

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET



Jovana R. STEFANOVIĆ KOJIĆ

**SINTEZA, STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA  
I BIOLOŠKA AKTIVNOST  
FUNKCIONALIZOVANIH DERIVATA  
POLISAHARIDA GUMIARABIKE,  
PULULANA I LEVANA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY



Jovana R. STEFANOVIĆ KOJIĆ

**SYNTHESIS, STRUCTURAL CHARACTERIZATION  
AND BIOLOGICAL ACTIVITY  
OF FUNCTIONALIZED DERIVATIVES OF  
GUM ARABIC, PULLULAN AND LEVAN  
POLYSACCHARIDES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015.

## **MENTORI:**

**Dr Miroslav M. VRVIĆ, redovni profesor**

Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu

**Dr Dragica M. JAKOVLJEVIĆ, naučni savetnik**

Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju – Centar za hemiju, Univerzitet u Beogradu

## **ČLANOVI KOMISIJE:**

**Dr Ljuba M. MANDIĆ, redovni profesor**

Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu

**Dr Gordana Đ. GOJGIĆ – CVIJOVIĆ, naučni savetnik**

Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju – Centar za hemiju, Univerzitet u Beogradu

**Dr Vladimir P. BEŠKOSKI, docent**

Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane doktorske disertacije:

Datum promocije doktorske disertacije:

## ZAHVALNICA

*Ova doktorska disertacija je urađena u laboratorijama Grupe za mikrobiološku hemiju Katedre za biohemiju Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i Centra za hemiju Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju u Beogradu.*

*Za temu za rad i ogromno interesovanje za oblast hemije polisaharida i mikrobiologije zaslužan je profesor dr Miroslav M. Vrvic, na čemu mu se iskreno zahvaljujem. Svom Učitelju zahvalna sam i na velikodušnoj pomoći tokom izrade i pisanja ovog rada, kao i na podršci i poverenju tokom svih godina saradnje.*

*Izradom eksperimentalnog dela doktorske disertacije neposredno je rukovodila dr Dragica Jakovljević, kojoj dugujem neizmernu zahvalnost za stečena praktična znanja iz hemije polisaharida, kao i hemije uopšte. Svojoj Mentorki se zahvaljujem i na razumevanju i pomoći u svim fazama svoga rada, kao i na strpljenju i dragocnim savetima tokom pisanja ove teze.*

*Posebnu zahvalnost dugujem dr Gordani Gojgić – Cvijović, neiscrpnom izvoru znanja iz oblasti hemije i mikrobiologije, zbog pomoći tokom izrade eksperimenata i brojnih korisnih sugestija tokom pisanja ovog rada. Zahvaljujem se svojoj Profesorki na nesebičnom podučavanju i podršci tokom školovanja i izrade disertacije.*

*Profesorki dr Ljubi Mandić i docentu dr Vladimiru Beškoskom se zahvaljujem na vremenu koje su posvetili čitanju ove disertacije, kao i na korisnim savetima koji su izgledu ove teze dali poseban pečat.*

*Kolegi dr Srđanu Miletiću neizmerno sam zahvalna na nesebičnoj pomoći tokom pisanja teze, na optimizmu i podršci.*

*Svojim kolegincama, dr Snežani Spasić, dr Mili Ilić i dr Jeleni Milić, posebno se zahvaljujem na podršci i praktičnim savetima tokom pisanja ovog rada.*

*Kolegincama, dr Jeleni Avdalović, dr Nikoleti Lugonji, dr Mileni Rikalović, dr Marijani Marković i kolegi Branku Drakuliću sam veoma zahvalna na iskrenim podsticajima tokom*

*pisanja doktorske teze, kao i na znanju i iskustvima koje su delili sa mnom tokom godina zajedničkog rada i prijateljstva.*

*Zaposlenima u Centru za instrumentalnu analizu Hemijskog fakulteta i Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, posebno kolegama dr Nini Todorović i Dejanu Vučetiću, iskreno se zahvaljujem na snimljenim spektrima i urađenim elementalnim mikroanalizama.*

*Svojim roditeljima, Ratki i Radomiru, svojoj sestri Ivani i zetu Vladimiru dugujem zahvalnost za sve što jesam, za neizmernu pomoć i podršku, za veru u moj rad, za strpljenje, ljubav i toleranciju.*

*Svojoj ćerki Nađi i supргу Dejanu, koji svaki moj dan ispunjavaju radošću i smehom, dugujem beskrajnu zahvalnost na strpljenju i razumevanju za ukradeno vreme poklonjeno pisanju ove teze. Bez njihove ljubavi, optimizma i podrške, sav moj trud ne bi imao smisao.*

*Beograd, novembar 2015. godine*

*Jovana Stefanović Kojić*

**Sinteza, strukturna karakterizacija i biološka aktivnost  
funkcionalizovanih derivata polisaharida  
gumiarabike, pululana i levana**

**IZVOD**

U okviru ove doktorske disertacije urađena je hemijska derivatizacija polisaharida biljnog i mikrobnog porekla u cilju dobijanja novih funkcionalizovanih polimera. Polisaharidi gumiarabika, pululan i levan korišćeni su za sintezu dve grupe konjugata.

U prvom delu ovog rada rađene su oksidativne transformacije polisaharida sa ciljem povećanja njihove reaktivnosti. Tretiranjem polisaharida natrijum-perjodatnim reagensom u vodenom rastvoru uvedene su reaktivne aldehidne grupe u polimerni niz glikana. Perjodatnom oksidacijom gumiarabike i pululana u kontrolisanim uslovima dobijeni su polialdehidni derivati, a variranjem koncentracija polisaharida i oksidacionog sredstva, kao i reakcionog vremena, dobijeni su uzorci različitog stepena oksidacije. Kuplovanjem ovako dobijenih polialdehida gumiarabike i pululana sa polienskim antibioticima u adekvatnim reakcionim uslovima sintetisane su hemijske formulacije nistatina i amfotericina B, sa ciljem povećanja rastvorljivosti ovih antibiotika u vodi. Ispitivanjem antifungalne aktivnosti sintetisanih konjugata dokazano je zadržavanje antimikrobne aktivnosti kuplovanih antibiotika.

U drugom delu ovog rada rađena je hemijska derivatizacija polisaharida pululana i levana kuplovanjem molekula reaktivne antrahinonske boje Remazol Brilliant Blue R za polisaharidne nizove, u baznim uslovima. Sintetisani proizvodi su upotrebljeni kao hromogeni supstrati za određivanje aktivnosti enzima koji selektivno hidrolizuju glikozidne veze karakteristične za ciljne polisaharide, kao i za „screening” mikroorganizama na određenu enzimsku aktivnost direktnom selekcijom na agarnim podlogama.

Sintetisani funkcionalizovani polisaharidi su okarakterisani instrumentalnim metodama strukturne analize (UV-Vis, FT-IR, NMR spektroskopijom), kao i tankoslojnom hromatografijom i elementalnom organskom mikroanalizom. Ovim metodama dokazana je retencija strukture aktivnih supstanci, što predstavlja preduslov za njihovu biološku aktivnost. Ispitana je i dokazana stabilnost dobijenih konjugata u uslovima koji su neophodni za njihovu primenu, kao i stabilnost u primenjenom temperaturnom režimu termogravimetrijskom i diferencijalnom termičkom analizom.

Osnovni cilj ove disertacije, sinteza formulacija kojima se prevazilaze problemi vezani za malu rastvorljivost polienskih antibiotika u vodi i dobijanje hromogenih medijuma za rast mikroorganizama koji se testiraju na prisustvo određene enzimske aktivnosti, ostvaren je takođe i serijom mikrobioloških ispitivanja.

