne RNA metodom reverzne transkripcije (RT-PCR - od eng. reverse transcription polymerase chain reaction) dobijena specifična komplementarna DNA (cDNA) koja odgovara funkcionalnom *suc1* genu i ne sadrži intron.

Prajmeri Afts F3 i Afts R0 su korišćeni za umnožavanje gena *suc1* iz cDNA. Nastali PCR proizvod je veličine od oko 280-290 bp i predstavlja komplementarni zapis informacione RNA za gen *suc1*. Kao kontrola upotrebom istih prajmera je iz genomske DNA umnožen proizvod veličine od oko 350 bp koji odgovara delu gena *suc1* i sadrži i intron (kao što je naznačeno na slici 39) od čega potiče uočljiva razlika u masama i pokretljivosti u agaroznoj gel elektroforezi što je prikazano na slici 42.

Prikazani rezultati ekspresije gena *suc1* su potvrdili prisustvo introna i dokazali da se ispitivani gen eksprimira. Opisani način za dokazivanje prisustva cDNA se može dalje koristiti u ispitivanjima kontrole ekspresije gena *suc1* pri različitim uslovima produkcionih fermentacija a time i za povećanje nivoa produkovanog enzima.



Slika 42. Detekcija cDNA gena *suc1*; 1 – 1 kb DNA markeri; 2 - RNA prevedena u cDNA u RT koraku; 3 – negativna kontrola; 4 – pozitivna kontrola, DNA; 5 – 100 bp DNA markeri.

3.6 Zaključci

- Izolovano je 39 čistih kultura (sa različitih supstrata) koji pokazuju morfološke karakteristike crnih *Aspergillus* vrsta koje su identifikovane do nivoa vrste.
- Razvijen je test za brzu selekciju inulinaznih proizvođača među izolatima gljiva iz roda *Aspergillus*, kojim se može ispitati veliki broj sojeva.
- Većina izolata *A. niger* i *A. welwitschiae* i polovina izolata *A. tubingensis* dali su pozitivne rezultate u difuzionom testu. Tri soja *A. welwitschiae* (FAW1, FAW6, FAW9) pokazali su se kao najbolji proizvođači inulinaznih enzima.
- Proizvodnja mikotoksina FB2 je potvrđena u izolatima FAW2, FAW3, FAW4, FAW5 i FAW9. Nijedan analizirani izolat ne proizvodi mikotoksin FB1.
- FAW1 i FAW6 ne poseduju kompletne klastere gena za produkciju mikotoksina OTA i FB.
- FAW1 se izdvojio kao najpogodniji soj za produkciju enzima inulinaznog kompleksa za upotrebu u proizvodnji FOS-ova.
- Aktivnost produkovanih enzima inulinaznog kompleksa InuA, InuE, FTase, FFase zavisi od supstrata korišćenog tokom gajenja soja FAW1. Gajenjem na podlozi sa jerusalimskom artičokom i pšeničnim mekinjama sa dodatim peptonom (AWP+) produkuje najveću aktivnost FFase (6,3 U/mL). Gajenjem soja na podlozi koja sadrži samo lomljeno zrno tritikalea (T) dobija se najveća egzoinulinazna aktivnost (InuE) (2,4 U/mL) kao i najveća endoinulinazna aktivnost (InuA) (34 U/mL).
- Razvijena je metoda za simultanu detekciju enzima koji pripadaju inulinaznom kompleksu (InuA, InuE, FTase) nakon jednog elektroforetskog razdvajanja enzima.
- Ceo inulinazni kompleks enzima gljive *A. welwitschiae* FAW1 može se koristiti za proizvodnju FOS-ova bez prethodnog prečišćavanja pojedinačnih enzima.
- Dobijeni FOS_s i FOS_h poseduju značajan antioksidativni potencijal što ih čini dobrim kandidatima za dodatak funkcionalnoj hrani.
- Koprodukcijom kompleksa inulinaznih enzima pokazano je da se ista gljiva može koristiti za obe metode dobijanja FOS-ova (FOS_s i FOS_h) u zavisnosti od podloge na kojoj se uzgaja.
- Uspešno su prečišćeni glavni enzimi inulinaznog kompleksa odgovorni za produkciju FOS-ova – InuA za dobijanje FOS_h i FTase za dobijanje FOS_s.
- Optimalni uslovi za dobijanje FOS_h, upotrebom prečišćene endoinulinaze *A. welwitschiae* FAW1, podrazumevaju 5% rastvora inulina, pH 6,0, temperaturu od 45 °C tokom reakcije koja traje do 25 minuta.
- Optimalni uslovi sinteze FOS_s upotrebom FTase *A. welwitschiae* FAW1 podrazumevaju reakciju u 60% -tnoj saharozi, na 55 °C, 24 h na pH 5,5.
- U genomu *A. welwitschiae* FAW1 potvrđeno je prisustvo gena *suc1* koji se smatraju odgovornim za ekspresiju enzima fruktoziltransferaze (FTase) i β-fruktofuranozidaze (FFase)
- *A. welwitschiae* FAW1 je potencijalni industrijski proizvođač enzima za proizvodnju FOS_h i FOS_s.

4 Eksperimentalni deo

Spisak korišćene opreme:

- Tehnička vaga Mettler PE 3600 i analitička vaga Mettler
- Kada za horizontalnu elektroforezu Pharmacia LKB Multiphor II
- Kada za vertikalnu elektroforezu, Hoefer, SE 250 Mini
- Kada za horizontalnu elektroforezu Biorad
- Ispravljači Pharmacia Biotech EPS 3500, Pharmacia ECPS 2000/300, Bio Rad
- Protočni vodeni termostat Pharmacia Biotech, Multitemp III
- Inkubator-šejker IKA KS 4000i control
- Inkubator šejker Innova 40R, temperature control 4-60°C
- Inkubator Memmert INB 300
- Inkubator Memmert, Humidity chamber HCP
- Spektrofotometar, Shimadzu UV1800
- pH metar, InoLab
- Konduktometar WTW LF521, inoLab
- Mikrotalasna pećnica, Samsung
- Centrifuga, miniSpin plus, Eppendorf, Sigma
- Centrifuga Thermo Scientific SL40R
- Eppendorf Personal MasterCycler i T3 Thermocycler, Biometra
- Bio Rad Geldoc XR

4.1 Odabir potencijalnih proizvođača inulinaza gljiva *Aspergillus* spp.

Odabir ili skrining potencijalni producera među izolatima gljiva roda *Aspergillus* obuhvata nekoliko: izolovanje gljiva iz prirodnih staništa, njihova i identifikacija do nivoa vrste i testiranje na mogućnost produkcije inulinaza. Kao nezaobilazna faza ovde je uključeno i ispitivanje odabranih sojeva na sintezu mikotoksina kako bi se postigao najvažniji uslov za korišćenje enzima u dobijanju FOS-ova, zato što se samo sojevi koji ne produkuju mikotoksine smatraju bezbednim za korišćenje u procesima proizvodnje hrane.

4.1.1 Izolovanje gljiva roda *Aspergillus* spp.

Gljive su izolovane sa različitih supstrata (Tabela 1) u periodu od 2000. do 2012. godine. Izolovanje je urađeno standardnim mikrobiološkim tehnikama prenošenjem konidija na krompir dekstrozni agar – PDA (od *eng.* potato dextrose agar) na Petrijevim šoljama i inkubacijom na 28 °C tokom 7 dana. Nakon inkubacije, ploče su pregledane i spore gljiva su prenete na novi PDA. Čiste kulture se čuvaju u 25% rastvoru glicerola, u laboratorijskoj banci sojeva UB483 na -70 °C.

4.1.2 Identifikacija *Aspergillus* spp. izolata

4.1.2.1 Ekstrakcija DNA

- Rastvori
 - 5 M NaCl
 - NaCl 29,22 g
 - Voda do 100 mL

- 1 M Tris-HCl

- Tris 12,11 g
- Voda do 100 mL

Dotitrovati rastvorom HCl do pH 8,0

- 0,5 M EDTA

- EDTA 18,61 g
- Voda do 100 mL

Dotitrovati rastvorom NaOH do pH 8,0

	Za 100 mL rastvora	Fin. koncentracija
- <u>2 % CTAB pufer</u>		
- CTAB (cetiltrimetil-amonijum-bromid)	2,0 g	2%
- 1 M Tris-HCl (pH 8,0)	10 mL	100 mM
- 5 M NaCl	28 mL	1,4 M
- 0,5 M EDTA (pH 8,0)	4 mL	20 mM
- Voda do	100 mL	/

- Hloroform

- Izopropanol

- 70% etanol

- 1xTE pufer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)

- 1 M Tris-HCl (pH 8,0) 1 mL
- 0,5 M EDTA (pH 8,0) 200 µL
- Voda do 100 mL

Dotitrovati do pH 8,0

• Postupak

Izolati gljiva gajeni su 2 dana na PDA podlozi na 28 °C. Dobijeni beli micelijum je sterilnim skalpelom pažljivo skinut sa površine podloge i prebačen u ependorf. Uzorci su potom zamrznuti tečnim azotom i homogenizovani pastelom. Postupak je ponovljen par puta.

Homogenizovanim uzorcima dodato je po 700 µL 2% CTAB pufera, koji sadrži 2-merkaptioetanol u finalnoj koncentraciji 0,2%, i koristi se za resuspendovanje ćelijskog materijala. Smeša je inkubirana 60 min na 65 °C u vodenom kupatilu uz mešanje.

Nakon toga dodato je 600 µL hloroforma i dobro je izmešano, vorteksovanjem, sve dok je dolazilo do razdvajanja faza. Sledi centrifugiranje 15 min, na 13000 ob/min, na 4 °C, pri čemu dolazi do razdvajanje faza. Gornja, vodena faza, koja sadrži DNA prenetu je u novi ependorf u koji je prethodno dodato 300 µL ledenohladnog izopropanola. Ependorfi su inkubirani 30 min na -20 °C pri čemu dolazi do precipitacije DNA iz vodene faze. Nakon centrifugiranja koje traje 15 min, na 13000 ob/min, na 4 °C, supernatant (gornja faza) je odbačen, a zaostali talog je DNA.

U ependorf je dodato ~500 µL hladnog 70%-tnog etanola koji služi za ispiranje DNA molekula od zaostalih nečistoća i organskih rastvarača. Lagano je promućkano, invertovanjem, a onda centrifugirano 15 min, 13000 ob/min, 4 °C. Nakon centrifugiranja supernatant je pažljivo odliven. Ovaj postupak je ponovljen 2 puta. Kada je zaostali etanol ispario, dobijena DNA je resuspendovana dodatkom 50 µL TE pufera. Dobijena DNA se čuva u frižideru (4 °C) ili na -20 °C do upotrebe.

4.1.2.2 Umnožavanje *CaM* gena

Identifikacija izolata urađena je na osnovu *CaM* gena za čiju su amplifikaciju korišćeni CMD5/CMD6 prajmeri [256]. PCR reakciona smeša (25 µL) je sadržala 1 µL genomske DNA, 1 ×

PCR MasterMix (Thermo Fisher, Vilnius, Lithuania) i 0,4 $\mu\text{mol/L}$ svakog prajmera (Tabela 8). Parametri amplifikacije su kao što je prethodno opisano [256] i prikazani su u tabeli 9. Kao negativna kontrola korišćeni su uzorci bez DNA.

Tabela 8. Sastav PCR reakcione smeše

Br. uzoraka	1*	5	10	15	20	25
H ₂ O (μL)	10,5	52,5	105,0	157,5	210	262,5
Forward prajmer (20 pM)	0,5	2,5	5,0	7,5	10	12,5
Reverse prajmer (20 pM)	0,5	2,5	5,0	7,5	10	12,5
Master Mix (μL)	12,5	62,5	125,0	187,5	250	312,5
Ukupna V (μL) PCR reakcije	24	120	240	360	480	600

*Jedan uzorak koji ide na PCR sadrži 24 μL smeše koja je prikazana u tabeli i 1 μL DNA.

**Kada se pravi PCR smeša prvo se odmeri MiliQ voda, zatim Master Mix pa se na kraju dodaju prajmeri. Sve se pravi u negativnoj kontroli, gde se na kraju NE dodaje izolovana DNA

Tabela 9. PCR program korišćen za umnožavanje gena za kalmodulin (*CaM*)

1.	Inicijalna denaturacija	94 °C	5 min	34x
2.	Denaturacija	94 °C	45 sec	
3.	Annealing	55 °C	45 sec	
4.	Elongacija	72 °C	1 min	
5.	Fin. elongacija	72 °C	7min	

4.1.2.3 Vizuelizacija produkata PCR reakcije

PCR proizvodi su analizirani agaroznom elektroforezom. Korišćen je 1% agarozni gel. U 25 mL 1 x TBE (Tris-boradni EDTA pufer) pufera dodato je 0,25 g agaroze. Smeša je zagrevana do ključanja u mikrotalasnoj pećnici. Postupak zagrevanja je ponovljen do potpunog rastvaranja agaroze. Agarozna je izlivena u prethodno pripremljen kalup sa češljem. Nakon 20 min na sobnoj temperaturi češalj je izvađen i agarozni gel je uronjen u kadu za elektroforezu sa 1 x TBE puferom.

Uzorci umnoženih PCR proizvoda (4 μL) pomešani su sa 1 μL boje (6x Loading Dye, MBI Fermentas, Litvanija). Korišćeno je 5 μL DNA markeri (1 kb, Thermo Fisher) čiji su fragmenti veličine 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 750, 500 i 250 bp. Uslovi elektroforeze su bili: 100 V; 200 mA i 30 min. Nakon završene elektroforeze gel je bojen 0,1% rastvorom etidijum-bromida u toku 10 min. Trake na gelu su vizuelizovane UV transiluminatorom. Kao pozitivne reakcije detektovani su fragmenti veličine oko 600 bp u poređenju sa DNA markerima.

PCR produkti svih izolata poslani su na sekvenciranje. Direktnim sekvenciranjem u oba smera korišćenjem istih prajmera kao i za amplifikaciju dobijene su sekvencije, koje su sastavljene korišćenjem Pregap4 iz programskog paketa Staden [232] i upoređene sa sekvencijama drugih *Aspergillus* spp. koje su javno dostupne, korišćenjem MegaBlast algoritma (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

4.1.3 Razvijanje testa za brzu selekciju gljiva proizvođača inulinaznih enzima

Podloga za pretragu proizvođača inulinaza:

- | | |
|----------------------------------|--------|
| – Czapek-ov rastvor* | 25 mL |
| – 1% agar-agar | 0,30 g |
| – Ekstrakt jerusalimske artičoke | 5 mL |

*Czapek-ov rastvor:

- | | |
|--|--------|
| – NaNO ₃ | 2 g |
| – KH ₂ PO ₄ | 1 g |
| – MgSO ₄ | 0,5 g |
| – KCl | 0,5 g |
| – FeSO ₄ (FeCl ₃) | 0,01 g |
| – Voda do | 1 L |

0,5 mol/L natrijum acetatni pufer

- | | |
|---------------------|---------|
| – Sirćetna kiselina | 2,84 mL |
| – Voda do | 100 mL |

Rastvor pufera dotitrovati 1 M rastvorom NaCl do pH 5,0.