***Ključne reči:*** *polisaharidi, polienski antibiotici, antrahinonska boja, perjodatna oksidacija, konjugati, hromogeni enzimski supstrati*

Naučna oblast: Prirodno – matematičke nauke

Uža naučna oblast: Biohemija

UDK broj: 577.114

**Synthesis, Structural Characterization and Biological Activity  
of Functionalized Derivatives of  
Gum Arabic, Pullulan and Levan Polysaccharides**

**ABSTRACT**

Within the scope of this Doctoral Dissertation the chemical derivatization of polysaccharides of plant and microbial origin was done for the purpose of getting new functionalized polymers. Polysaccharides gum Arabic, pullulan and levan were used for the synthesis of two groups of conjugates.

The first section of this paper deals with the oxidative transformation of the polysaccharides aiming to increase their reactivity. By treating the polysaccharides with sodium periodate reagent in aqueous solution the reactive aldehyde groups are introduced into the polymer chain of glycan. Periodate oxidation of gum Arabic and pullulan under the controlled conditions resulted in formation of polyaldehyde derivatives, and with the varying concentrations of polysaccharides and oxidizing agent as well as the reaction rate, samples with various levels of oxidation were obtained. By coupling gum Arabic and pullulan polyaldehyde, formed in such way, with polyene antibiotics under the adequate reaction conditions, chemical formulations of nystatin and amphotericin B have been synthesized, with the purpose of increasing solubility of these antibiotics in water. The investigation of antifungal activities of the synthesized conjugate has proved that the antimicrobial activity of the coupled antibiotics has been preserved.

The second section of this paper describes the chemical derivatization of pullulan and levan polysaccharides by coupling molecules of the reactive Remazol Brilliant Blue R anthraquinone dye to polysaccharide chains, under base conditions. Synthesized products were used as chromogenic substrates for the determination of the enzyme activity that selectively hydrolyze glycosidic linkages which are typical for the target



polysaccharides, as well as for the screening of microorganisms for the specific enzyme activity through direct selection in agar substrates.

Functionalized polysaccharides were characterized by instrumental methods of the structural analysis (UV-Vis, FT-IR, NMR spectroscopy), as well as by thin-layer chromatography and the elemental organic microanalysis. These methods have proved the retention of the structure of the active substances which is a prerequisite for their biological activity. The stability of the obtained conjugates have been tested and proven under the conditions that are necessary for their application, as well as the stability in the applied temperature regime by the thermogravimetric and differential thermal analysis.

The main goal of this dissertation, that is the synthesis of formulations by which problems with poor solubility of the polyene antibiotics in water may be overcome and obtaining chromogenic media for the growth of microorganisms that are being tested for the presence of a specific enzyme activity, has also been achieved through a series of microbiological investigations.

**Key words:** *polysaccharides, polyene antibiotics, anthraquinone dye, periodate oxidation, conjugates, chromogenic enzyme substrates*

Scientific field: Natural and Mathematical Sciences

Specific scientific field: Biochemistry

UDK No.: 577.114

## **SPISAK SKRAĆENICA**

AmB – amfotericin B

Araf – arabinofuranoza

Arap – arabinopiranoza

ATP – adenzin-trifosfat

DMSO – dimetil-sulfoksid

EPS – egzopolisaharid

FAO/WHO/JECFA – Organizacija za hranu i poljoprivredu OUN / Svetska zdravstvena organizacija / Zajednički ekspertski komitet za aditive u hrani (eng. Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization / Joint Expert Committee for Food Additives)

Galp – galaktopiranoza

GDP – guanozin-difosfat

Glc – glukoza

GlcA – glukopiranuronska kiselina

HPMA – N-(2-hidroksipropil)-metakrilamid

Lph – lipid-hidroperoksid

LPS – lipopolisaharid

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

Nys – nistatin

PBS – fosfatni pufer (eng. phosphate buffer saline)

PEG – polietilen-glikol

PKS – poliketid-sintaza

PL – polilaktid

PLGA – poli(D,L-laktid-ko-glikolid)

RBBR – Remazol Brilliant Blue R

Rhap – ramnospiranoza

TGA/DTA – termogravimetrijska / diferencijalna termička analiza (eng. thermogravimetric analysis / differential thermal analysis)

TRIS-HCl – *tris*-(hidroksimetil)-aminometan-hlorovodonična kiselina

UA – uronska kiselina

UDPG – uridin-difosfat-glukoza

**SADRŽAJ**

1. Uvod.....	1
2. Pregled literature .....	4
2.1. Polisaharidi.....	5
2.2. Polisaharidi biljaka.....	6
2.2.1. Rezervni polisaharidi biljaka.....	6
2.2.2. Strukturni polisaharidi ćelijskog zida biljaka .....	9
2.2.3. Biljni eksudati.....	12
2.2.4. Gumiarabika .....	14
2.2.4.1. Struktura gumiarabike .....	14
2.2.4.2. Osobine gumiarabike.....	17
2.2.4.3. Primena gumiarabike.....	18
2.3. Polisaharidi mikroorganizama.....	20
2.3.1. Citosolni polisaharidi mikroorganizama .....	22
2.3.2. Strukturni polisaharidi ćelijskog zida mikroorganizama.....	24
2.3.3. Egzopolisaharidi .....	28
2.3.4. Pululan.....	35
2.3.4.1. Osobine pululana.....	35
2.3.4.2. Mikrobiološki izvor pululana.....	36
2.3.4.3. Produkcija pululana.....	38
2.3.4.4. Mehanizam biosinteze pululana.....	40
2.3.4.5. Struktura pululana .....	41
2.3.4.6. Hemijske modifikacije pululana.....	42
2.3.4.7. Primena pululana.....	42
2.3.5. Levan .....	45
2.3.5.1. Osobine levana .....	45
2.3.5.2. Mikrobiološki izvor levana .....	46
2.3.5.3. Produkcija levana .....	48
2.3.5.4. Mehanizam biosinteze levana .....	49
2.3.5.5. Struktura levana.....	50
2.3.5.6. Primena levana .....	51
2.4. Antibiotici.....	53

2.4.1.	Polienski antibiotici .....	57
2.4.1.1.	Struktura polienskih antibiotika .....	58
2.4.1.2.	Biološka aktivnost polienskih antibiotika .....	59
2.4.1.3.	Rezistencija mikroorganizama na polienske antibiotike.....	60
2.4.1.4.	Neželjeni efekti terapije polienskim antibioticima.....	61
2.4.2.	Amfotericin B .....	62
2.4.2.1.	Biosinteza, genetika, molekularni inženjering amfotericina B .....	62
2.4.2.2.	Struktura amfotericina B .....	63
2.4.2.3.	Osobine amfotericina B.....	64
2.4.2.4.	Farmakološke karakteristike amfotericina B.....	66
2.4.3.	Nistatin .....	67
2.4.3.1.	Biosinteza nistatina .....	67
2.4.3.2.	Struktura nistatina .....	68
2.4.3.3.	Farmakološke karakteristike nistatina.....	69
2.4.4.	Formulacije antibiotika.....	69
2.4.4.1.	Koloidne disperzije i emulzije.....	70
2.4.4.2.	Lipozomi .....	71
2.4.4.3.	Kohelati .....	73
2.4.4.4.	Polimerne nano- i mikročestice.....	73
2.4.4.5.	Nanočestice .....	74
2.4.4.6.	Nanosuspenzije.....	75
2.4.4.7.	Čvrste lipidne nanočestice.....	75
2.4.4.8.	Ciklodekstrini .....	76
2.4.4.9.	Konjugacija antibiotika sa polimerima rastvornim u vodi .....	76
2.5.	Boje .....	78
2.5.1.	Prirodne boje .....	79
2.5.2.	Sintetičke boje .....	79
2.5.2.1.	Antrahinonske boje .....	81
2.5.2.2.	Remazol Brilliant Blue R .....	81
2.6.	Hromogeni enzimski supstrati.....	82

3. Materijal i metode .....	84
3.1. Materijali koji su korišćeni za sintezu funkcionalizovanih derivata polisaharida .....	85
3.2. Perjodatna oksidacija polisaharida .....	85
3.2.1. Perjodatna oksidacija gumiarabike .....	86
3.2.2. Perjodatna oksidacija pululana .....	86
3.2.3. Određivanje procenta oksidacije polisaharida jodometrijskom titracijom .....	87
3.2.4. Određivanje sadržaja aldehidnih grupa hidroksilamin- hidrohloridnim metodom .....	88
3.2.5. Dijaliza i liofilizacija .....	89
3.3. Sinteza konjugata oksidovanih polisaharida gumiarabike i pululana sa antibioticima amfotericinom B i nistatinom .....	90
3.3.1. Sinteza konjugata oksidovane gumiarabike i pululana sa amfotericinom B .....	90
3.3.2. Sinteza konjugata oksidovane gumiarabike i pululana sa nistatinom .....	91
3.3.3. Dijaliza i liofilizacija .....	92
3.3.4. Strukturna karakterizacija konjugata polisaharida sa antibioticima .....	92
3.3.5. Određivanje stabilnosti konjugata gumiarabike i nistatina .....	94
3.3.6. Kontrolisano oslobađanje antibiotika iz konjugata pululana i nistatina ...	94
3.3.7. Određivanje antifungalne aktivnosti konjugata polisaharida sa antibioticima .....	95
3.3.7.1. Pripremanje podloge za <i>Candida albicans</i> .....	95
3.3.7.2. Antibiogram test .....	96
3.4. Sinteza konjugata pululana i levana sa antrahinonskom bojom Remazol Brilliant Blue R .....	96
3.4.1. Dijaliza i liofilizacija .....	97
3.4.2. Strukturna karakterizacija konjugata pululana i levana sa bojom Remazol Brilliant Blue R .....	97
3.4.3. Određivanje stabilnosti konjugata pululana sa bojom Remazol Brilliant Blue R .....	98

3.4.4.	Ispitivanje pululanazne aktivnosti upotrebom konjugata pululana sa RBBR kao hromogenih supstrata .....	99
4.	Rezultati i diskusija .....	101
4.1.	Polisaharidi upotrebljeni za sintezu konjugata .....	102
4.2.	Perjodatna oksidacija polisaharida .....	104
4.2.1.	Perjodatna oksidacija gumiarabike .....	105
4.2.2.	Perjodatna oksidacija pululana .....	106
4.3.	Sinteza konjugata polisaharida sa antibioticima .....	107
4.4.	UV-Vis spektroskopska karakterizacija konjugata gumiarabike i pululana sa nistatinom i amfotericinom B .....	109
4.5.	FT-IR spektroskopska karakterizacija konjugata gumiarabike i pululana sa nistatinom i amfotericinom B .....	113
4.5.1.	FT-IR spektroskopska karakterizacija konjugata gumiarabike sa antibioticima .....	113
4.5.2.	FT-IR spektroskopska karakterizacija konjugata pululana sa antibioticima .....	117
4.6.	<sup>1</sup> H NMR spektroskopska karakterizacija konjugata gumiarabike i pululana sa nistatinom i amfotericinom B .....	119
4.7.	Ispitivanje termalne stabilnosti konjugata gumiarabike i pululana sa nistatinom i amfotericinom B .....	126
4.7.1.	Ispitivanje termalne stabilnosti konjugata gumiarabike sa nistatinom ...	126
4.7.2.	Ispitivanje termalne stabilnosti konjugata pululana sa amfotericinom B .....	129
4.8.	Tankoslojna hromatografija konjugata gumiarabike i pululana sa nistatinom i amfotericinom B .....	131
4.9.	Stabilnost konjugata gumiarabike i nistatina .....	132
4.10.	Kontrolisano oslobađanje antibiotika iz konjugata pululana i nistatina .....	134
4.11.	Antifungalna aktivnost konjugata gumiarabike i pululana sa nistatinom i amfotericinom B .....	136
4.12.	Sinteza konjugata pululana i levana sa antrahinonskom bojom Remazol Brilliant Blue R .....	138

4.13. UV-Vis spektroskopska karakterizacija konjugata pululana i levana sa bojom Remazol Brilliant Blue R .....	139
4.14. FT-IR spektroskopska karakterizacija konjugata pululana i levana sa bojom Remazol Brilliant Blue R .....	140
4.15. <sup>1</sup> H NMR spektroskopija konjugata pululana i levana sa bojom Remazol Brilliant Blue R .....	143
4.16. Elementalna organska mikroanaliza konjugata pululana i levana sa bojom Remazol Brilliant Blue R .....	145
4.17. Termalna stabilnost konjugata pululana i boje Remazol Brilliant Blue R .....	146
4.18. Tankoslojna hromatografija konjugata pululana i boje Remazol Brilliant Blue R.....	148
4.19. Stabilnost konjugata pululana i levana sa bojom Remazol Brilliant Blue R.....	149
4.20. Ispitivanje pululanazne aktivnosti upotrebom konjugata pululana sa RBBR kao hromogenog supstrata .....	151
5. Zaključci .....	154
6. Literatura .....	158



## **1. Uvod**

---

Posljednjih godina se intenzivno razvijaju sistemi za ciljanu dostavu lekova (eng. drug delivery systems). Za realizaciju ovih novih farmakoloških pristupa primenjuju se tehnologije kojima se poboljšavaju efikasnost i bezbednost upotrebe određenih lekova, među njima i antibiotika, i kojima se kontrolišu njihove farmakokinetičke osobine: apsorpcija, distribucija, metabolizam i ekskrecija. Fizičke modifikacije, kao što su pravljenje koloidnih disperzija i emulzija i brojnih lipidnih formulacija, menjaju fizičko – hemijske parametre, efikasnost i toksičnost pojedinih antibiotika. Međutim, prednosti ovako dobijenih preparata ne prevazilaze uvek probleme skupe proizvodnje, zbog čega je potraga za optimalnim formulacijama antibiotika i dalje veoma aktuelna.

Konjugacijom niskomolekulskih antibiotika sa polimerima rastvornim u vodi mogu se prevazići problemi, kao što je niska rastvorljivost u vodi, nestabilnost i loša tkivna distribucija, kao i klirens ovih molekula. Međutim, većina polimera koji se upotrebljavaju u ovakvim modifikacijama su sintetički, imunogeni i nisu biodegradabilni, što ih čini lošim kandidatima za sintezu preparata koji bi mogli uspešno da se primenjuju u kliničkoj praksi.

Jedan od ciljeva ove disertacije je bila sinteza hemijskih formulacija polienskih antibiotika sa polisaharidima koji su rastvorni u vodi, biodegradabilni, neimunogeni, nekancerogeni i netoksični, što su osobine koje ih čine vrlo pogodnim za pripremu biokompatibilnih nosača lekova koji su nerastvorni u fiziološkim tečnostima.

Enzimski testovi u kojima se koriste hromogeni supstrati predstavljaju visoko specifične i osetljive postupke za određivanje aktivnosti ciljnih enzima. Upotrebom ovakvih supstrata omogućena je direktna selekcija mikroorganizama koji produkuju ispitivane enzime na Petri šoljama, kao i određivanje enzimske aktivnosti u preparatima različitog stepena čistoće. Opisane su brojne metode zasnovane na brzim, rutinskim postupcima za određivanje aktivnosti brojnih glikanaza, kao što su  $\alpha$ -amilaza,  $\beta$ -mananaza, celulaza, ksilanaza, dekstrinaza i druge.

U ovoj doktorskoj disertaciji cilj je bila sinteza i karakterizacija hromogenih polisaharidnih supstrata za ispitivanje aktivnosti pululanaza i levanaza, glikozidaza čija aktuelnost sve više raste.