Gajenje gljiva i produkcija enzima urađena je u erlenmajerima, na čvrstom medijumu. Kao podloga za gajenje korišćen je modifikovani Czapek koji umesto saharoze sadrži ekstrakt jerusalimske artičoke bogat inulinom i agar-agar. Eksudat artičoke je pripremljen homogenizacijom krtola artičoke u blenderu pri čemu je dobijena tečnost obogaćena inulinom, dok su suvi ostaci odbačeni. Zasejan je po 1 mL prethodno pripremljenih spora. SSF fermentacija trajala je 33 h, na 28 °C, nakon čega je podloga usitnjena, a produkovani enzimi ekstrahovani 25 mM acetatnim puferom pH 5,0 (30 mL). Ekstrakcija je trajala 2 h uz mešanje na 150 ob/min na sobnoj temperaturi. Ekstrakti su centrifugirani 20 min na 4500 ob/min na 6 °C. Dobijeni uzorci su mikrofiltrirani kroz stakleni mikrofilter u cilju uklanjanja zaostalih ćelija i spora mikroorganizama i sačuvani na – 20 °C za određivanje enzimskih aktivnosti i dalja ispitivanja.

4.1.3.1 Pretraga sojeva na poliakrilamidnom gelu

Za difuzioni test korišćen je 6% poliakrilamidni gel, sa inkorporiranim supstratom (20 g/L inulin) (Tabela 10). Nakon polimerizacije gela izbušeni su bunari na odgovarajućoj udaljenosti (1 cm). U svaki bunar dodato je po 20 µL prethodno dobijenih ekstrakata, u tačno definisanim vremenskim intervalima (na svakih 5 sekundi). Reakcija se odvijala na 37 °C, 18 h u vlažnoj sredini. Nakon toga reakcija je prekinuta prelivanjem gela sa 100 mL 0,3 M rastvora NaOH tokom 30 sekundi. Dobijeni proizvodi hidrolize (redukujući šećeri) detektovani su prelivanjem gela sa 50 mL rastvora NBT-a u 0,3 M rastvoru NaOH (finalna koncentracija NBT je 1 mg/mL). Pozitivna reakcija dala je plavo ljubičasta obojenja.

Tabela 10. Sastav PAA gela korišćenog za pretragu sojeva

Rastvor poliakrilamida	9 mL
Supstrat inulin u 50 mM acetatnom puferu pH 5,0	36 mL
TEMED	10,8 µL
APS	135µL

4.1.3.1.1 Određivanje ukupne inulinazne aktivnosti nakon difuzionog testa

Fermentacionim tečnostima sojeva koji su dali pozitivan rezultat u difuzionom testu, određena je inulinazna aktivnost spektrofotometrijski, prema modifikovanoj proceduri koja podrazumeva upotrebu DNS reagensa [48,234].

- Potrebni rastvori:

Supstrat: 0,5% rastvor inulina

- inulin 0,15 g
- 50 mM natrijum-acetatni pufer pH 4,5 do 30 mL

U 0,15 g inulina doda se par kapi hladnog pufera. Ostatak pufera se zagreje do ključanja i prelije do mase 30 g. Ukoliko se inulin ne rastvori potrebno je da se zagreva do ključanja. Dobijeni rastvor treba da bude bistar i koristi se hladan.

DNS reagens

- Dinitrosalicilatni rastvor u NaOH
 - NaOH 8 g
 - DNSA 5 g
 - Destilovana voda do 100 mL
- Tartaratni rastvor
 - K-Na- tartarat 150 g
 - Destilovana voda do 250 mL

Pomešaju se rastvori A i B, a zatim se doda destilovana voda do 500 mL.

- Postupak:

Za reakciju se koristi 50 µL enzima i 450 µL supstrata i inkubira se 120 min na 37 °C. Reakcija se prekida dodatkom 500 µL DNS reagensa. Uzorci se zatim kuvaju 5 min na 100 °C i razblaže sa 4 mL vode. Slepna proba je istog sastava samo što se rastvori dodaju drugim redosledom: enzim, DNS reagens, supstrat.

Za odmerenu vrednost apsorpcije A_{540} sa standardne prave očita se ili izračuna koncentracija redukujućih šećera, na osnovu koje se računa inulinazna aktivnost (U/mL). Jedna jedinica inulinazne aktivnosti se definiše kao količina enzima koja je potrebna da hidrolizuje 1 µmol inulina po minuti pri gore navedenim uslovima.

$$C_{enz} \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{C_{redukujućih\ šećera} (mM) \times V_{reakcione\ smeše} (mL)}{t (min) \times V_{enzima} (mL)} \times R \quad (1)$$

C_{enz} – enzimsko aktivnost u U/mL

$C_{red.šeć.}$ – koncentracija redukujućih šećera

V_{rs} – zapremina reakcione smeše

t – vreme trajanja reakcije

V_e – zapremina enzimskog ekstrakta

R – razblaženje enzimskog ekstrakta

4.2 Ispitivanje produkcije mikotoksina

4.2.1 Produkcija enzima i mikotoksina

Svi izolati *A. welwitschiae* su gajeni na SSF-u (fermentacija u čvrstom stanju) gde je kao podloga korišćeno lomljeno zrno tritikalea, na 28 °C i relativnoj vlažnosti (RH) 60% tokom 96 h. Nakon 96 h gajenja podloge su bile prekrivene belim micelijumom i nije došlo do sporulacije.

Uzorci korišćeni za analizu mikotoksina dobijeni su ekstrakcijom sa 100 mL 25 mM acetatnog pufera pH 4,5 i mešanjem 2 sata na 150 ob/min, nakon čega su centrifugirane 20 min na 4500 ob/min na 6 °C i mikrofiltrane kroz stakleni mikrofilter.

4.2.1.1 Priprema podloge za umnožavanje spora

PDA podloga (krompir dekstrozni agar)

- Komercijalna podloga 42 g
- Destilovana voda do 1L

SA podloga (sladni agar)

- Komercijalna podloga 50 g
- Destilovana voda do 1 L

Podloga je rastvorena u destilovanoj vodi, autoklavirana, a nakon čega je u sterilnim uslovima razlivena u Petrijeve šolje.

4.2.1.2 Zasejavanje spora na mikrobiološkim podlogama

Sa kosog agra na kome se nalaze potrebni sojevi, ezom su prenete spore i zasejane na PDA i SA podloge metodom „išarane ploče“ u sterilnim uslovima.

Na poklopcu svake Petrijeve šolje obeležen je soj, datum sejanja i vrsta podloge. Zasejane podloge su inkubirane u termostatu na 28 °C 6-7 dana. Sojevi koji su rasli na PDA podlozi su brže i više sporulisali od sojeva raslih na sladnom agru.

4.2.1.3 Produkciona fermentacija

- Potrebni rastvori:
0,1% rastvor Tween 80

- Tween 80 0,1 g
- Voda do 100 mL

Sporama poraslim na Petri šolji dodato je 5 mL 0,1% rastvora Tween 80 u vodi.

Nakon što su se spore delimično hidratizale, ezom su skinute sa micelijuma. Dobijena suspenzija je proceđena kroz sloj vate i određena je OD (od *eng.* optical density) merenjem A_{605} . Opseg apsorbancije adekvatan za izvođenje eksperimenta i za sejanje na SSF-u je 0,970 – 1,030.

Pre postavljanja SSF-a zrno tritikala podleže autodigestiji koja traje 3 sata na 60 °C. Tokom autodigestije amilaza tritikala delimično razgrađuje skrob i produkuje šećere koje će kasnije gljive koristiti kao izvor energije i hrane. Pored toga ovaj proces je i jedan način pasterizacija zrna.

Postavljeni SSF trajao je 96 h na 28 °C, pri čemu je relativna vlažnost (RH) iznosila 60%. Prethodno dobijena suspenzija spora zasejana je u 12 velikih aluminijumskih posuda (zapremine 900 mL) na podlozi koja se sastojala od 160 g tritikala i 100 mL sterilne vode. U ovim posudama je nakon autodigestije zasejano po 30 mL spora gljiva čiji je OD na A_{605} oko 1. SSF je takođe postavljen i u 8 malih aluminijumskih posuda (zapremine 500 mL) pri čemu je podloga sadržala 100 g tritikala i 62,5 mL sterilne vode, a nakon autodigestije je zasejano po 18,75 mL spora.

4.2.1.4 Ekstrakcija enzimskih kompleksa i mikotoksina iz podloge

Nakon fermentacije koja je trajala 96 h nije došlo do sporulacije. Za ekstrakciju je korišćen 20 mM acetatni pufer pH 5,0. Velikim posudama, koje su sadržale 160 g tritikala i 100 mL sterilne vode, dodato je po 320 mL pufera prilikom ekstrakcije i dobijeno je skoro isto toliko fermentacione tečnosti. SSF-u postavljenom u malim aluminijumskim posudama, koje su sadržale 100 g tritikala i 62,5 mL sterilne vode, dodato je po 200 mL pufera i takođe dobijeno je skoro isto toliko fermentacione tečnosti.

Podloga je usitnjena štapnim mikserom i ekstrakcija je trajala 3 h uz mešanje na sobnoj temperaturi. Ekstrakt je centrifugiran 20 min na 4500 ob/min na 6 °C.

Dobijene fermentacione tečnosti su mikrofiltrirane staklenim mikrofilterom u cilju uklanjanja zaostalih ćelija i spora mikroorganizma i sačuvane za određivanje enzimske aktivnosti i dalja ispitivanja.

U dobijenim ekstraktima je određivana ukupna inulinazna aktivnost i koncentracija mikotoksina, koja je urađena po standardnim metodama u saradnji sa Poljoprivrednim fakultetom, Univerziteta u Beogradu.

4.2.1.5 Određivanje koncentracije proteina Bradford-ovom metodom

- Potrebni rastvori:
 - Koncentrovani rastvor boje:
 - CBB G-250 (Coomassie brilliant blue G-250) 100 mg
 - 95 % etanol 50 mL
 - H₃PO₄ 100 mL
 - Voda do 200 mL

Boja je rastvorena u etanolu nakon čega je dodata kiselina i voda do finalne zapremine i označen kao koncentrovani rastvor boje.

- Bradford-ov reagens – radni rastvor boje
- Koncentrovani rastvor boje 100 mL
- Voda do 500 mL

Kao standard za određivanje koncentracije proteina korišćen je goveđi serum albumin (BSA od *eng.* bovine serum albumin). Koncentrovani rastvor BSA, 1 mg/mL, je razblažen u opsegu 0,1 do 1,0 mg/mL kao što je prikazano u tabeli 11. Najkoncentrovaniji rastvor (1 mg/mL) predstavlja granicu linearnosti.

Tabela 11. Standardna kriva za rastvor BSA

	BSA (1 mg/mL)	H ₂ O (μL)	Finalna koncentracija (mg/mL)
1.	10	90	0,1
2.	20	80	0,2
3.	40	60	0,4
4.	60	40	0,6
5.	80	20	0,8
6.	100	-	1,0
7.	-	100	-

- Postupak:

Uzorku (100 μL) dodato je 5 mL razblaženog rastvora boje. Reakciona smeša je vorteksovana i nakon 20 minuta merena je apsorbancija na 595 nm. Kao slepa proba korišćena je voda. Za odmerenu vrednost apsorbancije A₅₉₅ sa standardne prave se očitava ili izračuna koncentracija proteina koja se izražava u mg/mL.

4.2.1.6 Određivanje ukupne inulinazne aktivnosti

Ukupna inulinazna aktivnost urađena je po protokolu opisanom u poglavlju 4.1.3.1.1, uz modifikaciju vremena reakcije - 60 min i temperature - 50 °C.

4.2.2 Analiza mikotoksina na genskom nivou

4.2.2.1 Umnožavanje gena za fumonizin (*fum*)

Prajmeri korišćeni za umnožavanje *fum* gena prikazani su u tabeli 12, gde je takođe prikazano i koji prajmer je zadužen na umnožavanje kog gena. Sastav PCR reakcije dat je u tabeli 13, a uslovi reakcije prikazani su u tabeli 14. Za ovaj eksperiment korišćeni su prajmeri i uslovi dati u radu Susca et al. [64].

Tabela 12. Prajmeri korišćeni za umnožavanje *fum* gena

	Oznaka u radu	Naša oznaka	Gen	Veličina amplikona (bp)
1.	Fum10-756 f	Fum10 f	<i>Fum10</i>	651
	Fum10-1406	Fum10 r		
2.	Fum7-600 f	Fum7 f	<i>Fum7</i>	681
	Fum7-1280 r	Fum7 r		
3.	Fum1-4583 f	Fum1 f	<i>Fum1</i>	701
	Fum1- 5283 r	Fum1 r		
4.	Fum15-299f	Fum 15-1 f	<i>Fum15</i>	701
	Fum15-999 r	Fum 15-1 r		
5.	Fum15-14-1395 f	Fum 15-2 f	<i>Fum21 I</i>	703
	Fum15-14-2097 r	Fum 15-2 r		
6.	Fum15-14-2997 f	Fum 15-3 f	<i>Fum21 II</i>	705
	Fum15-14-3701r	Fum 15-3 r		

Tabela 13. Sastav PCR smeše korišćene za umnožavanje *fum* gena

	Komponente	Po 1 uzorku
1.	H ₂ O	10,5 µL
2.	Master mix	12,5 µL
3.	Forward prajmer (20 pM)	0,5 µL
4.	Reverse prajmer (20 pM)	0,5 µL
5.	DNA	1 µL

Tabela 14. PCR program korišćen za umnožavanje gena za fumonizin (*fum*)

1.	Inicijalna denaturacija	94 °C	2 min	35x
2.	Denaturacija	94 °C	50 sec	
3.	Annealing	59 °C	30 sec	
4.	Elongacija	72 °C	50 sec	
5.	Fin. elongacija	72 °C	5 min	

4.2.2.2 Umnožavanje gena za ohratoksin (*ota*)

Prajmeri korišćeni za umnožavanje *ota* gena prikazani su u tabeli 15, gde je takođe prikazano i koji prajmer je zadužen na umnožavanje kog gena. Sastav PCR reakcije dat je u tabeli 16, a uslovi reakcije prikazani su u tabeli 17. Za ovaj eksperiment korišćeni su prajmeri i uslovi dati u radu Susca et al. [63].

Tabela 15. Prajmeri korišćeni za umnožavanje *ota* gena

	Oznaka	Veličina amplikona (bp)
1.	Ota1 f	776
	Ota1 r	
2.	Ota2 f	644
	Ota2 r	
3.	Ota3 f	613
	Ota3 r	
4.	Ota5 f	845
	Ota5 r	

Tabela 16. Sastav PCR smeše korišćene za umnožavanje *ota* gena

	Komponente	Po 1 uzorku
1.	H ₂ O	10,5 µL
2.	Master mix	12,5 µL
3.	Forward prajmer (20 pM)	0,5 µL
4.	Reverse prajmer (20 pM)	0,5 µL
5.	DNA	1 µL

Tabela 17. PCR program korišćen za umnožavanje gena za ohratoksin (*ota*)

1.	Inicijalna denaturacija	95 °C	2 min	35 x
2.	Denaturacija	94 °C	30 sec	
3.	Annealing	60 °C	30 sec	
4.	Elongacija	72 °C	1 min	
5.	Fin. elongacija	72 °C	5 min	

4.3 Produkcija enzima odabranim sojem *A. welwitchiae* FAW1

Produkcione fermentacije su postavljene kao SSF na 28 °C i RH 60% tokom 96 h. Sastav podloga koji je korišćen je dat u Tabeli 18. U sterilnim uslovima se površinski zaseje po 30 mL, odnosno po 18,75 mL rastvora spora na pripremljenu autodigestovanu čvrstu podlogu. Aluminijska posuda se zatvara sterilnim aluminijskim poklopcem. Svaki od sojeva se zasejava na ukupno 2 podloge u duplikatu. Obeleži se svaka od posuda zatim se stavljaju u termostat gde se odvija fermentacija na 28 °C.