Da bi se ostvarili ovi ciljevi, bilo je potrebno realizovati sledeće zadatke:

- Sintetisati reaktivne polialdehidne derivate polisaharida gumiarabike i pululana oksidacijom pomoću natrijum-perjodatnog reagensa u vodenoj fazi;
- Kuplovati parcijalno oksidovane polimere sa polienskim antibioticima nistatinom i amfotericinom B;
- Strukturno okarakterisati dobijene konjugate i odrediti njihovu stabilnost, oslobađanje aktivne supstance i biološku aktivnost;
- Sintetisati derivate polisaharida pululana i levana reakcijom konjugacije u baznim uslovima sa antrahinonskom bojom Remazol Brilliant Blue R;
- Strukturno okarakterisati dobijene hromogene derivate i dokazati njihovu stabilnost u uslovima neophodnim za njihovu primenu;
- Ispitati da li se sintetisani konjugati mogu upotrebiti kao hromogeni enzimski supstrati.

## **2. Pregled literature**

---

## 2.1. Polisaharidi

Polisaharidi predstavljaju posebnu klasu biopolimera koje sintetišu živi organizmi. Ovi makromolekuli imaju različite i u mnogim slučajevima kompleksne hemijske strukture, brojne fiziološke funkcije i širok spektar potencijalne primene.

Osnovu ugljenohidratne strukture polisaharida predstavljaju monosaharidne jedinice koje međusobno mogu biti povezane preko različitih položaja i orijentacija, što strukturnu hemiju polisaharida čini veoma složenom. Ovi molekuli mogu da se nađu i kovalentno vezani sa proteinima ili lipidima i, u obliku složenih glikokonjugata, čine biološki važna jedinjenja koja imaju različite funkcije.

Polisaharidi mogu da se sastoje od istih ili različitih monosaharidnih jedinica, na osnovu čega se razlikuju homo- i heteropolisaharidi. U zavisnosti od strukturnog uređenja monomernih jedinica, dele se na linearne i račvaste. Prema funkcionalnim grupama u njihovim molekulima, mogu se svrstati u anjonske, neutralne ili katjonske polisaharide. Prema izvorima iz kojih se dobijaju, dele se na polisaharide biljaka, životinja i mikroorganizama.

Polisaharidi se u industriji koriste kao zgušnjivači, stabilizatori i gelirajući agensi. Takođe, koriste se i kao agensi za uklanjanje zagađivača iz životne sredine, a zbog bioloških dejstava, kao što su antioksidativni, prebiotički ili antitumorski, interes za hemiju polisaharida svakodnevno raste (Donot et al., 2012; Liu et al., 2010a). Mogu se izolovati iz različitih izvora (bakterija, gljiva, algi i biljaka), mada su polisaharidi algi i viših biljaka dominantni na svetskom tržištu. Ovi biopolimeri se izoluju direktnom ekstrakcijom iz biomase i mogu se koristiti u nativnom obliku, kao i hemijski derivatizovani.

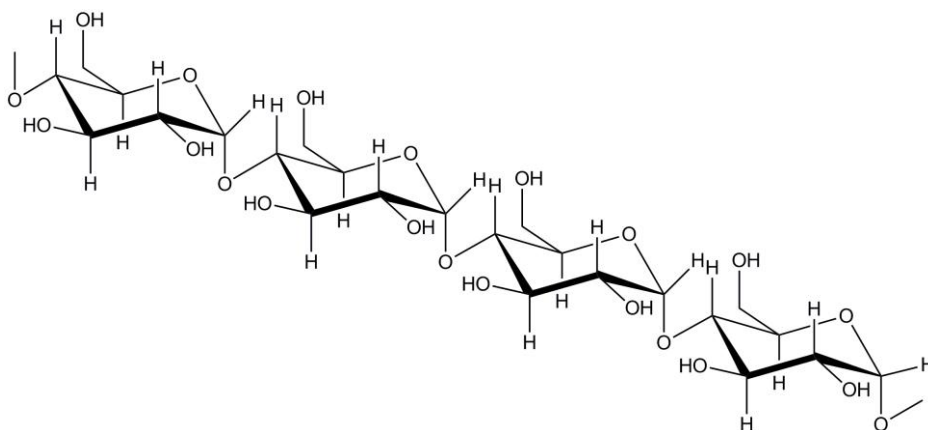
## 2.2. Polisaharidi biljaka

Polisaharidi biljaka se mogu podeliti prema biološkoj funkciji na rezervne polisaharide i polisaharide ćelijskog zida.

### 2.2.1. Rezervni polisaharid biljaka

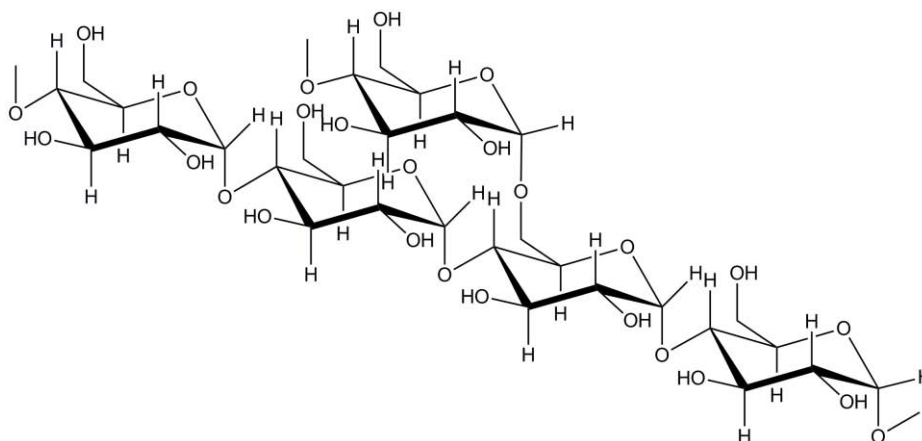
Rezervni polisaharid biljaka, skrob, sastoji se od dva polimera D-glukoznih jedinica vezanih  $\alpha$ -(1,4)- i  $\alpha$ -(1,6)-glikozidnim vezama: linearne amiloze i razgranatog amilopektina. U sastav rezervnog materijala, pored skroba, ulaze i druge manje prisutne komponente (proteini, lipidi i minerali), čija zastupljenost zavisi od biljnog porekla.

Amiloza je linearni molekul (1,4)-vezanih  $\alpha$ -D-glukopiranoza (slika 2.1.), koji može biti i blago razgranat preko položaja O-6 pojedinih glukoznih jedinica u osnovnom nizu (<1%). Sadržaj amiloze u molekulu skroba varira između 14 i 29% w/w, a promene u sastavu ovog polisaharida mogu nastati unakrsnim, transgenetskim gajenjem biljaka ili mutagenozom.



Slika 2.1. Struktura amiloze

Amilopektin (70-82% w/w) je razgranata komponenta skroba izgrađena od  $\alpha$ -D-glukopiranoznih jedinica koje su pretežno povezane (1,4)-vezama, sa 5-6% (1,6)-veza u tačkama grananja (slika 2.2.). Sastoji se od više hiljada kratkih  $\alpha$ -(1,4)-glukanskih lanaca međusobno povezanih  $\alpha$ -(1,6)-vezama (Buléon et al., 1998).



Slika 2.2. Struktura amilopektina

Prosečna dužina molekula amiloze nalazi se u opsegu od 135 do 670 jedinica glukoze, a zbog razgranatosti amilopektina, dužina njegovog osnovnog niza je znatno manja i iznosi svega 17-34 glukoznih jedinica. Prosečan broj lanaca amiloze u molekulu skroba iznosi 1,9-7,8, dok je amilopektin znatno zastupljeniji (220-920) (Waterschoot et al., 2015).