Tabela 18. Sastav podloga korišćenih u SSF-u za gajenje *A. welwitschiae* FAW1 i produkciju enzima inulinaznog kompleksa

Oznaka	Sastav podloge
A	- 100% homogenizovana jerusalimska artičoka - Voda dodata do 50% relativne vlažnosti supstrata
AWP	- 94,5% homogenizovana jerusalimska artičoka - 5% pšenične mekinje - 0,5% pepton - Voda dodata do 50% relativne vlažnosti supstrata
AWP+	- 92,6% homogenizovana jerusalimska artičoka - 5% pšenične mekinje - 2,4 % pepton - Voda dodata do 50% relativne vlažnosti supstrata
AT	- 100% lomljeno zrno tritikalea (veličina čestica 30% 1 mm, 28% 2–3 mm, 18% 4 mm, 24% 5–6 mm) - Sok jerusalimske artičoke (dobijen homogenizacijom i presovanjem) dodat do 50% relativne vlažnosti supstrata
T	- 100% lomljeno zrno tritikalea (veličina čestica 30% 1 mm, 28% 2–3 mm, 18% 4 mm, 24% 5–6 mm) - Voda dodata do 50% relativne vlažnosti supstrata

4.3.1 Određivanje enzimskih aktivnosti

4.3.1.1 Ekstrakcija enzima iz podloge

Ekstrakcija enzima opisana je u poglavlju 4.2.1.5.

4.3.1.2 Određivanje β -fruktofuranozidazne (invertazne) aktivnosti

- Potrebni rastvori:

Supstrat: 10 % rastvor saharoze

- saharoza 5,13 g
- natrijum acetatni pufer pH 4.5, 50 mM do 50 mL

- Postupak:

Za reakciju se koristi 50 μ L enzima i 450 μ L supstrata i inkubira se 30 min na 37°C. Reakcija se prekida dodatkom 500 μ L DNS reagensa. Uzorci se zatim kuvaju 5 min na 100 °C i razblaže sa 4 mL vode. Slepa proba je istog sastava samo što se rastvori dodaju drugim redosledom: enzim, DNS, supstrat.

Za odmerenu vrednost apsorbancije A_{540} sa standardne prave očita se ili izračuna koncentracija redukujućih šećera, na osnovu koje se računa invertazna aktivnost (U/mL), prema jednačini (1) datoj u poglavlju 4.1.3.1.1. Jedna jedinica invertazne aktivnosti se definiše kao količina enzima koja je potrebna da hidrolizuje 1 μ mol saharoze po minuti pri gore navedenim uslovima.

4.3.1.3 Određivanje egzoinulinazne aktivnosti

- Potrebni rastvori:

Supstrat: rastvor inulooligosaharida (10 mg/mL)

- inulooligosaharidi 100 mg
- natrijum acetatni pufer pH 4,5, 50 mM do 10 mL

- Postupak:

Za reakciju se koristi 50 µL enzima i 450 µL supstrata i inkubira se 2 h na 37 °C, uz mešanje 450 ob/min. Reakcija se prekida dodatkom 500 µL DNS reagensa. Uzorci se zatim kuvaju 5 min na 100 °C i razblaže sa 4 mL vode. Slepa proba je istog sastava samo što se rastvori dodaju drugim redosledom: enzim, DNS reagens, supstrat.

Za odmerenu vrednost apsorbancije A_{540} se sa standardne prave očitava ili izračuna koncentracija redukujućih šećera, na osnovu koje se računa egzoinulinazna aktivnost (U/mL), prema jednačini (1) datoj u poglavlju 4.1.3.1.1. Jedna jedinica egzoinulinazne aktivnosti se definiše kao količina enzima koja je potrebna da hidrolizuje 1 µmol inulooligosaharida po minuti pri gore navedenim uslovima.

4.3.1.4 Određivanje endoinulinazne aktivnosti Azofruktanom

Endoinulinazna aktivnost određena je prema protokolu Megazyme [257].

- Potrebni rastvori:

- 100 mM acetatni pufer pH 4,5 + 0.5 M KCl

- Supstrat: 2% (m/V) rastvor azofruktana

- Azofruktan 0,02 g

- 100 mM acetatni pufer pH 4,5 + 0,5 M KCl 1 mL

- Stop reagens:

- 2 M KOH 10 mL

- 96% etanol 100 mL

- Postupak:

Reakciona smeša koja sadrži 100 µL enzima i 500 µL rastvora supstrata (azofruktana) se inkubira 15 min na 40 °C. Nakon toga se ohladi (u ledenom kupatilu ili hladnoj vodi) i odmah doda 2,5 mL stop reagensa. Vorteksuje se i ostavi 5 min na sobnoj temperaturi. Zatim se centrifugira 1 min na 14000 ob/min i supernatantu izmeri apsorbancija na 590 nm. Kao slepa proba koristi se destilovana voda.

Jedna jedinica (U) endoinulinazne aktivnosti definiše se kao količina enzima koja je potrebna da oslobodi 1 µmol fruktoze u minutu, hidrolizujući inulin (koncentracije 10 mg/mL) na pH 4,5 i na temperaturi od 40 °C. Ukoliko je uzorak enzima smeša egzo- i endoinulinaze za računanje mU koristi se jednačina 2, u suprotnom jednačina 3.

$$mU = 15,1 + 496,8 \times Abs + 211 \times Abs^2 \quad (2)$$

$$mU = 19,52 + 1416 \times Abs + 1877 \times Abs^2 \quad (3)$$

Dobijene vrednosti za mU koriste se za računanje U/mL prema sledećoj jednačini:

$$\frac{U}{mL} = mU \times 10 \times \frac{1}{1000} \times R \quad (4)$$

Abs – vrednost apsorbancije na 590 nm

mU – miliU po 0,1 mL reakcione smeše

10 = preračunavanje od 0.1 mL (koliko je korišćeno enzima u reakciji) do 1.0 mL enzima.

1/1000 = prevođenje mU u U

R = ukupno razblaženje enzima.

4.3.2 Zimogramska detekcija enzima inulinaznog kompleksa

Zimogramska detekcija enzima inulinaznog kompleksa urađena je nakon native elektroforeze na poliakrilamidnom gelu (bez SDS-a i 2-merkaptetanola). Nakon elektroforeze proteini su simultano transferovani na PVDF membranu i na agar-agar gel sa inkorporiranim inulinom. PVDF membrana je postavljena sa gornje strane gela, a substratni gel sa donje strane PAA gela. Na vrhu napravljenog sendviča stavljen je filter papir i teg od 500 g. Transfer je trajao 30 min.

4.3.2.1 Zimogramska detekcija endoinulinaze

Za detekciju endoinulinaze korišćen je agar-agar gel (1,5%) sa inkorporiranim inulinom (finalna koncentracija inulina u gelu bila je 1%). Nakon transfera gel je inkubiran 30 min na 40 °C u vlažnim uslovima. Gel je bojen rastvorom joda (22 g/L KI, 11 g/L I₂) 3-5 min, a zatim ispran 2 puta destilovanom vodom. Rezultat je bio gel narandžasto-braon boje sa zonama prosvetljenja na mestima gde je inulin hidrolizovan.

4.3.2.2 Zimogramska detekcija β-fruktofuranozidaze (invertaze)

Za detekciju β-fruktofuranozidaze korišćena je PVDF membrana. Nakon transfera proteina sa nativnog PAA gela, PVDF membrana je inkubirana u 1% rastvoru saharoze rastvorenog u 50 mM natrijum acetatnom puferu pH 4,5, na 37 °C 45 min. Reakcija je prekinuta dodatkom 100 mL 0,3 M rastvora NaOH, a redukujući šećeri nastali enzimskom aktivnošću detektovani su rastvorom NBT-a rastvorenog u 0,3 M NaOH do finalne koncentracije 1 mg/mL. Nerastvorni kompleks koji je nastao između NBT-a i redukujućih šećera je plavo ljubičaste boje.

4.3.2.3 Zimogramska detekcija egzoinulinaze

PAA gel nakon native elektroforeze i nakon završenog transfera korišćen je za detekciju egzoinulinazne aktivnosti. PAA gel je inkubiran u 1% rastvoru inuloooligosaharida rastvorenog u 50 mM natrijum acetatnom puferu pH 4,5, na 37 °C 30 min. Reakcija je prekinuta prelivanjem gela sa 100 mL 0,3 M rastvora NaOH, a redukujući šećeri nastali enzimskom aktivnošću detektovani rastvorom NBT-a rastvorenog u 0,3 M NaOH do finalne koncentracije 1 mg/mL. Reakcija je inkubirana 2-3 min na 100 °C nakon čega nastaje nerastvorni kompleks između NBT-a i redukujućih šećera plavo ljubičaste boje.

4.4 Upotreba dobijenih enzimskih kompleksa za sintezu fruktooligosaharida

4.4.1 Produkcija fruktooligosaharida sintezom iz saharoze

- Potrebni rastvori:

Supstrat: 60% rastvor saharoze

- saharoza 60 g
- natrijum acetatni pufer pH 6,0 50 mM do 100 mL

- Postupak:

Za reakciju se koristi 25 µL enzima, doda se 250 µL supstrata, inkubira se 24 h na 60 °C, uz konstantno mešanje od 450 ob/min. Reakcija se prekida kuvanjem uzoraka 3 min na 100 °C. Uzorci se razblaže 60 puta, a dobijeni proizvodi, fruktooligosaharidi, analiziraju se TLC-om i/ili HPLC-om (postupak opisan u poglavlju 4.4.4).

4.4.2 Produkcija fruktooligosaharida hidrolizom inulina

- Potrebni rastvori:

Supstrat: 5% rastvor inulina

- inulin 5 g
- natrijum acetatni pufer pH 6,0 50 mM do 100 mL

- Postupak:

Za reakciju se koristi 25 μ L enzima, doda se 250 μ L supstrata, inkubira se 2 h na 45 °C, uz konstantno mešanje od 450 ob/min. Reakcija se prekida kuvanjem uzoraka 3 min na 100 °C. Uzorci se razblaže 5 puta, a dobijeni proizvodi, fruktooligosaharidi, analiziraju se TLC-om i/ili HPLC-om (postupak opisan u poglavlju 4.4.4).

4.4.3 Optimizacija reakcije sinteze fruktooligosaharida

Za optimizaciju uslova produkcije FOS-ova varirano je nekoliko parametara pri čemu je ispitivan samo po jedan parametar dok su ostali bili konstanti (Tabela 19).

Tabela 19. Parametri varirani tokom optimizacije produkcije FOS-ova

	pH	Temperatura (°C)	Koncentracija supstrata (%)	Vreme trajanja reakcije (h)	Razblaženje enzima korišćeno u reakcionoj smeši
1.	4.0	60	60	24	Nerazblaženi enzim
	6.0				
	7.0				
2.	6.0	40	60	24	Nerazblaženi enzim
		50			
		60			
3.	6.0	60	10	24	Nerazblaženi enzim
			30		
			60		
4.	6.0	60	60	2	Nerazblaženi enzim
				18	
				24	
5.	6.0	60	60	24	1:10
					1:1
					Nerazblaženi enzim

Korišćeni supstrat (saharoza) pripremljena je u različitim koncentracijama (10, 30, 60%) u puferima odgovarajućih pH (50 mM natrijum-acetatni puferi pH 4,0 i pH 6,0 i 50 mM Tris-HCl pH 7,0). Ukupna zapremina reakcione smeše bila je 0,275 mL i sadržala je 0,25 mL supstrata i 0,025 mL enzima. Reakcija se odvijala na različitim temperaturama (40, 50, 60 °C), pri konstantnom mešanju od 450 ob/min. Sve reakcije prekinute su nakon određenog vremena (2, 18, 24 h) kuvanjem 3 min na 100 °C, a dobijeni fruktooligosaharidi analizirani su TLC-om po postupku opisanom u poglavlju 4.4.4.1.

4.4.4 Kvalitativna i kvantitativna analiza sintetisanih fruktooligosaharida

4.4.4.1 Tankoslojna hromatografija

Potrebni rastvori:

- Mobilna faza

Mobilnu fazu čine n-butanol/etanol/voda/sirćetna kiselina (5:3:2:0,5; V/V/V/V).

- Rastvor standarda

Smeša standardnih šećera sastoji se od fruktoze, saharoze, kestoze, nistoze. Koncentracija svakog šećera u smeši je 1 mg/mL.

- Rastvor za vizuelizaciju

Rastvor α -naftola

- | | |
|--------------------|-------|
| - α -naftol | 0,5 g |
| - Etanol (96%) | 95 mL |
| - H_2SO_4 | 5 mL |

α -naftol se rastvori u 80 mL etanola, zatim se doda 5 mL H_2SO_4 i dopuni etanolom do 100 mL.

Za TLC analizu korišćene su ploče dimenzije 4,5 cm $\times$ 6 cm (Silica gel 60 F₂₅₄, Merck, Darmstadt, Germany). Nanošeno je po 1 μ L uzorka i standardnih šećera. Rađeno je na sobnoj temperaturi (22 $\pm$ 2 °C). Za vizualizaciju dobijenih šećera korišćen je rastvor α -naftola praćen grejanjem ploča 5 min na 150 °C.

4.4.4.2 Kvantifikacija fruktooligosaharida HPLC metodom

4.4.4.2.1 Priprema standarda

Standardni rastvori određenih mono- i disaharida (glukoza, fruktoza i saharoza) pripremljeni su u koncentraciji od 20 mg/mL u 60% rastvoru acetonitrila; dok je koncentracija rastvora kestoze i nistoze u 60% acetonitrilu bila 5 mg/mL. Sveži rastvori standarda pripremani su svakog dana i čuvani na 4 °C pre analize.

4.4.4.2.2 Priprema fruktooligosaharida

Fruktooligosaharidi sintetizovani su korišćenjem inulinaznog kompleksa i rastvora saharoze (600 g/L) ili inulina (50 g/L) pri uslovima opisanim u poglavljima 4.4.1 i 4.4.2, redom. Dobijeni uzorci razblaženi su u 60% rastvoru acetonitrila (finalna koncentracija) i centrifugirani 2 min na 14000 ob/min u cilju uklanjanja ometajućih komponenti. Dobijeni supernatanti su profiltrirani kroz 0,22 μ m PTFE filter pre analize.

4.4.4.2.3 HPLC analiza

Analiza sintetisanih oligosaharida urađena je tačnom hromatografijom pod visokim pritiskom HPLC (od. *eng.* high-performance liquid chromatography) na Ultimate 3000 Thermo Scientific sistemu sa autosamplernom, korišćenjem RI detektora (od *eng.* refractive index detector) (RefractoMax 520). Hromatografsko razdvajanje urađeno je na koloni Shodex Asahipak NH2P-50 4E kolona (4,6 x 250 mm) sa predkolonom Shodex Asahipak NH2P-50G 4A (4,6 x 10 mm). Zapremina injektovanog uzorka iznosila je 10 μ L za standarde i 20 μ L za ispitivanu smešu oligosaharida. Kolona je ekvilibrisana na 35 °C i ista temperatura je održavana tokom čitavog rada. Mobilna faza sastojala se od acetonitrila (ACN) i vode (60:40 (V/V)). Razdvajanje i detekcija FOS-ova trajala je 40 min. Fruktooligosaharidi su eluirani izokratski sa protokom od 0,5 mL/min. Prikupljeni podaci analizirani su u programu Chromeleon 7.2.

4.4.5 *In situ* produkcija fruktooligosaharida

Nakon fermentacije u dobijenim ekstrakcionim tečnostima ispitano je prisustvo fruktooligosaharida TLC analizom. Postupak opisan u poglavlju 4.4.4.1.

4.4.6 Antioksidativni kapacitet fruktooligosaharida

4.4.6.1 ABTS metoda

- Potrebni rastvori:
 - 7 mmol/L ABTS
 - ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) 27 mg
 - 25 mM natrijum acetatni pufer pH 5,5 7,5 mL
 - 2,54 mmol/L APS
 - APS (amonijum-persulfat) 4,3 mg
 - 25 mM natrijum acetatni pufer pH 5,5 7,5 mL
 - 25 mM natrijum acetatni pufer pH 5,5
 - 0,5 M natrijum acetatni pufer 1,5 mL
 - Voda 28,5 mL
 - 800 µmol/L rastvor askorbinske kiseline
 - Askorbinska kiselina 7 mg
 - Voda 5 mL

Dobijeni rastvor askorbinske kiseline se koristi za konstruisanje standardne prave sledećih koncentracija: 200 µM; 150 µM; 100 µM; 75 µM; 50 µM; 25 µM; 12,5 µM.

ABTS^{•+} radikali se pripremaju dan ranije mešanjem 7 mM ABTS sa 2,54 mM amonijum-persulfatom ((NH₃)₂S₂O₈) u odnosu 1:1 (V/V). Rastvor se inkubira preko noći u mraku jer je potrebno 12-16 h da nastanu radikali koji mogu biti stabilni i do 2 dana u mraku. Dobijeni radikali se razblažuju dejonizovanom vodom do A₇₃₄ ~ 0,990.

- Postupak:

Uzorku (100 µL) se doda 900 µL razblaženog rastvora radikala ABTS^{•+}. Reakcija traje 15 min u mraku i nakon čega se meri apsorbancija na 734 nm. Kao standard korišćen je rastvor askorbinske kiseline. Ukupna antioksidativna aktivnost izražava se u µmol/L askorbinske kiseline ekvivalent.

4.4.6.2 ORAC metoda

- Potrebni rastvori:
 - 75 mmol/L natrijum fosfatni pufer pH 7,4
 - Na₂HPO₄ 805 mg
 - NaH₂PO₄ 255 mg
 - Voda 90 mL
- Rastvor dotitrovati do pH 7,4.
- 153 mmol/L rastvor AAPH
 - AAPH (2,2'-azobis (2-metilpropionamidin) dihidrohlorid) 415 mg
 - 75 mmol/L natrijum fosfatni pufer pH 7,4 10 mL
 - 4 nmol/L rastvor fluoresceina
 - 4 mM rastvor fluoresceina
 - Fluorescein 13,2 mg
 - 75 mmol/L natrijum fosfatni pufer pH 7,4 10 mL

Napraviti serijsko razblaženje rastvora fluoresceina (4 mM razblažiti do 4 μ M, zatim 4 μ M do 4 nM. Ukupno razblažiti 1 000 000 x početni rastvor fluoresceina)

- 10 mmol/L rastvor Trolox-a

- Trolox 2,5 mg
- Voda 1 mL

Dobijeni rastvor Trolox-a se koristi za konstruisanje standardne prave sledećih koncentracija: 100 μ M; 50 μ M; 25 μ M; 12,5 μ M; 6,25 μ M.

• Postupak:

Reakcija se odvija u mikrotitar ploči sa 96 bunara i automatskim čitačem ploča (Appliscan, ThermoScientific). Reakcione smeše se sastoje od uzorka, slepe probe ili standardnog rastvora Trolox-a (25 μ L) i 4 nmol/L rastvora fluoresceina (150 μ L). Smeša se inkubira 30 min na 37 °C pre dodatka peroksil radikala generisanog korišćenjem 25 μ L 153 mmol/L rastvora AAPH, koji se priprema svež za svaku reakciju.

Fluorescencija se meri korišćenjem filtera za ekscitaciju i emisiju na talasnim dužinama 485 nm i 535 nm respektivno, na svakih 60 s tokom 90 min. Svi uzorci se rade u triplicatu. Rezultati su dobijeni korišćenjem ScanIt RE 2.3 softvera. Antioksidativna aktivnost izražava se kao mmol/L Trolox ekvivalent.

4.5 Produkcija, prečišćavanje i karakterizacija fruktoziltransferaze iz *Aspergillus welwitschiae* FAW1

Produkcija enzima inulinaznog kompleksa opisana je u poglavlju 4.2.1. Nakon ekstrakcije dobijeno je 3 L ekstrakcione tečnosti koja je korišćena za prečišćavanje.

4.5.1 Prečišćavanje fruktoziltransferaze iz *Aspergillus welwitschiae* FAW1

4.5.1.1 Dijaliza ekstrakta

Pre postavljanja dijalize ekstraktu je podešen pH na 6,0 titrovanjem 1 M rastvorom NaOH. Koduktivitet uzorka (κ) iznosio je 4,75 mS/cm.

Dijaliza je rađena prvo naspram česmenske vode, a zatim naspram dejonizovane. Nakon toga konduktivitet uzorka iznosio 948 μ S/cm i dotitrovan na 1078 μ S/cm 50 mM acetatnim puferom pH 6,0. Ukupna zapremina uzorka dobijena nakon dijalize iznosila je 4,05 L. Ukupna inulinazna aktivnost koja je iznosila 6,44 U/mL, određena je po protokolu opisanom u poglavlju 4.2.1.7. Koncentracija proteina određena je po Bradford-ovoj metodi (opisanoj u poglavlju 4.2.1.6), a dobijena vrednost bila 0,246 mg/mL.

4.5.1.2 Jonoizmenjivačka hromatografija

Za razdvajanje enzima inulinaznog kompleksa korišćena je jonoizmenjivačka hromatografija na QAE Sephadex matriksu. Zapremina kolone iznosila je 435 mL. Za ekvibraciju kolone korišćen je 20 mM natrijum-acetatni pufer pH 6,0. Konduktivitet i pH kolone i uzorka bili su 1546 μ S/cm i 6,25 odnosno 1078 μ S/cm i 6,55, redom. Na kolonu je nanešeno 2,8 L uzorka. Nevezani proteini eluirani su startnim puferom, 20 mM acetatnim puferom pH 6,0 i sakupljane su frakcije od 500 mL. Desorpcija enzima rađena je step elucijom promenom jonske sile, pri čemu je korišćeno po 150 mL svakog rastvora sledećeg molariteta (0,1 M, 0,15 M, 0,2 M, 0,25 M, 0,3 M, 0,5 M rastvor NaCl u 20 mM acetatnom puferu pH 6,0). Sakupljeno je ukupno 24 frakcija od po 50 mL.

Frakcijama je zatim određena inulinazna, invertazna, endoinulinazna i fruktoziltransferazna aktivnost, kao što je opisano u poglavljima 4.3.1 i 4.4.1.

4.5.1.3 Poliakrilamidna elektroforeza

Potrebni rastvori:

- Monomerni rastvor akrilamida (AA)

Akrilamid	58,4 g
Bisakrilamid	1,6 g
Destilovane vode do	200 mL

- Pufer za razdvajajući gel (1,5 M Tris HCl pH 8,8)

Tris	36,30 g
Destilovana voda do	200 mL
4 M HCl do	pH 8,8

- Pufer za koncentrujući gel (0,5 M Tris HCl pH 6,8)

Tris	6,0 g
Destilovana voda do	100 mL
4 M HCl do	pH 6,8

- Rastvor detergenta (natrijum-dodecilsulfat - SDS) 10% m/V

SDS	10,0 g
voda do	100 mL

- Inicijator amonijum persulfat (APS) 10% m/V

APS	0,2 g
Destilovana voda do	2 mL

- Rastvor za nadslojavanje (n-butanol ili 2-butanol zasićen vodom)

n-butanol ili 2-butanol	100 mL
Destilovana voda do	stabilnog donjeg sloja vode

- Pufer za obradu uzoraka (PUZ)

Konačni sastav pufera	Rastvori za PUZ	1 x PUZ	2 x PUZ	3 x PUZ
0,0625 M	0,5 M Tris-HCl pH 6,8	3,12 mL	6,25 mL	9,38 mL
10% glicerol	99% glicerol Ili 85% glicerol	2,5 mL (3,0 mL)	5,0 mL (6,0 mL)	7,5 mL (9,0 mL)
2% SDS	Čvrsti ili 10% rastvor SDS	0,5 g ili 5 mL	1 g ili 10 mL	1,5 g
0,002% BFP	0,1% rastvor brom fenol plavo	0,5 mL	1,0 mL	1,5 mL
-	Voda do	23,75 mL	22,5 mL	21,25 mL
5% 2-ME	Komercijalni 2-ME	1,25 mL	2,5 mL	3,750 mL

- Pufer za elektroforezu (0,025 M Tris, 0,192 M Gly, 0,1% SDS, pH 8,3)

Tris	3,0 g
Glicin	14,4 g
10% SDS	10,0 mL
Destilovana voda do	1,0 L

- Rastvor za fiksiranje, bojenje i obezbojavanje (50% metanol, 10% sirćetna kiselina)

Metanol	500 mL
Sirćetna kiselina	100 mL
Voda	do 1,0 L

- Rastvor boje (0,1% CBB, 50% metanol, 10% sirćetna kiselina)

CBB R-250	0,5 g
rastvor 9 do	500 mL

- Rastvor za obezbojavanje (5% metanol, 7% sirćetna kiselina)

Metanol	50 mL
Sirćetna kiselina	70 mL
Voda do	1,0 L

- Gel za razdvajanje (10%)

Akrilamid	4,0 mL
Destilovana voda	4,8 mL
Tris pufer pH 8,8	3 mL
(dezaeracija u trajanju od 10 min)	
Temed	4,8 µL
10%-tni APS	60 µL

- Gel za koncentrovanje

Akrilamid	0,4 mL
Destilovana voda	1,8 mL
Tris pufer pH 6,8	0,75 mL
(dezaeracija rastvora u trajanju od 10 min)	
Temed	3 µL
10%-tni APS	15 µL

Nakon pripreme rastvor gela za razdvajanje razliven je između ploča. Površina gela je nadslojena n-butanolom. Nakon polimerizacije gela i ispranja butanola, naliven je rastvor za koncentrujući gel. U rastvor je stavljen “češalj”, koji je nakon polimerizacije uklonjen. Nastali bunari isprani su destilovanom vodom i nanošeni su uzorci, koji su prethodno pomešani sa SDS PUZ-om u odnosu 2:1 (40 µL uzorka pomešano je sa 20 µL PUZ-a). Pri izvođenju elektroforeze, napon je podešen na 80 V prilikom kretanja uzoraka kroz koncentrujući gel, a po ulasku uzoraka u gel za razdvajanje napon je podešen na 120 V.

Nakon elektroforeze proteini iz gela su obojeni CBB-om na sledeći način:

1. Rastvor za fiksiranje (15-20 min)
2. Rastvor boje CBB R-250 (5 min)
3. Rastvor za fiksiranje (10 min)
4. Rasvor za obezbojavanje (7% sirćetna kiselina)

4.5.1.4 Zimogramska detekcija endo-, egzoinulinazne i β-fruktofuranozidazne aktivnosti

Za detekciju endoinulinazne, egzoinulinazne i invertazne aktivnosti korišćene su frakcije nakon jonoizmenjivačke hromatografije na QAE matriksu.

IEF gel je pripremljen na isti način kao i drugi IEF gelovi. Gel je pripremljen je dan ranije i korišćena je sledeća smeša amfolita:

pH 2,5 – 4,0	1,2 mL
pH 4,0 – 6,0	1,2 mL
pH 5,0 – 7,0	0,6 mL

Rastvori korišćeni za elektrode:

- Za baznu elektrodu (-) 150 mM rastvor NaOH
- Za kiselu elektrodu (+) 75 mM rastvor H₂SO₄

Uslovi rada:

1. 1000 V, 50 mA, 7 W, 1:30 h
2. 1000 V, 50 mA, 8 W, 0:30 h

Nakon završenog IEF-a, gel je ispran vodom da bi se uklonio deo amfolita, a potom je inkubiran u 150 mM acetatnom puferu pH 4,5, 5 min. Postupak detekcije enzimskih aktivnosti i uslovi rada opisani su u poglavlju 4.3.2.

4.5.1.5 Gel hromatografija

Gel hromatografija rađena je na FPLC sistemu. Korišćen je Sephacryl S 300 HR matriks. Zapremina kolone bila je 300 mL. Kolona je ekvilibrisana 20 mM acetatnim puferom pH 5,5. Frakcije 10, 11 i 12 koje su dobijene nakon jonoizmenjivačke hromatografije na Sephadex QAE matriksu su spojene i liofilizovane. Zatim je uzorak rastvoren u 6 mL 20 mM acetatnog pufera pH 5,5 sa 0,9% NaCl-om. Na kolonu je naneto 6 mL uzorka. Za eluiranje korišćen je 20 mM acetatni pufer pH 5,5. Sakupljane su frakcije od po 4,5 mL. Protok je bio 1,5 mL/min.

4.5.2 Produkcija fruktooligosaharida hidrolizom inulina prečišćenom endoinulinazom

Opisano u poglavlju 4.4.2 uz variranje vremena reakcije u opsegu od 15 do 40 minuta, pri čemu je reakcija prekidana na svakih 5 minuta. Proizvodi reakcije analizirani su TLC-om, kao što je opisano u poglavlju 4.4.4.1.

4.5.3 Biohemijska karakterizacija fruktoziltransferaze

4.5.3.1 Određivanje supstratne specifičnosti

- Potrebni rastvori:

Supstrati:

- | | |
|---|----------|
| - rastvor maltoze (fin kon. 10%) | 5 g |
| - natrijum acetatni pufer pH 4,5, 50 mM | do 50 mL |
| - rastvor skroba (fin kon. 1%) | 0,5 g |
| - natrijum acetatni pufer pH 5,0, 50 mM | do 50 mL |
| - rastvor inulina (fin kon. 0,5%) | 0,25 g |
| - natrijum acetatni pufer pH 4,5, 50 mM | do 50 mL |

- Postupak:

Za reakciju se koristi 50 µL enzima i 450 µL supstrata i inkubira se 30 min na 37 °C. Reakcija se prekida dodatkom 500 µL DNS reagensa. Uzorci se zatim kuvaju 5 min na 100 °C i razblaže sa 4 mL vode. Slepa proba je istog sastava samo što se rastvori dodaju drugim redosledom: enzim, DNS reagens, supstrat.

Za odmerenu vrednost apsorbanije A_{540} sa standardne prave očita se ili izračuna koncentracija redukujućih šećera, na osnovu koje se izračunava enzimska aktivnost (U/mL), prema jednačini (1) datoj u poglavlju 4.1.3.1.1. Jedna jedinica enzimске aktivnosti se definiše kao količina enzima koja je potrebna da hidrolizuje 1 μmol odgovarajućeg supstrata po minuti pri gore navedenim uslovima.

4.5.3.2 Određivanje pH optimuma fruktoziltransferaze

- Potrebni rastvori:

*50 mM natrijum acetatni pufer

- sirćetna kiselina 2,84 mL
- voda do 1000 mL

Rastvor je dotitrovan 1 M rastvorom NaOH do pH (3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0)

*50 mmol/L natrijum fosfatni pufer

- Na_2HPO_4 537 mg
- NaH_2PO_4 170 mg
- voda 90 mL

Rastvor je dotitrovan 1 M rastvorom NaOH ili 1 M rastvorom HCl do pH (6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5).

- Supstrati:

- rastvor saharoze (fin kon. 60%) 6 g
- rastvor pufera odgovarajućeg pH* do 10 g

- Postupak

Reakciona smeša je sadržala 30 μL enzima i 300 μL supstrata. Reakcija je trajala 24 h na 60 °C, a prekinuta je zagrevanjem uzoraka 3 minuta na 100 °C u vodenom kupatilu. Svi uzorci su razblaženi 60 puta, a dobijeni proizvodi analizirani su tankoslojnom hromatografijom po proceduri opisanoj u poglavlju 4.4.4.1.