Komponente koje u malim količinama ulaze u sastav skrobnih granula mogu biti podeljene u tri kategorije: čestice koje se sastoje pretežno od fragmenata ćelijskog zida, površinske komponente i unutrašnje komponente (Buléon et al., 1998). Lipidi predstavljaju najznačajniju unutrašnju frakciju koja ulazi u sastav granula. Njihov sadržaj je u pozitivnoj korelaciji sa sadržajem amiloze, a njihova funkcija je da, formiranjem kompleksa sa amilozom, smanje bubrenje i curenje ugljenih hidrata iz skrobnih granula u procesu zagrevanja vodenih rastvora skroba (Raphaelides i Georgiadis, 2006). Najznačajnije površinske komponente su: proteini, enzimi, aminokiseline i nukleinske kiseline. Sadržaj proteina (0,1-0,45%) i pepela (0,1-0,3%) je veoma nizak, a najzastupljeniji elementi koji ulaze u sastav skrobnih granula su: fosfor,

kalcijum, kalijum, magnezijum i natrijum (Dhital et al., 2011). Sadržaj fosfora koji se nalazi u sastavu fosfatnih monoestara je posebno važan za bubrenje skroba u vodenim rastvorima. Negativno naelektrisane fosfatne grupe utiču na međusobno odbijanje susednih lanaca amilopektina i omogućavaju brzu hidrataciju i bubrenje skrobnih granula (Singh et al., 2003).

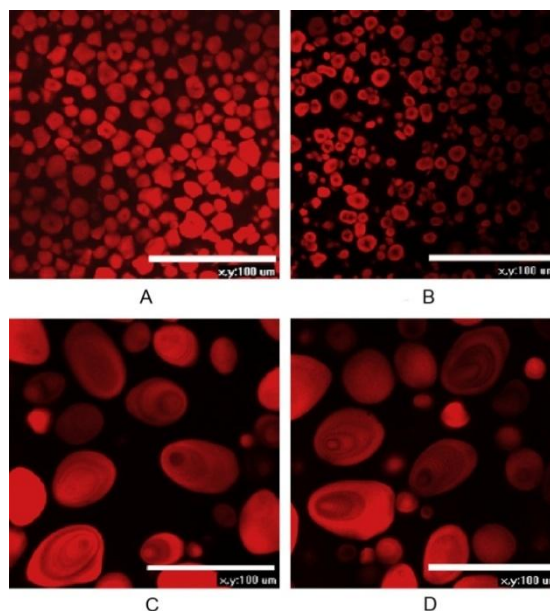
Biljke sintetišu skrob u obliku granula koje se skladište u obliku naizmeničnih amorfnih i semikristalnih prstenova (Kim et al., 2015; Vamadevan i Bertoft, 2015). Amorfnih prstenovi se sastoje od amiloze i manje uređenog amilopektina koji su izmešani unutar skrobnih granula. Semikristalni prstenovi se sastoje iz amorfnih i kristalnih lamela, a amilopektin je zaslužan za kristalni karakter skroba (Thompson, 2000). Postoje različiti tipovi kristalnih struktura ili polimorfnih formi skroba: A-tip (dvostruki heliksi gusto pakovani u monoklinične jedinice sa osam molekula vode; može se uočiti kod kristala skroba iz žitarica), B-tip (heksagonalni kristalni sistem sa 36 molekula vode; npr. kod skroba iz krompira), C-tip (smeša A- i B-kristala) i V-tip (jednostruki heliksi amiloze koji formiraju inkluzione komplekse sa jodom, alkoholima ili masnim kiselinama) (Dufresne, 2014).

Veličina i oblik skrobnih granula zavise od vrste biljke i mogu dosta da variraju – od veoma velikih, okruglih ili ovalnih (10-100  $\mu\text{m}$ ), do veoma malih, poligonalnih (3-8  $\mu\text{m}$ ) (slika 2.3.). Skrob bogat amilozom, pored uobičajenih oblika, sadrži i izvestan broj izduženih, filamentoznih granula, dok se skrob koji praktično ne sadrži amilozu naziva još i voštanim (Schirmer et al., 2013). Nedoslednosti u sastavu skroba mogu se pripisati genotipu biljke, kao i sinergističkim ili antagonističkim interakcijama sa faktorima spoljašnje sredine (temperaturom, sadržajem ugljen-dioksida, svetlosti, vlage, hranljivih supstanci) (Patindol et al., 2015).

Skrob je značajan izvor ugljenih hidrata u ishrani ljudi. Takođe, ima veliku primenu kao aditiv u papirnoj, hemijskoj, tekstilnoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji, gde se koristi kao nativan, fizički ili hemijski modifikovan. Nativan skrob se koristi zbog svojih zgušnjavajućih i gelirajućih svojstava. Međutim, osobine nativnog skroba ne zadovoljavaju proizvodne i tehnološke zahteve za mnoge primene. To je razlog zbog kojeg se skrob hemijski i fizički modifikuje: umrežava (čime se povećava stabilnost na povišenoj temperaturi i na sniženim pH vrednostima) ili supstituiše (čime



se umanjuje mogućnost retrogradacije). Hemijske modifikacije koje se najviše koriste za primenu u različitim oblastima su: oksidacija, katjonizacija, kopolimerizacija, hidroliza i supstitucija.



Slika 2.3. Konfokalne laserske skenirajuće mikrografije: kukuruznog skroba (A), kukuruznog skroba sa velikim sadržajem amiloze (B), pšeničnog skroba (C) i voštanog skroba iz krompira (D). Skala: 100  $\mu\text{m}$ .

Preuzeto iz: Schirmer et al., 2013

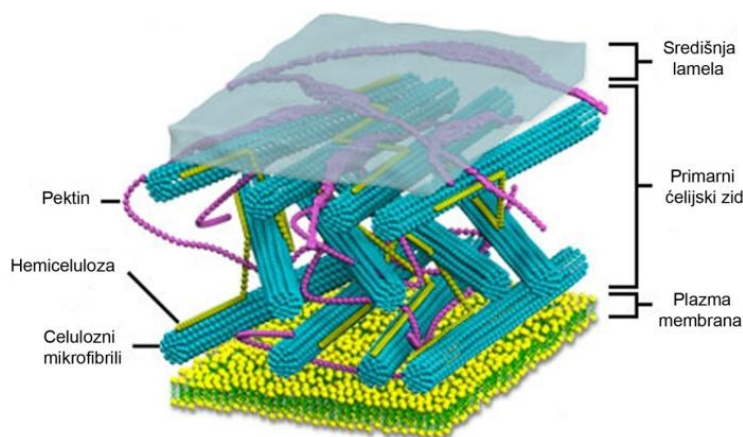
### 2.2.2. Strukturni polisaharidi ćelijskog zida biljaka

Ćelijski zid biljaka poseduje kompleksnu, dinamičnu makromolekularnu strukturu koja okružuje i štiti ćeliju (slika 2.4.). Sastoji se od polisaharida velike molekulske mase, proteina sa visokim stepenom glikozilovanja i lignina (Somerville et al., 2004).

Kao posledica ograničene pokretljivosti, biljke su limitirane u svojoj sposobnosti da izdrže različite ekstremne uslove spoljašnje sredine i da prežive napade patogena i herbivora. Ćelijski zid, struktura formirana od ugljenih hidrata, proteina, aromatičnih i alifatičnih jedinjenja esencijalnih za rast i razvoj, omogućava biljkama da se prilagode u

različitim ekološkim nišama. Struktura ćelijskog zida se konstantno modifikuje da bi se prilagodila fazi rasta i spoljašnjim uslovima.

Biljne ćelije su okružene središnjom lamelom i primarnim ćelijskim zidom tokom inicijalne faze rasta i ekspanzije. Kod mnogih ćelija, zid je učvršćen i dodatno stabilizovan prisustvom sekundarnog ćelijskog zida. I primarni i sekundarni ćelijski zid sadrže celulozu i hemicelulozu; primarni sadrži i pektine, kao i brojne enzime i strukturne proteine, dok sekundarni zid sadrži malo proteina i pektina, ali sadrži lignin (Lerouxel et al., 2006).