4.5.3.3 Određivanje temperaturnog optimuma fruktoziltransferaze

- Potrebni rastvori:

Supstrat:

- rastvor saharoze (fin kon. 60%) 6 g
- 50 mM natrijum acetatni pufer pH 5,5 do 10 g

- Postupak

Reakciona smeša je sadržala 30 μL enzima i 300 μL supstrata. Reakcija je trajala 24 h na različitim temperaturama (35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 i 75 °C), a prekinuta je zagrevanjem uzoraka 3 minuta na 100 °C u vodenom kupatilu. Svi uzorci su razblaženi 60 puta, a dobijeni proizvodi analizirani su tankoslojnom hromatografijom po proceduri opisanoj u poglavlju 4.4.4.1.

4.5.3.4 Određivanje pI fruktoziltransferaze izoelektričnim fokusiranjem

Za izolovanje fruktoziltransferaze iz IEF gela korišćena je frakcija 40 nakon gel hromatografije na Sephacryl S 300 HR matriksu.

Uslovi rada izoelektričnog fokusiranja

Pripremljen je IEF gel sa amfolitima čiji je pH opseg 3,5-9,5. U 16 bunara je naneto po 50 μL frakcije 40.

Rastvori korišćeni za elektrode:

- Za baznu elektrodu (-) 150 mM rastvor NaOH
- Za kiselu elektrodu (+) 75 mM rastvor H₂SO₄

Uslovi rada:

1. 1000 V, 50 mA, 7 W, 1:30 h
2. 1000 V, 50 mA, 7 W, 1:30 h
3. 1000 V, 50 mA, 8W, 10 min

Nakon završene elektroforeze gel je poprečno isečen na 16 delova čija je širina bila 5 mm i težina oko 0,67 g. Jedan deo gela bez uzorka je korišćen za merenje pH vrednosti (Tabela 20).

Tabela 20. pH vrednosti gela dobijene nakon završenog IEF-a

	pH		pH
1	3.40	9	5.75
2	3.75	10	5.92
3	4.02	11	6.24
4	4.46	12	6.81
5	4.85	13	7.02
6	5.10	14	7.55
7	5.54	15	7.87
8	5.50	16	8.05

Isečeni gelovi su homogenizovani brzim istiskivanjem kroz špric i dodato im je po 1 mL 100 mM acetatnog pufera pH 6,0. Nakon što gel apsorbuje pufer zamrznut je na 24 h. Sledeći korak je bio odmrzavanje i centrifugiranje 30 min na 4500 ob/min na 4 °C. Dobijeno je oko 700 µL supernatanta, a gelovima je dodato još po 1 mL pufera. Postupak je ponovljen 4 puta i finalno je dobijeno oko 4 mL uzorka, koji je skoncentrovan do 400 µL. Ovi uzorci su korišćeni za određivanje fruktoziltransferazne i invertazne aktivnosti, kao i za određivanje proteinskog profila SDS elektroforezom.

4.5.4 Karakterizacija enzima za produkciju fruktooligosaharida na nivou gena

4.5.4.1 Umnožavanje i analiza sekvencije *suc1* gena

Umnožavanje gena *suc1* urađeno je korišćenjem prajmera Afts F0 i Afts R0. PCR reakciona smeša (25 µL) je sadržala 1 µl genomske DNA, 1 × PCR MasterMix (Thermo Fisher, Vilnius, Lithuania). Koncentracija svakog prajmera bila je 0,4 µmol/L. Reakciona smeša prikazana je u tabeli 21, a parametri amplifikacije u tabeli 22. Kao negativna kontrola korišćeni su uzorci koji ne sadrže DNA.

Tabela 21. PCR reakciona smeša za umnožavanje *suc1* gena

	Komponente	Po 1 uzorku
1.	H ₂ O	8,5 µL
2.	Master mix	12,5 µL
3.	Forward prajmer (Afts F0)	0,5 µL
4.	Reverse prajmer (Afts R0)	0,5 µL
5.	BSA (10 mg/mL)	1 µL
6.	DMSO	1,25 µL
7.	DNA	1 µL

Tabela 22. PCR program za umnožavanje *suc1* gena

1.	Inicijalna denaturacija	94 °C	2 min	34 x
2.	Denaturacija	94 °C	1 min	
3.	Annealing	65 °C	45 sec	
4.	Elongacija	72 °C	3 min	
5.	Finalna elongacija	72 °C	5 min	

Analiza dobijenih proizvoda PCR reakcije urađena je po protokolu opisanom u 4.1.2.3 poglavlju.

4.5.4.2 Provera ekspresije *suc1* gena

4.5.4.2.1 Izolovanje ukupne RNA

Izolovanje ukupne RNA urađeno je po protokolu datom u kitu QIAQEN Rneasy Plant Mini Kit.

U sterilnim uslovima 100 mg micelijuma gljive je preneto sa PDA podloge u mikrotubice i zamrznuto na – 80 °C 30 min. Nakon toga uzorak je homogenizovan i dodato je 450 µL pufera RLT ili RLC sa 2-merkaptotanolom (10 µL β-ME po 1 mL pufera). Uzorci su vorteksovani i inkubirani 15 min na sobnoj temperaturi. Nastali lizati su prebačeni u QIAshredder spin kolonu i centrifugirani 2 min na 14000 ob/min. Dobijeni supernatant, koji je prošao kroz kolonu, prebačen je u novu mikrotubicu gde je prethodno razliveno 225 µL 96-100% etanola, odnosno polovina zapremine lizata. Uzorci su promešani pipetom (ne vorteksuje se) i prebačeni u RNeasy mini spin kolone. Centrifugirani su 15 sec na 10000 ob/min i odbačen je flow through. Dodato je 700 µL RW1 pufera, centrifugirano 15 sec na 10000 ob/min i odbačen flow through, nakon čega je dodato 500 µL RPE pufera centrifugirano 15 sec na 10000 ob/min i odbačen flow through. Postupak je ponovljen još jednom uz centrifugiranje od 2 min. Kolone sa vezanom RNA su centrifugirane 1 min na 10000 ob/min, nakon čega su prebačene u nove sterilne RNaze free mikrotubice i dodato je po 30-50 µL vode koja ne sadrži RNazu, centrifugirano 1 min na 10000 ob/min. U mikrotubici se nakon centrifugiranja nalazi izolovana RNA.

4.5.4.2.2 Tretiranje izolovane RNA DNazom

Sve izolovane RNA tretirane su DNazom (dezoksirubonukleazom) pre korišćenja u RT reakciji, a cilj je uklanjanje eventualno zaostalih molekula DNA koji ometaju reakciju RT PCRa.

Sastav reakcione smeše:

- 8 µL RNA
- 1 µL DNaze
- 1 µL pufera koji sadrži MgCl₂

Smeša je inkubirana 15 min na 37 °C, bez mešanja, a zatim je dodat 1 µL 50 mM rastvora EDTA i nastavljeno inkubiranje 10 min na 65 °C, bez mešanja. Dobijena RNA je korišćena u reakciji RT PCR.

4.5.4.2.3 RT PCR reakcija umnožavanja dela *suc1* gena

RT PCR (two step) sastoji se od dva koraka: Prvi korak podrazumeva prevođenje RNA u cDNA korišćenjem enzima reverzna transkriptaza. Drugi korak predstavlja PCR korak u kom se cDNA, enzimom polimerazom, prevodi u DNA koja u svom molekulu ne sadrži introne.

Tabela 23. Sastav RT reakcione smeše

	Komponente	Po 1 uzorku
1.	RT pufer	4 µL
2.	dNTPs	2 µL
3.	Prajmer - reverzni (Afts R0)	1 µL
4.	Enzim reverzna transkriptaza	1 µL
5.	H ₂ O	10 µL
6.	RNA	2 µL

Reakciona smeša (tabela 23) inkubirana je 60 min na 42°C. Sledeći korak bio je deaktivacija enzima inkubiranjem smeše 10 min na 70°C. Dobijene cDNA koristile su se u PCR reakciji pri uslovima prikazanim u tabeli 24. Sastav reakcione smeše dat je u tabeli 25.

Tabela 24. Uslovi PCR reakcije

1.	Inicijalna denaturacija	94 °C	2 min	34 x
2.	Denaturacija	94 °C	1 min	
3.	Annealing	55 °C	1 min	
4.	Elongacija	72 °C	3 min	
5.	Finalna elongacija	72 °C	5 min	

Tabela 25. PCR reakciona smeša

	Komponente	Po 1 uzorku
1.	H ₂ O	10,5 µL
2.	Master mix	12,5 µL
3.	Forward prajmer (Afts F3)	0,5 µL
4.	Reverse prajmer (Afts R0)	0,5 µL
5.	DNA	1 µL

Analiza dobijenih proizvoda PCR reakcije urađena je po protokolu opisanom u 4.1.2.3 poglavlju.

5. Literatura

- [1] Pandey, A., Soccol, C.R., Selvakumar, P., Soccol, V.T., Krieger, N., Fontana, J.D., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **81**, 35–52 (1999).
- [2] Chi, Z., Chi, Z., Zhang, T., Liu, G., Yue, L., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **82**, 211–20 (2009).
- [3] Fernandes, P., Carvalho, F., u: *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*, editor: Brahmachari, G., Demain, A.L., Adrio, J.L., Elsevier Inc., pp.513–44 (2017).
- [4] Dagher, S., Fisher, C., Galli, C., Grant, D., Hattan, D., Kojima, K., Kuznesof, P., Larsen, J., Meyland, I., Priestly, B., Reyes, F., Vongbuddhapitak, A., Walker, R., Wallin, H., *Evaluation of certain food additives and contaminants*, Geneva, 2001.
- [5] Goosen, C., van der Maarel, M.J.E.C., Dijkhuizen, L., *Biocatal. Biotransformation*, **26**, 49–58 (2008).
- [6] Housseiny, M.M., *J. Microbiol.*, **52**, 389–98 (2014).
- [7] Rawat, H.K., Ganaie, M.A., Kango, N., *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, **107**, 799–811 (2015).
- [8] Vijayaraghavan, K., Yamini, D., Ambika, V., Sravya Sowdamini, N., *Crit. Rev. Biotechnol.*, **29**, 67–77 (2009).
- [9] Soccol, C.R., da Costa, E.S.F., Letti, L.A.J., Karp, S.G., Woiciechowski, A.L., Vandenberghe, L.P. de S., *Biotechnol. Res. Innov.*, **1**, 52–71 (2017).
- [10] Skowronek, M., Fiedurek, J., *Food Technol. Biotechnol.*, **42**, 141–6 (2004).
- [11] Onodera, S., Shiomi, N., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 1443–7 (1992).
- [12] Ganaie, M.A., Gupta, U.S., Kango, N., *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **97**, 12–7 (2013).
- [13] Bornet, F.R.J., Brouns, F., Tashiro, Y., Duvillier, V., *Dig. Liver Dis.*, **34**, S111–20 (2002).
- [14] Scholz-Ahrens, K.E., Ade, P., Marten, B., Weber, P., Timm, W., Açı, Y., Glüer, C.C., Schrezenmeir, J., *J. Nutr.*, **137**, 838–46 (2007).
- [15] Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A., Clark, D.P., *Brock Biology of microorganisms*, Pearson Education, Inc, San Francisco, CA 94111, (2012).
- [16] Gong, F., Sheng, J., Chi, Z., Li, J., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 179–85 (2007).
- [17] Sheng, J., Chi, Z., Gong, F., Li, J., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **144**, 111–21 (2008).
- [18] Gao, L., Chi, Z., Sheng, J., Ni, X., Wang, L., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **77**, 825–32 (2007).
- [19] Gao, L., Chi, Z., Sheng, J., Wang, L., Li, J., Gong, F., *Microb. Ecol.*, **54**, 722–9 (2007).
- [20] Ettalibi, M., Baratti, J.C., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 13–20 (1987).
- [21] Ohta, K., Akimoto, H., Matsuda, S., Toshimitsu, D., Nakamura, T., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1731–8 (1998).
- [22] Samson, R.A., Visagie, C.M., Houbaken, J., Hong, S.B., Hubka, V., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Susca, A., Tanney, J.B., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Yaguchi, T., Frisvad, J.C., *Stud. Mycol.*, **78**, 141–73 (2014).
- [23] Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J., Van Dijck, P., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **59**, 426–35 (2002).
- [24] Haq, I., *Br. Microbiol. Res. J.*, **4**, 195–205 (2014).
- [25] Liu, Y., Ding, Z., Peng, D., Liu, S., Kong, L., Peng, H., Xiang, C., Li, Z., Huang, W., *J. Integr. Agric.*, **18**, 2561–70 (2019).
- [26] Abbas, B.A., Khudor, M.H., Alkhursan R.N., *Poultry Feed Fungi a Practical Guide Polutry Feed Fungi a Practical Guide*, College of Veterinary Medicine, University of Basrah, Basrah, Iraq, (2021).
- [27] Raimbault, M., *Electron. J. Biotechnol.*, **1**, 114–40 (1998).

- [28] Mussatto, S.I., Aguilar, C.N., Rodrigues, L.R., Teixeira, J.A., *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **59**, 76–81 (2009).
- [29] Ferrara, M., Logrieco, A.F., Moretti, A., Susca, A., *Food Microbiol.*, **90**, 103469 (2020).
- [30] Frisvad, J.C., Møller, L.L.H., Larsen, T.O., Kumar, R., Arnau, J., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**, 9481-9515 (2018).
- [31] Perrone, G., Mulè, G., Susca, A., Battilani, P., Pietri, A., Logrieco, A., *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 680–5 (2006).
- [32] Sewalt, V., Shanahan, D., Gregg, L., La Marta, J., Carillo, R., *Ind. Biotechnol.*, **12**, 295–302 (2016).
- [33] Samson, R.A., Varga, J., Witiak, S.M., Geiser, D.M., *Stud. Mycol.*, **59**, 71–3 (2007).
- [34] White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B., Taylor, J.W., u: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press Inc., pp. 315-322 (1990).
- [35] Meyert, R.J., *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2269–76 (1991).
- [36] Jaklitsch, W.M., *Fungal Divers.*, **48**, 1–250 (2011).
- [37] Samuels, G.J., *Phytopathology*, **96**, 195–206 (2006).
- [38] Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P.W., Miller, A.N., Wingfield, M.J., Aime, M.C., An, K.D., Bai, F.Y., Barreto, R.W., Begerow, D., Bergeron, M.J., Blackwell, M., Boekhout, T., Bogale, M., Boonyuen, N., Burgaz, A.R., Buyck, B., Cai, L., Cai, Q., Cardinali, G., Chaverri, P., Coppins, B.J., Crespo, A., Cubas, P., Cummings, C., Damm, U., de Beer, Z.W., de Hoog, G.S., Del-Prado, R., Dentinger, B., Diéguez-Uribeondo, J., Divakar, P.K., Douglas, B., Dueñas, M., Duong, T.A., Eberhardt, U., Edwards, J.E., Elshahed, M.S., Fliegerova, K., Furtado, M., García, M.A., Ge, Z.W., Griffith, G.W., Griffiths, K., Groenewald, J.Z., Groenewald, M., Grube, M., Gryzenhout, M., Guo, L.D., Hagen, F., Hambleton, S., Hamelin, R.C., Hansen, K., Harrold, P., Heller, G., Herrera, C., Hirayama, K., Hirooka, Y., Ho, H.M., Hoffmann, K., Hofstetter, V., Högnabba, F., Hollingsworth, P.M., Hong, S.B., Hosaka, K., Houbraken, J., Hughes, K., Huhtinen, S., Hyde, K.D., James, T., Johnson, E.M., Johnson, J.E., Johnston, P.R., Jones, E.B.G., Kelly, L.J., Kirk, P.M., Knapp, D.G., Kõljalg, U., Kovács, G.M., Kurtzman, C.P., Landvik, S., Leavitt, S.D., Liggenstoffer, A.S., Liimatainen, K., Lombard, L., Luangsa-ard, J.J., Lumbsch, H.T., Maganti, H., Maharachchikumbura, S.S.N., Martin, M.P., May, T.W., McTaggart, A.R., Methven, A.S., Meyer, W., Moncalvo, J.M., Mongkolsamrit, S., Nagy, L.G., Nilsson, R.H., Niskanen, T., Nyilasi, I., Okada, G., Okane, I., Olariaga, I., Otte, J., Papp, T., Park, D., Petkovits, T., Pino-Bodas, R., Quaedvlieg, W., Raja, H.A., Redecker, D., Rintoul, T.L., Ruibal, C., Sarmiento-Ramírez, J.M., Schmitt, I., Schüßler, A., Shearer, C., Sotome, K., Stefani, F.O.P., Stenroos, S., Stielow, B., Stockinger, H., Suetrong, S., Suh, S.O., Sung, G.H., Suzuki, M., Tanaka, K., Tedersoo, L., Telleria, M.T., Tretter, E., Untereiner, W.A., Urbina, H., Vágvölgyi, C., Vialle, A., Vu, T.D., Walther, G., Wang, Q.M., Wang, Y., Weir, B.S., Weiß, M., White, M.M., Xu, J., Yahr, R., Yang, Z.L., Yurkov, A., Zamora, J.C., Zhang, N., Zhuang, W.Y., Schindel, D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**, 6241–6 (2012).
- [39] Peterson, S.W., *Mycologia*, **100**, 205–26 (2008).
- [40] Hubka, V., Kolarik M., *Persoonia Mol. Phylogeny Evol. Fungi*, **29**, 1–10 (2012).
- [41] Griffiths, J.F.A., Wessler, R.S., Lewontin, C.R., Gelbart, M.W., Suzuki, T.D., Miller, H.J., An introduction to genetic analysis, W.H. Freeman and Company, New York, (2004).
- [42] Lemey, P., Salemi, M., Vandamme, A.M., *The Phylogenetic Handbook*, Cambridge University Press, New York, (2009).
- [43] Graur, D., Li, W.H., *Fundamentals of Molecular Evolution*, Sinauer Associates, Oxford University Press., pp. 439 (2000).
- [44] Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G.,. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 4876–82 (1997).

- [45] Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., *Mol. Biol. Evol.*, **35**, 1547–9 (2018).
- [46] Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., *Comput. Appl. Biosci.*, **10**, 189–91 (1994).
- [47] Retief, J.D., *Methods Mol. Biol.*, **132**, 243–58 (2000).
- [48] Abu El-souod, S.M., Mohamed, T.M., Ali, E.M.M., El-badry, M.O., El-keiy, M.M., *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, **12**, 15–20 (2014).
- [49] Gern, R.M.M., Furlan, S.A., Ninow, J.L., Jonas, R., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55**, 632–5 (2001).
- [50] Silvera, D., Luthfin, I., Aulia, A., Nova Wahyu, P., *Res. J. Chem. Environ.*, **22**, 71–8 (2018).
- [51] Davis, B.D., *Am. Biol. Teach.*, **39**, 217–26 (1977).
- [52] Kulkarni, J.A., Kothari, M.N., Baig, M.M.V., *Int. J. Adv. Biotechnol. Res.*, **4**, 324–8 (2013).
- [53] Pel, H.J., De Winde, J.H., Archer, D.B., Dyer, P.S., Hofmann, G., Schaap, P.J., Turner, G., De Vries, R.P., Albang, R., Albermann, K., Andersen, M.R., Bendtsen, J.D., Benen, J.A.E., Van Den Berg, M., Breestraat, S., Caddick, M.X., Contreras, R., Cornell, M., Coutinho, P.M., Danchin, E.G.J., Debets, A.J.M., Dekker, P., Van Dijk, P.W.M., Van Dijk, A., Dijkhuizen, L., Driessen, A.J.M., D'Enfert, C., Geysens, S., Goosen, C., Groot, G.S.P., De Groot, P.W.J., Guillemette, T., Henrissat, B., Herweijer, M., Van Den Hombergh, J.P.T.W., Van Den Hondel, C.A.M.J.J., Van Der Heijden, R.T.J.M., Van Der Kaaij, R.M., Klis, F.M., Kools, H.J., Kubicek, C.P., Van Kuyk, P.A., Lauber, J., Lu, X., Van Der Maarel, M.J.E.C., Meulenberg, R., Menke, H., Mortimer, M.A., Nielsen, J., Oliver, S.G., Olsthoorn, M., Pal, K., Van Peij, N.N.M.E., Ram, A.F.J., Rinas, U., Roubos, J.A., Sagt, C.M.J., Schmoll, M., Sun, J., Ussery, D., Varga, J., Vervecken, W., Van De Vondervoort, P.J.J., Wedler, H., Wösten, H.A.B., Zeng, A.P., Van Ooyen, A.J.J., Visser, J., Stam, H., *Nat. Biotechnol.*, **25**, 221–31 (2007).
- [54] Skovgaard, N., *World Heal. Organ. - Tech. Rep. Ser.*, **906**, 1–62 (2002).
- [55] Frisvad, J.C., Larsen, T.O., Thrane, U., Meijer, M., Varga, J., Samson, R.A., Nielsen, K.F., *PLoS One*, **6**, 2–7 (2011).
- [56] Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., Varzakas, T., *Foods*, **86**, 137 (2020).
- [57] Bezuidenhout, S.C., Gelderblom, W.C.A., Gorst-Allman, C.P., Horak, R.M., Marasas, W.F.O., Spiteller, G., Vleggaar, R., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 743–5 (1988).
- [58] Baker, S.E., *Med. Mycol.*, **44**, 17–21 (2006).
- [59] Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Samson, R.A., Larsen, T.O., Thrane, U., *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 9727–32 (2007).
- [60] Månsson, M., Klejnstrup, M.L., Phipps, R.K., Nielsen, K.F., Frisvad, J.C., Gotfredsen, C.H., Larsen, T.O., *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 949–53 (2010).
- [61] Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K.F., Frisvad, J.C., Samson, R.A., *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.*, **26**, 94–100 (2009).
- [62] Renaud, J.B., Kelman, M.J., Qi, T.F., Seifert, K.A., Sumarah, M.W., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **29**, 2131–9 (2015).
- [63] Susca, A., Proctor, R.H., Morelli, M., Haidukowski, M., Gallo, A., Logrieco, A.F., Moretti, A., *Front. Microbiol.*, **7**, 1–15 (2016).
- [64] Susca, A., Proctor, R.H., Butchko, R.A.E., Haidukowski, M., Stea, G., Logrieco, A., Moretti, A., *Fungal Genet. Biol.*, **73**, 39–52 (2014).
- [65] Fang, T.J., Liao, B.C., Lee, S.C., *N. Biotechnol.*, **27**, 25–32 (2010).
- [66] Díaz-Godínez, G., Téllez-Téllez, M., Sánchez, C., Díaz, R., *Ferment. Process.*, (2017).
- [67] Dojnov, B., Grujic, M., Percevic, B., Vujcic, Z., *J. Serbian Chem. Soc.*, **80**, 1279–88 (2015).
- [68] Grujić, M., Dojnov, B., Potočnik, I., Duduk, B., Vujčić, Z., *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **104**, 290–8 (2015).
- [69] De la Rosa, O., Flores-Gallegos, C.A., Muñiz-Marquez, D., Nobre, C., Contreras-Esquivel, J.C., Aguilar, C.N., *Trends Food Sci. Technol.*, **91**, 139–46 (2019).
- [70] Alegre, A.C.P., Polizeli, M. de L.T. de M., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., Guimarães, L.H.S.,

- Brazilian J. Microbiol.*, **40**, 612–22 (2009).
- [71] Gonçalves, H.B., Jorge, J.A., Guimarães, L.H.S., *J. Food Biochem.*, **40**, 655–63 (2016).
 - [72] Sathish, T., Prakasham, R.S., *Indian J. Microbiol.*, **53**, 337–42 (2013).
 - [73] Dojnov, B., Vujčić, Z., *Anal. Biochem.*, **421**, (2012).
 - [74] Peña, R.J., u: Triticale improvement and production, editor: Mergoum, M., Gómez-Macpherson, H., Food and Agriculture Organization of The United Nations, Rome, pp. 37-85 (2004).
 - [75] Pejic, A., *Agrosvet*, **17**, 6–7 (2007).
 - [76] Lorenz, K., Reuter, F.W., Sizer, C., *Am. Assoc. Cereal Chem.*, **51**, 534–42 (1974).
 - [77] Dojnov, B., Grujic, M., Vujcic, Z., *J. Serbian Chem. Soc.*, **80**, 1375–90 (2015).
 - [78] Chi, Z.M., Zhang, T., Cao, T.S., Liu, X.Y., Cui, W., Zhao, C.H., *Bioresour. Technol.*, **102**, 4295–303 (2011).
 - [79] Karatop, R., Sanal, F., *J. Cell Mol. Biol.*, **11**, 21–8 (2013).
 - [80] Aro, N., Pakula, T., Penttilä, M., *FEMS Microbiol. Rev.*, **29**, 719–39 (2005).
 - [81] Sheng, J., Zhenming, A.E., Ae, C., Yan, K., Xianghong, A.E., Ae, W., Li, J., *Bioprocess Biosyst Eng*, **32**, 333–9 (2009).
 - [82] Gill, P.K., Sharma, A.D., Harchand, R.K., Singh, P., *Bioresour. Technol.*, **87**, 359–62 (2003).
 - [83] Bhanoori, M., Venkateswerlu, G., *Biochim. Biophys. Acta*, **1523**, 21–8 (2000).
 - [84] Miguélez, E.M., Hardisson, C., Manzanal, M.B., *FEMS Microbiol. Lett.*, **194**, 181–5 (2001).
 - [85] Pessoni, R.A.B., Freshour, G., Figueiredo-Ribeiro, R.D.C.L., Hahn, G., Braga, M.R., *Mycologia*, **97**, 304–11 (2005).
 - [86] Yépez Silva-Santisteban, B.O., Converti, A., Maugeri Filho F., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **152**, 249–61 (2009).
 - [87] Gao, J., Yuan, W., Li, Y., Xiang, R., Hou, S., Zhong, S., Bai, F., *Biotechnol. Biofuels*, **8**, 115 (2015).
 - [88] Gupta, A.K., Singh, D.P., Kaur, N., Singh, R., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **59**, 377–85 (1994).
 - [89] Zhang, J., Yuan, H., Wen, T., Xu, F., Di, Y., Huo, K., Li, Y.Y., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **62**, 387–91 (2003).
 - [90] Gao, J., Chen, L., Yuan, W., *J. BioSci. Biotech.*, **1**, 155–61 (2012).
 - [91] Skowronek, M., Fiedurek, J., *J. Appl. Microbiol.*, **95**, 686–92 (2003).
 - [92] Burne, R.A., Penders, J.E.C., *Infect. Immun.*, **60**, 4621 (1992).
 - [93] Van Den Ende, W., Michiels, A., De Roover, J., Verhaert, P., Van Laere, A.Â., *Plant J.*, **24**, 447–56 (2000).
 - [94] Arand, M., Golubev, A.M., Neto, J.R.B., Polikarpov, I., Wattiez, R., Korneeva, O.S., Eneyskaya, E.V., Kulminskaya, A.A., Shabalin, K.A., Shishliannikov, S.M., Chepurnaya, O.V., Neustroev, K.N., *Biochem. J.*, **362**, 131–5 (2002).
 - [95] Tsujimoto, Y., Watanabe, A., Nakano, K., Watanabe, K., Matsui, H., Tsuji, K., Tsukihara, T., Suzuki, Y., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **62**, 180–5 (2003).
 - [96] Coutinho, P.M., Henrissat, B., Recent advances in carbohydrate bioengineering, Proceedings of the 3rd Carbohydrate Bioengineering Meeting, University of Newcastle upon Tyne, UK, 3–12 (1999).
 - [97] Lammens, W., Le Roy, K., Schroeven, L., Van Laere, A., Rabijns, A., Van Den Ende, W., *J. Exp. Bot.*, **60**, 727–40 (2009).
 - [98] Henrissat, B., Bairoch, A., *Biochem. J.*, **293**, 781–8 (1993).
 - [99] Nagem, R.A.P., Rojas, A.L., Golubev, A.M., Korneeva, O.S., Eneyskaya, E.V., Kulminskaya, A.A., Neustroev, K.N., Polikarpov, I., *J. Mol. Biol.*, **344**, 471–80 (2004).
 - [100] Pons, T., Olmea, O., Chinae, G., Beldarra, A., Ma, G., Acosta, N., *Proteins: Struct.* **395**, 383–95 (1998).
 - [101] Alberto, F., Bignon, C., Sulzenbacher, G., Henrissat, B., Czjzek, M., *J. Biol. Chem.*, **279**,

- 18903–10 (2004).
- [102] McCarter, J.D., Withers, S.G., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **4**, 885–92 (1994).
 - [103] Meng, G., Fütterer, K., *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 935–41 (2003).
 - [104] Reddy, V.A., Maley, F., *J. Biol. Chem.*, **265**, 10817–20 (1990).
 - [105] Reddy, A., Maley, F., *J. Biol. Chem.*, **271**, 13953–8 (1996).
 - [106] Kango, N., *J. Food Eng.*, **85**, 473–8 (2008).
 - [107] Leroy, G., Grongnet, J.F., Mabeau, S., le Corre, D., Baty-Julien, C., *J. Sci. Food Agric.*, **90**, 1203–9 (2010).
 - [108] Kaur, N., Gupta, A.K., *J. Biosci.*, **27**, 703–14 (2002).
 - [109] Li, S.Z., Chan-Halbrendt, C., *Appl. Energy*, **86**, S162–9 (2009).
 - [110] Singh, R.S., Singh, R.P., *Food Technol. Biotechnol.*, **48**, 435–50 (2010).
 - [111] Uhm, T.B., Chung, M.S., Lee, S.H., Gourronc, F., Housen, I., Kim, J.H., Van Beeumen, J., Haye, B., Vandenhoute, J., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 146–51 (1999).
 - [112] Park, S., Han, Y., Kim, H., Song, S., Uhm, T.B., Chae, K.S., *Biochem.*, **68**, 658–61 (2003).
 - [113] Skowronek, M., Fiedurek, J., *Food Technol. Biotechnol.*, **44**, 53–8 (2006).
 - [114] Azhari, R., Szlak, M.A., Ilan, E., Sideman, S., Lotan, N., *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **11**, 105–17 (1989).
 - [115] Uhm, T.B., Chae, K.S., Lee, D.W., Kim, H.S., Cassart, J.P., Vandenhoute, J., *Biotechnol. Lett.* 1998 208, **20**, 809–12 (1998).
 - [116] Pouyez, J., Mayard, A., Vandamme, A.M., Roussel, G., Perpète, E.A., Wouters, J., Housen, I., Michaux, C., *Biochimie*, **94**, 2423–30 (2012).
 - [117] Banguela, A., Hernández, L., *Biotechnol. Appl.*, **23**, 202–10 (2006).
 - [118] “RCSB PDB - 3RWK: First crystal structure of an endo-inulinase, from *Aspergillus ficuum*: structural analysis and comparison with other GH32 enzymes.”: <https://www.rcsb.org/structure/3RWK>, cited 6 April, 2023.
 - [119] Moriyama, S., Tanaka, H., Uwataki, M., Muguruma, M., Ohta, K., *J. Biosci. Bioeng.*, **96**, 324–31 (2003).
 - [120] Kulminskaya, A.A., Arand, M., Eneyskaya, E.V., Ivanen, D.R., Shabalin, K.A., Shishlyannikov, S.M., Saveliev, A.N., Korneeva, O.S., Neustroev, K.N., *Biochim. Biophys. Acta* **1650**, 22–9 (2003).
 - [121] Zhang, L., Zhao, C., Zhu, D., Ohta, Y., Wang, Y., *Protein Expr. Purif.*, **35**, 272–5 (2004).
 - [122] Mutanda, T., Wilhelmi, B., Whiteley, C.G., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **159**, 65–77 (2009).
 - [123] Gill, P.K., Manhas, R.K., Singh, J., Singh, P., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **117**, 19–32 (2004).
 - [124] “RCSB PDB - 1Y4W: Crystal structure of exo-inulinase from *Aspergillus awamori* in spacegroup P21”.: <https://www.rcsb.org/structure/1y4w>, cited 6 April, 2023.
 - [125] Manoochchri, H., Hosseini, N.F., Saidijam, M., Taheri, M., Rezaee, H., Nouri, F., *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, **25**, 101599 (2020).
 - [126] Boddy, L.M., Berges, T., Vainstein, M.H., Dobson, M.J., Balance, D.J., Peberdy, J.F., *Curr. Genet.*, **191**, 60–6 (1993).
 - [127] L’Hocine, L., Wang, Z., Jiang, B., Xu, S., *J. Biotechnol.*, **81**, 73–84 (2000).
 - [128] Nagaya, M., Kimura, M., Gozu, Y., Sato, S., Hirano, K., Tochio, T., Nishikawa, A., Tonoizuka, T., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **81**, 1786–95 (2017).
 - [129] “RCSB PDB - 5XH9: *Aspergillus kawachii* beta-fructofuranosidase”.: <https://www.rcsb.org/structure/5XH9>, cited 4 April, 2023.
 - [130] de Almeida, M.N., Guimarães, V.M., Falkoski, D.L., de Camargo, B.R., Fontes-Sant’ana, G.C., Maitan-Alfenas, G.P., de Rezende, S.T., *J. Food Biochem.*, **42**, 1–9 (2018).
 - [131] Rubio, M.C., Maldonado, M.C., *Curr. Microbiol.* 1995 312, **31**, 80–3 (1995).
 - [132] Antošová, M., Polakovič, M., *Chem. Pap.*, **55**, 350–8 (2001).
 - [133] Vijn, I., Smeekens, S., *Plant Physiol.*, **120**, 351–9 (1999).