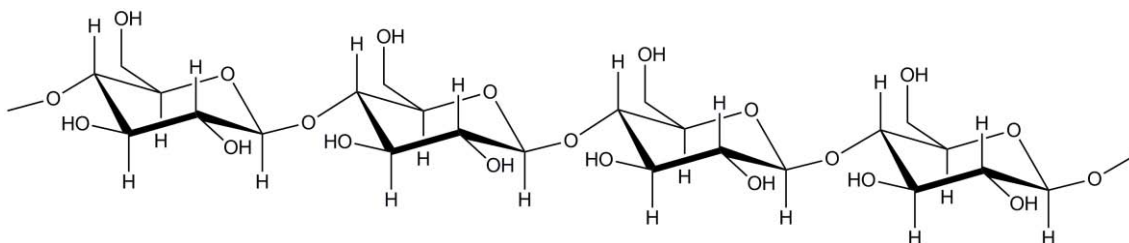


Slika 2.4. Struktura ćelijskog zida biljaka

Preuzeto sa: <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/plants/cellwall.html>

Celuloza je najznačajnija i najzastupljenija komponenta od svih biljnih polisaharida (slika 2.5.). Nalazi se u jezgri ćelijskog zida, gde služi kao skela za vezivanje drugih strukturnih komponenata. U primarnom zidu viših biljaka vizuelno dominantna strukturna karakteristika je prisustvo celuloznih mikrofibrila prečnika oko 3 nm koji okružuju ćeliju, međusobno umreženih linearnim polisaharidima, kao što ksiloglukani. Sastoje se od 30-36 lanaca  $\beta$ -(1,4)-vezanih molekula glukoze koji, povezani vodoničnim vezama i van der Waals-ovim silama, formiraju nerastvorni i neelastični kristalni materijal. Celulozna vlakna su međusobno umrežena molekulima hemiceluloze – razgranatim polisaharidima velike molekulske mase (ksiloglukanima, glukomananima, glukuronoarabinoksilanima) koji su vezani vodoničnim vezama za površinu celuloznih

mikrofibrila i uronjeni u matriks koji se sastoji od pektina, glikoproteina i proteina (Vorwerk et al., 2004).



Slika 2.5. Struktura celuloze

Pektini, najzastupljeniji u primarnom ćelijskom zidu i središnjoj lameli, predstavljaju kompleksne polisaharide čija je osnovna karakteristika prisustvo uronskih kiselina. U ćelijskom zidu prisutni su: homogalakturonan, ramnogalakturonan I i u malim količinama ramnogalakturonan II (Lerouxel et al., 2006). Pretpostavlja se da ramnogalakturonan I funkcioniše kao osnova za koju se drugi pektini kovalentno vezuju kao bočni lanci (Vincken et al., 2003). Pektini su veoma značajni za kontrolu poroznosti ćelijskog zida, adheziju susednih ćelija (Jarvis et al., 2003) i kontrolu jonskog okruženja ćelijskog zida (Carpita i Gibeaut, 1993). Takođe, značajnu ulogu u učvršćivanju strukture ćelijskog zida, intercelularnom povezivanju i normalnom rastu biljaka imaju borat-diestarski mostovi koji se nalaze između ostataka apioze unutar molekula ramnogalakturonana II (O'Neill et al., 2004).

Sastav ćelijskog zida značajno varira između različitih vrsta biljaka, kao i između različitih tipova ćelija u okviru jednog organizma (Vorwerk et al., 2004). Do sada postoje samo relativno ograničene informacije o stepenu strukturnog diverziteta unutar i između vrsta. Metode za prečišćavanje i karakterizaciju visokomolekulskih polisaharida još uvek nisu dovoljno razvijene, u poređenju sa metodama za prečišćavanje proteina. Saznanja o strukturi većine ovih molekula baziraju se na analitičkim metodama koje mere prosečne osobine heterogenih preparata, a u poslednje vreme primenom mikroskopije atomskih sila omogućeno je posmatranje pojedinačnih molekula polisaharida.

Analizom ukupnog ugljenohidratnog sastava ćelijskih zidova iz različitih uzoraka utvrđeno je da svaki tip tkiva ima drugačiji polisaharidni profil, kao i da se on menja u zavisnosti od faze rasta i razvoja biljke (Freshour et al., 2003). Razlozi za navedene promene leže u različitoj elastičnosti zida i pokretljivosti različitih tipova molekula u njemu ili reakciji na prisustvo patogena.

Zahvaljujući svojim svojstvima, ćelijski zid obezbeđuje ćeliji čvrstinu, mogućnost širenja i modularnost (Somerville et al., 2004). Budući da svaka ćelija trpi osmotski pritisak od 0,1-3,0 MPa, ćelijski zid ima funkciju da osigura rigidnost ćelije i spreči njeno pucanje.

Osim mehaničke uloge u arhitekturi i zaštiti, ćelijski zid ili njegove određene komponente imaju i funkciju jonskih izmenjivača, kao i ulogu u ćelijskoj adheziji i signalnoj transdukciji (Caffall i Mohnen, 2009).

Ćelijski zidovi takođe predstavljaju i barijeru za biljne patogene. Pojava latentnih signalnih molekula koji se oslobađaju u toku degradacije ćelijskog zida koja prati patogenezu i pokreću defanzivni odgovor ukazuje na prisustvo puteva signalne transdukcije koji su aktivirani glikanima (Vorwerk et al., 2004). Brojni su i dokazi koji upućuju na to da polisaharidni fragmenti i proteoglikani ćelijskog zida učestvuju u razvojnim procesima kod biljaka.

### **2.2.3. Biljni eksudati**

Prirodne gume su eksudati biljaka koji se sastoje pretežno od polisaharida. Gumoza, proces sinteze, akumulacije i eksudacije guma, uočen je kod mnogih biljaka, posebno u familiji *Rosaceae* (slika 2.6.). Gumoza je indukovana biotičkim i abiotičkim uzrocima stresa, kao što su: bakterijske i gljivične infekcije, napadi insekata i mehaničke povrede. Ovaj proces je deo odbrambenog sistema biljaka, budući da polisaharidi mogu sprečiti širenje oboljenja izolovanjem i zatvaranjem inficiranih ili ogoljenih tkiva čime se onemogućava ulaz i kretanje patogena, gubitak vode iz oštećenih tkiva i druge štetne pojave (Miyamoto et al., 2015; Abib et al., 2013).



Slika 2.6. Proces prirodne eksudacije polisaharida  
Preuzeto sa: <http://en.wikipedia.org/wiki/Gummosis>

Postoji nekoliko hipoteza o nastajanju procesa gumoze. Interpretacija eksudacije polisaharida je bazirana na direktnom makroskopskom posmatranju drveta, kao i mikroskopskim proučavanjima anatomskih promena i citološkim analizama. Uočeno je da do ove pojave dolazi u unutrašnjoj kori drveta, gde se formiraju ciste čijem razvoju prethode promene u susednim parenhimskim tkivima i nestanak skroba (Joseleau i Ullmann, 1990).

Ova pojava je opisana kod mnogih vrsta roda *Acacia*, pri čemu dolazi do sinteze, akumulacije i eksudacije polisaharida gumiarabike. Varijacije u produkciji ovog polisaharida su rezultat kompleksnih faktora: geografskog porekla, klimatskih uslova, sastava zemljišta, starosti drveta, mesta eksudacije.

Budući da postoji značajna genetska disperzija unutar roda *Acacia*, kvalitet i obim produkcije gumiarabike u velikoj meri zavisi od vrste, pa je, zbog primene u različitim oblastima privrede, neophodna identifikacija biljnog izvora i mesta produkcije gumiarabike. Takođe, nakon prikupljanja biljnog eksudata, ovaj polisaharid se klasifikuje prema boji, čistoći, molekulskoj masi i sličnim karakteristikama, što određuje njegovu potencijalnu primenu (López-Franco et al., 2012).

## 2.2.4. Gumiarabika

Gumiarabika je polisaharid izolovan iz eksudata drveća roda *Acacia*. Zbog visokog sadržaja proteina (1,5-3% w/w, u zavisnosti od područja rasta i tipa polisaharida) svrstava se u kompozitne polisaharide (Ma et al., 2015).