- [134] Naumoff, G.D., *Proteins Structure, Funct. Genet.*, **42**, 66–76 (2001).
- [135] Somiari, R.I., Brzeski, H., Tate, R., Bielecki, S., Polak, J., *Biotechnol. Lett.*, **19**, 1243–7 (1997).
- [136] Nguyen, Q.D., Mattes, F., Hoschke, Á., Rezessy-Szabó, J., Bhat, M.K., *Biotechnol. Lett.*, **21**, 183–6 (1999).
- [137] Punt, P.J., van den Hondel, C.A.M.J.J., *Methods Enzymol.*, **216**, 447–57 (1992).
- [138] Yuan, X.L., Goosen, C., Kools, H., van der Maarel, M.J.E.C., van den Hondel, C.A.M.J.J., Dijkhuizen, L., Ram, A.F.J., *Microbiology*, **152**, 3061–73 (2006).
- [139] Bergès, T., Barreau, C., Peberdy, J.F., Boddy, L.M., *Curr. Genet.*, **24**, 53–9 (1993).
- [140] Yanai, K., Nakane, A., Kawate, A., Hirayama, M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 766–73 (2001).
- [141] Goosen, C., Yuan, X.L., Van Munster, J.M., Ram, A.F.J., Van Der Maarel, M.J.E.C., Dijkhuizen, L., *Eukaryot. Cell*, **6**, 674–81 (2007).
- [142] Wallis, G.L.F., Hemming, F.W., Peberdy, J.F., *Arch. Biochem. Biophys.*, **345**, 214–22 (1997).
- [143] Gross, J., Lapiere, C.M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **48**, 1014–22 (1962).
- [144] Granelli-Piperno, A., Reich, E., *J. Exp. Med.*, **148**, 223–34 (1978).
- [145] Hibbs, M.S., Hasty, K.A., Seyer, J.M., Kang, A.H., Mainardi, C.L., *J. Biol. Chem.*, **260**, 2493–500 (1985).
- [146] Paemen, L., Martens, E., Norga, K., Masure, S., Roets, E., Hoogmartens, J., Opdenakker, G., *Biochem. Pharmacol.*, **52**, 105–11 (1996).
- [147] Masure, S., Billiau, A., Van Damme, J., Opdenakker, G., *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, **1054**, 317–25 (1990).
- [148] Rossano, R., Larocca, M., Riccio, P., *J. Plant Physiol.*, **168**, 1517–25 (2011).
- [149] Thimon, V., Belghazi, M., Labas, V., Dacheux, J.L., Gatti, J.L., *Anal. Biochem.*, **375**, 382–4 (2008).
- [150] Lafuente-Castaneda, C., Martinez, G., Contreras-Esquivel, J.C., Rodriguez-Herrera, R., Prado-Barragan, A., Aguilar, C.N., *Am. J. Agric. Biol. Sci.*, **7**, 129–34 (2012).
- [151] Parivuguna, V., Saravana, P., Shanmugham, S., *Int. J. Pharm. Biol. Sci. IJPBS*, **9**, 395–404 (2019).
- [152] Manchenko, P.G., *Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels*, CRC Press, London, (2003).
- [153] Dojnov, B., Grujić, M., Vujčić, Z., *Electrophoresis*, **36**, 1724–7 (2015).
- [154] Sánchez, Ó.J., Cardona, C.A., *Bioresour. Technol.*, **99**, 5270–95 (2008).
- [155] Chi, Z., Liu, J., Zhang, W., *Enzyme Microb. Technol.*, **28**, 240–5 (2001).
- [156] Zhang, T., Chi, Z., Zhao, C.H., Chi, Z.M., Gong, F., *Bioresour. Technol.*, **101**, 8166–70 (2010).
- [157] Zhao, C.H., Zhang, T., Li, M., Chi, Z.M., *Process Biochem.*, **45**, 1121–6 (2010).
- [158] Nakamura, T., Ogata, Y., Hamada, S., Ohta, K., *J. Ferment. Bioeng.*, **81**, 564–6 (1996).
- [159] Szambelan, K., Nowak, J., Czarnecki, Z., *Biotechnol. Lett.*, **26**, 845–8 (2004).
- [160] Rocha, J.R., Catana, R., Ferreira, B.S., Cabral, J.M.S., Fernandes, P., *Pesqui. Agropecu. Bras.*, **95**, 77–82 (2006).
- [161] Gill, P.K., Manhas, R.K., Singh, P., *J. Food Eng.*, **76**, 369–75 (2006).
- [162] Singh, R.S., Sooch, B.S., Puri, M., *Bioresour. Technol.*, **98**, 2518–25 (2007).
- [163] Gong, F., Zhang, T., Chi, Z., Sheng, J., Li, J., Wang, X., *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **13**, 533–9 (2008).
- [164] Kushi, R.T., Monti, R., Contiero, J., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 63–9 (2000).
- [165] Kwon, H.J., Jeon, S.J., You, D.J., Kim, K.H., Jeong, Y.K., Kim, Y.H., Kim, Y.M., Kim, B.W., *Biotechnol. Lett.*, **25**, 155–9 (2003).
- [166] Ibrahim, O.O., *J. Food Chem. Nanotechnol.*, **4**, 65–76 (2018).

- [167] Gibson, G.R., Hutkins, R., Sanders, M.E., Prescott, S.L., Reimer, R.A., Salminen, S.J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K.S., Cani, P.D., Verbeke, K., Reid, G., *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **14**, 491–502 (2017).
- [168] Kralj, S., Leeftang, C., Sierra, E.I., Kempinski, B., Alkan, V., Kolkman, M., *Carbohydr. Polym.*, **179**, 350–9 (2018).
- [169] Yun, J.W., Kim, D.H., Uhm, T.B., Song, S.K., *Biotechnol. Lett.*, **19**, 935–8 (1997).
- [170] López-Molina, D., Navarro-Martínez, M.D., Melgarejo, F.R., Hiner, A.N.P., Chazarra, S., Rodríguez-López, J.N., *Phytochemistry*, **66**, 1476–84 (2005).
- [171] Kim, H.S., Lee, D.W., Ryu, E.J., Uhm, T.B., Yang, M.S., Kim, J.B., Chae, K.S., *Biotechnol. Lett.*, **21**, 621–3 (1999).
- [172] Martins, G.N., Ureta, M.M., Tymczyszyn, E.E., Castilho, P.C., Gomez-Zavaglia, A., *Front. Nutr.*, **6**, (2019).
- [173] Yun, J.W., *Enzyme Microb. Technol.*, **19**, 107–17 (1996).
- [174] Michel, M.R., Rodríguez-Jasso, R.M., Aguilar, C.N., Gonzalez-Herrera, S.M., Flores-Gallegos, A.C., Rodríguez-Herrera, R., u: Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health, editor: Rao, V., G. Rao. L.G., IntechOpen Limited, London, UK, pp.169–89 (2016).
- [175] Wienberg, F., Hövels, M., Kosciow, K., Deppenmeier, U., *J. Chromatogr. B*, **1172**, (2021).
- [176] Kaplan, H., Hutkins, R.W., *Appl. Environ. Microbiology*, **66** (6), 2682–4 (2000).
- [177] Su, P., Henriksson, A., Mitchell, H., *Anaerobe*, **13**, 134–9 (2007).
- [178] Rada, V., Nevoral, J., Trojanová, I., Tománková, E., Šmehilová, M., Killer, J., *Anaerobe*, **14**, 205–8 (2008).
- [179] Nobre, C., Sousa, S.C., Silva, S.P., Pinheiro, A.C., Coelho, E., Vicente, A.A., Gomes, A.M.P., Coimbra, M.A., Teixeira, J.A., Rodrigues, L.R., *J. Funct. Foods*, **46**, 278–87 (2018).
- [180] Cardelle-Cobas, A., Corzo, N., Olano, A., Peláez, C., Requena, T., Ávila, M., *Int. J. Food Microbiol.*, **149**, 81–7 (2011).
- [181] Amorim, C., Silvério, S.C., Rodrigues, L.R., *Food Chem.*, **270**, 86–94 (2019).
- [182] Henderson, W.E., King, W., Shetty, J.K., patent WO 2007/061918 A3, 1-8 (2006).
- [183] Catenza, K.F., Donkor, K.K., *Food Chem.*, **355**, 129416 (2021).
- [184] Nobre, C., Alves Filho, E.G., Fernandes, F.A.N., Brito, E.S., Rodrigues, S., Teixeira, J.A., Rodrigues, L.R., *Lwt*, **89**, 58–64 (2018).
- [185] Yu, S., Liu, J.J., Yun, E.J., Kwak, S., Kim, K.H., Jin, Y.S., *Microb. Cell Fact.*, **17**, 1–10 (2018).
- [186] Zaky, A.S., Pensupa, N., Andrade-Eiroa, Á., Tucker, G.A., Du, C., *J. Food Compos. Anal.*, **56**, 25–33 (2017).
- [187] Márquez-Sillero, I., Cárdenas, S., Valcárcel, M., *Microchem. J.*, **110**, 629–35 (2013).
- [188] Wang, S., Pan, J., Zhang, Z., Yan, X., *J. Funct. Foods*, **69**, 103955 (2020).
- [189] El-Kholy, W.M., Aamer, R.A., Ali, A.N.A., *Ann. Agric. Sci.*, **65**, 59–67 (2020).
- [190] Hövels, M., Kosciow, K., Deppenmeier, U., *Carbohydr. Polym.*, **255**, 117384 (2021).
- [191] Rodríguez-Gómez, R., Jiménez-Díaz, I., Zafra-Gómez, A., Morales, J.C., *Talanta*, **144**, 883–9 (2015).
- [192] Dos Santos Lima, M., Nunes, C.P., Silva, B.D.L.D.A., Padilha, C.V. da S., Bonfim, T.H.F. Do, Stamford, T.L.M., Vasconcelos, M.A. da S., Aquino, J. de S., *J Food Sci Technol*, **56**, 4575–84 (2019).
- [193] ICH International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, (1994).
- [194] Valcheva, R., Dieleman, L.A., *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, **30**, 27–37 (2016).
- [195] Sangeetha, P.T., Ramesh, M.N., Prapulla, S.G., *Trends Food Sci. Technol.*, **16**, 442–57 (2005).
- [196] EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA); Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to fructo-oligosaccharides FOS and decreasing

- potentially pathogenic gastro-intestinal microorganisms (ID 781). *EFSA J.*, **9**, 2222 (2011).
- [197] Quigley, E.M.M., *Pharmacol. Res.*, **61**, 213–8 (2010).
- [198] Patel, S., Goyal, A., *3 Biotech*, **2**, 115–25 (2012).
- [199] Vandenplas, Y., Alarcon, P., *Benef. Microbes*, **6**, 199–208 (2015).
- [200] Ahmad, A., Khalid, S., u: Diet, Microbiome and Health., Elsevier Inc., pp.53–91 (2018).
- [201] Bindels, L.B., Delzenne, N.M., Cani, P.D., Walter, J., *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **12**, 303–10 (2015).
- [202] Shanahan, F., *Am J Clin Nutr*, **101**, 1–2 (2015).
- [203] Gibson, G.R., Roberfroid, M.B., *J Nutr.*, **125**, 1401–1412 (1995).
- [204] Hutkins, R.W., Krumbeck, J.A., Bindels, L.B., Cani, P.D., Fahey, G., Goh, Y.J., Hamaker, B., Martens, E.C., Mills, D.A., Rastal, R.A., Vaughan, E., Sanders, M.E., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **37**, 1–7 (2016).
- [205] Biswal, P., Pal, A., Das, A.P., u: Microbial Production of Food Ingredients and Additive, Elsevier Inc., pp. 57–88 (2017).
- [206] Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E., *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **11**, 506–14 (2014).
- [207] Biswal, P., Pal, A., Das, A.P., *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, **33**, 326–36 (2015).
- [208] Brownawell, A.M., Caers, W., Gibson, G.R., Kendall, C.W.C., Lewis, K.D., Ringel, Y., Slavín, J.L., *J. Nutr.*, **142**, 962–74 (2012).
- [209] Ritchie, M.L., Romanuk, T.N., *Probiotics Gastrointest. Dis.*, **7**, e34938 (2012).
- [210] Bal, B., Nayak, S., Das, A.P., *Nanotechnol. Appl. Food Flavor, Stability, Nutr. Saf.*, 267–85 (2017).
- [211] Foolad, N., Armstrong, A.W., *Benef. Microbes*, **5**, 151–60 (2014).
- [212] McKeen, S., Young, W., Mullaney, J., Fraser, K., McNabb, W.C., Roy, N.C., *Nutrients*, **11**, 25–33 (2019).
- [213] Kunal, A., Mamtani, K., Prebiotics Market Statistics Report 2026 | Growth Forecasts, 2021.
- [214] Macfarlane, S., Macfarlane, G.T., Cummings, J.H., *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **24**, 701–14 (2006).
- [215] Macfarlane, G.T., Steed, H., Macfarlane, S., *J. Appl. Microbiol.*, **104**, 305–44 (2008).
- [216] Pineiro, M., Asp, N.G., Reid, G., Macfarlane, S., Morelli, L., Brunser, J.O., Tuohy, K., *J Clin Gastroenterol*, **42**, 156–9 (2008).
- [217] Stoyanova, S., Geuns, J., Hideg, É., Van Den Ende, W., *Int. J. Food Sci. Nutr.*, **62**, 207–14 (2011).
- [218] Madhu, A.N., Amrutha, N., Prapulla, S.G., *Probiotics Antimicrob. Proteins*, **4**, 90–7 (2012).
- [219] Mesa, M.D., Silván, J.M., Olza, J., Gil, Á., del Castillo, M.D., *Food Res. Int.*, **41**, 606–15 (2008).
- [220] Manosroi, J., Khositsuntiwong, N., Manosroi, A., *J. Food Sci. Technol.*, **51**, 341–6 (2011).
- [221] Picazo, B., Flores-Gallegos, A.C., Ilina, A., Rodríguez-Jasso, R.M., Aguilar, C.N., *Front. Nutr.*, **6**, 1–8 (2019).
- [222] Pereira, E., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R., *Antioxidants*, **2**, 52–61 (2013).
- [223] Mader, E.A., Davidson, E.R., Mayer, J.M., *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 5153–66 (2007).
- [224] Schaich, K.M., Tian, X., Xie, J., *J. Funct. Foods*, **18**, 782–96 (2015).
- [225] Urbaniak, A., Molski, M., Szelać, M., *Comput. Methods Sci. Tech.* **18**, 1–12 (2012).
- [226] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., *LWT - Food Sci. Technol.*, **28**, 25–30 (1995).
- [227] Sanchez-Moreno, C., Larrauri, A.J., Saura-Calixto, F., *J Sci Food Agric*, **76**, 270–6 (1998).
- [228] Rufino, M. do S.M., Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Alves, R.E., de Brito, E.S., Oliveira, M.S.P., Saura-Calixto, F., *Food Res. Int.*, **44**, 2100–6 (2011).
- [229] Moon, J., Shibamoto, T., *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 1655–66 (2009).

- [230] Becker, M.M., Nunes, G.S., Ribeiro, D.B., Silva, F.E.P.S., Catanante, G., Marty, J., *J. Braz. Chem. Soc.*, **30**, 1108–14 (2019).
- [231] Day, J.P., Shattock, R.C., *Eur. J. Plant Pathol.*, **103**, 379–91 (1997).
- [232] Staden, R., Beal, K.F., Bonfield, J.K., *Methods Mol. Biol.*, **132**, 115–30 (2000).
- [233] Grujić, M., Dojnov, B., Potočnik, I., Atanasova, L., Duduk, B., Srebotnik, E., Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P., Vujčić, Z., *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 194 (2019).
- [234] Bernfeld, P., U: Methods in enzymology, Amylases, α and β , editor: De Murray, P., I. Deutcher Acad. Press INC, San Diego, 149–158 (1955).
- [235] Singh, S.K., Sczakas, G., Soccol, C.R., Pandey, A., u: Current Developments in Solid-state Fermentation, Springer New York, pp.183–204 (2008).
- [236] Massi, F.P., Sartori, D., de Souza Ferranti, L., Iamanaka, B.T., Taniwaki, M.H., Vieira, M.L.C., Fungaro, M.H.P., *Int. J. Food Microbiol.*, **221**, 19–28 (2016).
- [237] Gherbawy, Y., Elhariry, H., Kocsubé, S., Bahobial, A., Deeb, B. El., Altalhi, A., Varga, J., Vágvolgyi, C., *Foodborne Pathog. Dis.*, **12**, 414–23 (2015).
- [238] Qi, T.F., Renaud, J.B., McDowell, T., Seifert, K.A., Yeung, K.K.C., Sumarah, M.W., *J. Agric. Food Chem.*, **64**, 1583–9 (2016).
- [239] Woloshuk, C.P., Shim, W.B., *FEMS Microbiol. Rev.*, **37**, 94–109 (2013).
- [240] Gil-Serna, J., Vázquez, C., Patiño, B., *Int. Microbiol.*, **23**, 89–96 (2020).
- [241] Sun, L., Chen, X., Gao, J., Zhao, Y., Liu, L., Hou, Y., Wang, L., Huang, S., *Toxins*, **11**, 327 (2019).
- [242] Al-Dabbagh, Y.N., Mahmood, W.A., *Zanco J. Pure Appl. Sci.*, **27**, 1–8 (2015).
- [243] Margetić, A., Stojanović, S., Ristović, M., Vujčić, Z., Dojnov, B., *LWT*, **145**, 111291 (2021).
- [244] Badhan, A.K., Chadha, B.S., Kaur, J., Saini, H.S., Bhat, M.K., *Bioresour. Technol.*, **98**, 504–10 (2007).
- [245] Ma, J., Li, Q., Tan, H., Jiang, H., Li, K., Zhang, L., Shi, Q., Yin, H., *J. Biol. Eng.*, **13**, 81 (2019).
- [246] Fernandez, C.R., Maresma, B.G., Juarez, A., Martinez, J., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **79**, 268–72 (2004).
- [247] Mao, S., Liu, Y., Yang, J., Ma, X., Zeng, F., Zhang, Z., Wang, S., Han, H., Qin, H.M., Lu, F., *RSC Adv.*, **9**, 23856–63 (2019).
- [248] Santos-Sánchez, F.N., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., Hernández-Carlos, B., u: Antioxidants, editor: Emad, S., Tomasz, B., IntechOpen, pp.1–28 (2019).
- [249] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., *Free Radic. Biol. Med.*, **26**, 1231–7 (1999).
- [250] Prior, R.L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., Jacob, R., *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 3273–9 (2003).
- [251] Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Hawkins Byrne, D., *J. Food Compos. Anal.*, **19**, 669–75 (2006).
- [252] Bogdanović, J., Mojović, M., Milosavić, N., Mitrović, A., Vučinić, Ž., Spasojević, I., *Eur. Biophys. J.*, **37**, 1241–6 (2008).
- [253] Pejtin, B., Savic, A.G., Petkovic, M., Radotic, K., Mojovic, M., *Int. J. Food Sci. Technol.*, **49**, 1500–5 (2014).
- [254] Tian, K., Wang, J., Zhang, Z., Cheng, L., Jin, P., Singh, S., Prior, B.A., Wang, Z.X., *Electron. J. Biotechnol.*, **40**, 71–7 (2019).
- [255] Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M.A., Barrell, B., *Bioinformatics*, **16**, 944–5 (2000).
- [256] Hong, S.B., Go, S.J., Shin, H.D., Frisvad, J.C., Samson, R.A., *Mycologia*, **97**, 1316–29 (2005).
- [257] Megazyme, S-AZFRX01 11/17, (2017).

Биографија

Сања Стојановић је рођена 10. априла 1991. године у Врању, Република Србија. Основне студије на смеру Дипломирани биохемичар, Хемијски факултет, Универзитет у Београду завршила је 2014. године одбраном дипломског рада под темом „Развијање брзог теста за проналажење произвођача инулиназе и пектиназе из гљива сојева *Aspergillus* sp.“. Мастер студије на смеру Дипломирани биохемичар, Хемијски факултет, Универзитет у Београду је завршила 2015. године радом под називом „Третирање нерастворних дијететских влакана тритикалеа ензимским комплексима“.

Од 2014. године је ангажована као сарадник у настави на предметима: Хемија природних производа (за студенте друге године основних студија), Експериментална биохемија (за студенте треће године основних студија), Биотехнологија у животној средини и Загађивачи хране (за студенте четврте године основних студија) на Катедри за биохемију, Хемијског факултета Универзитета у Београду.

Од октобра 2016. године запослена је као истраживач приправник Центра за хемију, Института за хемију, технологију и металургију, Универзитет у Београду, где је 2019. изабрана у звању истраживач сарадник .

У периоду од 2016. до 2019. године била је ангажована на пројекту који је финансиран од стране Министарства за науку и технолошки развој под бројем ОИ 172048 („Производња, изоловање и карактеризација ензима у растворном и имобилизованом облику у биотехнологији хране, биогоривима и заштити животне средине“). Била је ангажована на међународном пројекту „Производња и примена α -амилаза из сојева *Bacillus* из земље – ЦРП ИЦГЕБ – истраживачки пројекат” („Production and application of α -amylase from soil *Bacillus* strains, CRP/YUG11-02, ICGEB Research project“). Од 2018. до 2021. године била је ангажована на билатералном научном пројекту између Републике Србије и Републике Аустрије „Производња, побољшање, карактеризација и употреба ензимских комплекса гљива у добијању дијететских влакана из житарица”, финансираним од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја и OeAD - „Agency for Education and Internationalization” из Аустрије, под бројем 451-03-02141/2017-09/20.

Области научног интересовања су производња ензима и ензимских комплекса филаментозних гљива, пречишћавање и карактеризација појединачних ензима; оптимизација употребе добијених ензима за производњу производа додате вредности – дијететских влакана и олигосахарида пребиотских активности као и њихова карактеризација; идентификација филаментозних гљива. Поред тога бави се и генетском модификацијом појединачних сојева гљива у циљу побољшања производње ензима од интереса.

У току израде докторске дисертације део својих истраживања остварује кроз активну сарадњу са Институтом за пестициде и заштиту животне средине у Београду.

У току докторских студија се усавршавала на Институту за хемијско, еколошко и биолошко инжењерство, Техничког Универзитета у Бечу, Аустрија кроз боравке преко билатералног пројекта и Ерасмус+ мобилности.

До сада је објавила 4 научна рада у часописима међународног значаја, од тога 2 рада у међународном часопису изузетних вредности (M21a) и 2 рада у врхунском међународном часопису (M21); пет саопштења са међународног скупа штампано у изводу (M34) и четири саопштења са скупа националног значаја штампано у изводу (M64).

Члан је Српског хемијског друштва, Биохемијског друштва Србије, Федерације европских биохемијских друштава (FEBS) и Европског биотехнолошког друштва (EFB), Удружења микробиолога Србије и Федерације европских микробиолошких друштава (FEMS).

Сања Стојановић је учествовала у пројекту „Школица сапуна“ где се на специфичан начин промовише хемија као наука свакодневног живота и обучавају људи из земље, али и окружења да праве домаће сапуне.

Библиографија

Списак објављених и саопштених радова проистеклих из дисертације

Рад у међународном часопису изузетних вредности (M21a)

1. **Stojanović, S.**, Ristović, M., Stepanović, J., Margetić, A., Duduk, B., Vujčić, Z., Dojnov, B. *Aspergillus welwitschiae* inulinase enzyme cocktails obtained on agro-material inducers for the purpose of fructooligosaccharides production, *Food Research International* 160, 111755 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111755>

Рад у врхунском међународном часопису (M21)

1. **Stojanović, S.**, Stepanović, J., Špirović Trifunović, B., Duduk, N., Dojnov, B., Duduk, B., Vujčić, Z. Selection of non-mycotoxigenic inulinase producers in the group of black *Aspergilli* for use in food processing. *Food Technology and Biotechnology* 60 (4) (2022). <https://doi.org/10.17113/ftb.60.04.22.7521>

Саопштења са међународног скупа штампано у изводу (M34):

1. **Stojanović S.**, Stepanović J., Margetić A., Duduk N., Dojnov B., Duduk B., Vujčić Z. "Production of fructooligosaccharides by *Aspergillus welwitschiae* inulinase enzyme complex, obtained on natural substrate". XXI EuroFoodChem Conference (2021), p. 172, ISBN 978-989-8124-34-0

Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу (M64):

1. **Stojanović, S.**, Stepanović, J., Ristović, M., Dojnov, B., Božić, N., Duduk, B., Vujčić, Z.; "Exoinulinase gene expression in *Aspergillus welwitschiae* FAW1 induced by different carbon source". XI Konferencija Biohemijskog društva Srbije (2022), p. 140, ISBN 978-86-7220-124-6 (FOC).
2. **Stojanović, S.**, Vujčić, Z., Dojnov, B. "Sinteza fruktooligosaharida specifičnom inulinazom iz *Aspergillus awamori*". Četvrta konferencija Mladih hemičara Srbije, Srpsko Hemijsko društvo (2016), p.65, ISBN 978-86-7132-064-1

Рад у међународном часопису изузетних вредности (M21a)

1. Miočinović, J., Tomić, N., Dojnov, B., Tomašević, I., Stojanović, S., Djekic, I., Vujčić, Z. Application of new insoluble dietary fibers from triticale as supplement in yoghurt - effects on physicochemical, rheological and quality properties, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, (2018); 98: 1291–1299 doi: 0.1002/jsfa.8592

Рад у врхунском међународном часопису (M21)

1. Margetić, A., **Stojanović, S.**, Ristović, M., Vujčić, Z., Dojnov, B. Fungal oxidative and hydrolyzing enzymes as designers in the biological production of dietary fibers from triticale, *LWT - Food Science and Technology* 145 (2021) 111291 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111291>

Саопштења са међународног скупа штампано у изводу (M34):

1. **Stojanović S.**, Ristović M., Margetić A., Vujčić Z., Dojnov B. "In situ production of xylooligosaccharides by *Aspergillus tubingensis* from corn cob". 2nd UNIFood International Conference –UNIFood2021 (2021), p. 155, ISBN 978-86-7522-066-4
2. Ristovic, M., **Stojanovic, S.**, Sokarda Slavic, M., Margetic, A., Bozic, N., Vujcic, Z., Dojnov, B. "Corn cob agro-waste as valuable material for XOS production by fungal enzymes". *Biotechnology for a circular bioeconomy* (2023), p. 67.
3. Margetic, A., Šokarda Slavic, M., Ristovic, M., **Stojanovic, S.**, Pavlovic, M., Vujcic, Z. "Reusing biomass in textile dyes removing from wastewater". *Biotechnology for a circular bioeconomy* (2023), p. 62.
4. Šokarda Slavić, M., Margetić, A., Ristović, M., Pavlović, M., **Stojanović, S.**, Drulović, N., Vujčić, Z. "Screening of *Bacillus* sp. protease for hydrolysis of gelatine extracted from fish waste and potential applications for waste valorisation". *Biotechnology for a circular bioeconomy* (2023), p. 66.

Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу (M64):

1. Ristović M., **Stojanović S.**, Margetić A., Vujčić Z., Dojnov B. "Diffusion screening method for estimation potential fungal producers of xylanase responsible for xylooligosaccharides production". X Konferencija Biohemijskog društva Srbije (2021), p.138-139, ISBN 978-86-7220-108-6 (FOC)
2. Pavlović M., **Stojanović S.**, Dojnov B., Božić N., Vujčić Z., Margetić A. "Highly active pectinases from newly isolated *Aspergillus tubingensis* strain". X Konferencija Biohemijskog društva Srbije (2021), p.124-125, ISBN 978-86-7220-108-6 (FOC)

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Сања Н. Стојановић

Број индекса ДБ04/2015

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**„Продукција и карактеризација ензима инулиназа *Aspergillus* spp. за добијање
фруктоолигосахарида“**

- 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, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Сања Н. Стојановић

Број индекса: ДБ04/2015

Студијски програм: Доктор биохемијских наука

Наслов рада:

„Производња и карактеризација ензима инулиназа *Aspergillus* spp. за добијање фруктоолигосахарида“

Ментори:

др Зоран Вујчић, редовни професор Хемијског факултета, Универзитета у Београду

др Биљана Дојнов, виши научни сарадник Института за хемију, технологију и металургију, Универзитета у Београду

Потпис: _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања 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, _____

Изјава о коришћењу

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

**„Производња и карактеризација ензима инулиназа *Aspergillus spp.*
за добијање фруктоолигосахарида“**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала 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 одлучила.

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

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

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваће 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.** Дозвољаваће 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.** Дозвољаваће 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.** Дозвољаваће 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.** Дозвољаваће 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.** Дозвољаваће 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.