Rod *Acacia* je drugi po veličini u familiji *Leguminosae* i sadrži oko 900 vrsta. Njihova stabla rastu u tropskim oblastima Australije, Indije i Amerike, a najviše ih ima u zoni Sahela u Africi. Imaju brojne funkcije: pored proizvodnje gume, sprečavaju širenje pustinje, obnavljaju plodnost zemljišta i predstavljaju izvor goriva i stočne hrane. Gotovo celokupna komercijalno dostupna gumiarabika vodi poreklo iz takozvanog „pojasa gume” u Africi, prostrane regije koja se prostire od Mauritanije na zapadu, do Kenije na istoku. Sudan je najveći svetski proizvođač gumiarabike visokog kvaliteta koja se koristi kao standard u ocenjivanju drugih izvora (Verbeken et al., 2003).

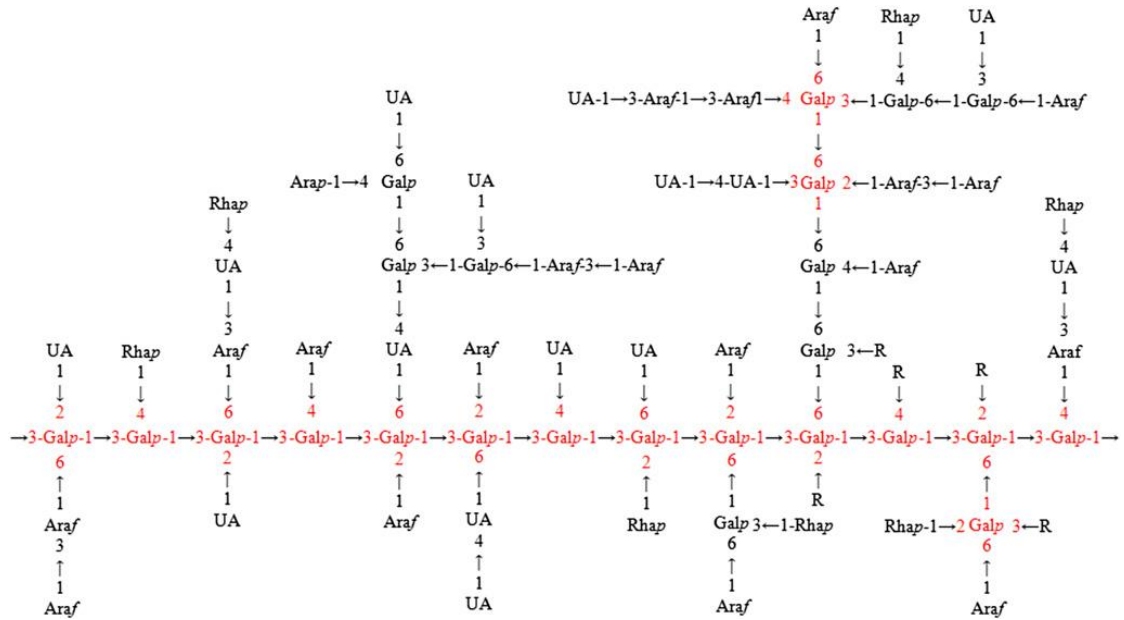
Komercijalna gumiarabika je proizvod velikog broja vrsta roda *Acacia*, od kojih su najzastupljenije *A. senegal*, *A. seyal* i *A. polyacantha*. Većina ovih vrsta raste u divljini, a planirano se gaji jedino vrsta *A. senegal*, čime se olakšava prikupljanje gumiarabike i obezbeđuje ujednačenost kvaliteta. Stablo *A. senegal* dostiže visinu od 4,5-6 m. Otporno je na sušne uslove i raste na mestima gde su godišnje padavine 100-950 mm, a sušni periodi 5-11 meseci (Verbeken et al., 2003).

### 2.2.4.1. Struktura gumiarabike

Gumiarabika poreklom iz *A. senegal* se sastoji iz tri osnovne komponente: arabinogalaktana, arabinogalaktan-protein kompleksa i glikoproteina, što je utvrđeno različitim hromatografskim i enzimskim metodama (jonoizmenjivačkom, hidrofobnom i HPLC hromatografijom, gel-filtracijom, enzimskom i sekvencijalnom Smith-ovom degradacijom).

Arabinogalaktan (molekulska masa, MM 300 kDa) predstavlja najzastupljeniju komponentu gumiarabike, koja čini 88% ukupne mase polisaharida i sadrži najmanje

proteina (0,44% w/w). Osnovni lanac se sastoji od (1,3)-vezanih ostataka galaktopiranoze (Galp) i supstituisan je ostacima  $\rightarrow 2,3,6\text{-}\beta\text{-D-Galp1}\rightarrow$ ,  $\rightarrow 3,4\text{-Galp1}\rightarrow$ ,  $\rightarrow 3,4,6\text{-Galp1}\rightarrow$  u O-2, O-6 ili O-4 položajima (slika 2.7.) (Nie et al., 2013a).



Slika 2.7. Pretpostavljena struktura polisaharida gumiarabike (*A. senegal*).

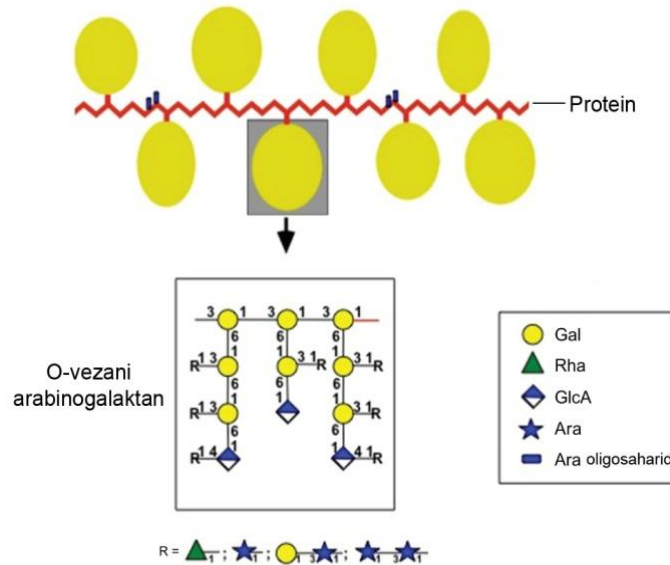
R predstavlja jedan od sledećih ostataka: T-Rhap1 $\rightarrow$ , T-L-Araf1 $\rightarrow$ , T-L-Arap1 $\rightarrow$ , T-UA1 $\rightarrow$ , T-UA1 $\rightarrow$ , T-L-Araf1 $\rightarrow$ 3-L-Araf1 $\rightarrow$ , T-UA1 $\rightarrow$ 4-UA1 $\rightarrow$ .

Svi molekuli galaktoze i uronskih kiselina su u  $\beta\text{-D}$  obliku, a arabinoze i ramnoze u  $\alpha\text{-L}$  obliku. T je oznaka za terminalnu jedinicu.

Preuzeto iz: Nie et al., 2013a

Arabinogalaktan-protein kompleks (MM 1500 kDa) sadrži oko 9% w/w proteina u čijem sastavu su najzastupljenije aminokiseline hidrokisiprolin (27-30,4 mol%) i serin (14-21 mol%) i čini 10% ukupne mase gumiarabike (Wang et al., 2008). Osnovni nizovi proteina povezani su sa hidrofилnim ugljenohidratnim blokovima arabinogalaktana preko funkcionalnih grupa aminokiselina, pri čemu se formira „struktura mimoze“ (eng. „wattle blossom“, slika 2.8.) (Dickinson, 2003). Prema ovom modelu, hidrofobni proteini imaju afinitet prema lipidnoj fazi, dok se hidrofилni ugljeni hidrati nalaze u vodenoj fazi koja okružuje lipidnu kap, delujući kao emulgujući agens. Kao posledica

toga, površinski napon, viskozitet i emulgujuća svojstva gumiarabike su pretežno kontrolisani ukupnim sadržajem proteina.



Slika 2.8. „Wattle blossom” model strukture arabinogalaktan – protein kompleksa

Preuzeto iz: Tan et al., 2012

Glikoprotein (MM 250 kDa) predstavlja najmanju frakciju (svega 1% w/w gumiarabike) i sadrži oko 55% w/w proteina u kojima su najzastupljenije aminokiseline aspartat, serin, leucin i glicin (Wang et al., 2008).

Struktura gumiarabike poreklom iz *A. seyal* je slična prethodno opisanoj i čine je tri glavne komponente: arabinogalaktan sa malim sadržajem proteina i niskom molekulskom masom, arabinogalaktan-protein kompleks sa visokim sadržajem proteina i velikom molekulskom masom i glikoprotein koji ima veći sadržaj proteina i veću molekulsku masu u poređenju sa *A. senegal* (Siddig et al., 2005; Flindt et al., 2005). Distribucija aminokiselina se takođe razlikuje kod ove dve varijante polisaharida, kao i struktura ugljenih hidrata u arabinogalaktan-protein kompleksu, koji su više razgranati u odnosu na gumiarabiku poreklom iz *A. senegal* (Flindt et al., 2005; Nie et al., 2013b). Prosečna molekulska masa gumiarabike izolovane iz vrste *A. senegal* je 380 kDa, dok polisaharid iz vrste *A. seyal* ima masu oko 850 kDa.



#### 2.2.4.2. Osobine gumiarabike

Gumiarabika je dobro rastvorna u hladnoj i toploj vodi u koncentracijama do 50%. Zbog kompaktne, razgranate strukture, a time i male hidrodinamičke zapremine, rastvori ovog polisaharida se karakterišu niskim viskozitetom, što omogućava primenu koncentrovanih rastvora u raznim aplikacijama. Rastvori se ponašaju kao Njutnovi fluidi u koncentracijama do 40%, a postaju pseudoplastični pri većim koncentracijama. Zbog svojstava polielektrolita, usled prisustva karboksilnih grupa iz uronskih kiselina, viskozitet rastvora gumiarabike je u funkciji pH vrednosti i prisustva jona: postiže širok maksimum na pH 4,5 do 7,0, a opada na 50% svoje vrednosti na pH 2,0 i manje, odnosno pH 12,0 i više (Williams et al., 2006). Vrednosti  $pK_a$  su takve da vodeni rastvori imaju pH vrednost 4,5-5,5, što ukazuje na to da gumiarabika u uslovima maksimalnog viskoziteta ima visok stepen jonizacije (Verbeken et al., 2003). Prisustvo elektrolita utiče na smanjenje viskoznosti, usled promene u stepenu jonizacije i neutralizacije karboksilnih grupa, a time i promene u prosečnom rastojanju između naelektrisanih grupa u polimeru (Williams et al., 2006). Jedini elektrolit koji povećava viskozitet rastvora gumiarabike je natrijum-citrat, zbog kompleksirajućeg efekta hidroksilnih grupa iz citrata. Viskozitet rastvora gumiarabike opada stajanjem, ali ovaj efekat može biti sveden na minimum dodavanjem konzervanasa, kao što je benzoeva kiselina (0,2%), koja sprečava kontaminaciju bakterijama i depolimerizaciju kao posledicu dejstva bakterijskih enzima (Williams et al., 2006).

Hemijski sastav i optička aktivnost gumiarabike poreklom iz *A. senegal* prikazani su u tabeli 2.1. (Idris et al., 1998).

Gumiarabika ima odlične emulgjujuće karakteristike usled prisustva arabinogalaktan-proteinskog kompleksa. U uljanim emulzijama, hidrofobna polipeptidna kičma jako adsorbuje na dodirnoj površini između faza ulje-voda, dok ugljenohidratna komponenta stabilizuje emulziju sternim i elektrostatičkim odbijanjem. Istraživanja su pokazala da, iako su emulgjujuće osobine generalno bolje sa povećavanjem molekulske mase i sadržaja proteina, najbolji rezultati su ipak dobijeni sa smešom različitih frakcija. Upravo zbog toga, heterogena priroda gumiarabike čini je odličnim emulgatorom.

Tabela 2.1. Hemijski sastav i optička aktivnost gumiarabike poreklom iz *A. senegal*

Parametar	Opseg
Sadržaj vlage, %	12,5 – 16,0
Specifična rotacija, °	(-32,7) – (-27,0)
Sadržaj azota, %	0,22 – 0,39
Sadržaj proteina, %	1,5 – 2,6
Sadržaj galaktoze, %	39 – 42
Sadržaj arabinoze, %	24 – 27
Sadržaj ramnoze, %	12 – 16
Sadržaj glukuronske kiseline, %	15 – 16

#### 2.2.4.3. Primena gumiarabike

Gumiarabika je najstarija i najpoznatija od svih prirodnih guma. Njena upotreba počinje još od trećeg milenijuma pre nove ere, od vremena starih Egipćana. Korišćena je kao vezivo za pigmente i adheziv na slikama hijeroglifa, kao i prijanjajući agens u toku procesa balsamovanja mumija (Verbeken et al., 2003). Naziv gumiarabika dobijen je posle uvoza ovog polisaharida u Evropu, da bi se označilo njegovo poreklo. Od 1999. godine gumiarabika se, od strane ekspertskeg komiteta za aditive u hrani FAO/WHO JECFA (eng. Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization Joint Expert Committee for Food Additives), definiše kao „suvi eksudat poreklom iz stabla i grana *Acacia senegal* (L.) Willdenow ili *Acacia seyal* (familija *Leguminosae*)” (FAO, 1999). U širem značenju, naziv gumiarabika se takođe koristi za gume koje su proizvod drugih vrsta roda *Acacia*, kao što je *A. karroo*, koja se još naziva i gumiakacia (FAO, 1995).

Gumiarabika se najviše upotrebljava u konditorskoj industriji, gde se koristi kao punilac u različitim proizvodima (Verbeken et al., 2003; Williams et al., 2006). Ima dugu tradiciju u proizvodnji bombona: za obezbeđivanje bistrine koja je veća nego kada se koriste drugi hidrokoloidi, sprečavanje kristalizacije saharoze, kontrolisano oslobađanje

aroma i usporeno rastvaranje u ustima. Takođe, obezbeđuje odgovarajuću teksturu u niskokaloričnim proizvodima sa veštačkim zaslađivačima. Koristi se u proizvodnji žvakaćih guma kao agens za prevlačenje i stabilizator pigmenta. U aerisanim konditorskim proizvodima služi kao agens za stabilizaciju. Upotrebljava se i kao emulgator, za obezbeđivanje uniformne distribucije masti u proizvodu. Zbog stabilnosti u kiselim sredinama i velike rastvorljivosti, upotrebljava se za emulgovanje, sprečavanje flokulacije i simuliranje prisustva pulpe u proizvodnji sokova. Sve više se koristi kao izvor rastvornih vlakana u niskokaloričnim i dijetetskim pićima. Koristi se i za sprečavanje geliranja u konzerviranoj hrani za kućne ljubimce, jer inhibira ekstrakciju proteina iz mesa.

Upotreba gumiarabike u prehrambenoj industriji je potpuno bezbedna. Ukupni dnevni unos supstanci u čijem sastavu se nalazi ovaj polisaharid ne izaziva nikakve neprijatne intestinalne sporedne efekte kod zdravih konzumenata, niti predstavlja opasnost po zdravlje ljudi.

Dokazani su pozitivni efekti gumiarabike na određena zdravstvena stanja: trofični efekti na mukozne membrane creva, redukcija dijareje, hipoholesterolemično i hipoglikemično dejstvo i povoljan uticaj kod renalnih oboljenja (Phillips i Phillips, 2011; Phillips et al., 2008).

Nakon unosa, gumiarabika u nepromenjenom obliku dospeva u debelo crevo i zbog toga se karakteriše kao nesvarljivi polisaharid ili dijetetsko vlakno. Fermentacijom polisaharida pomoću crevnih bakterija nastaju kratkolančane masne kiseline, uglavnom propionska kiselina (Adiotomre et al., 1990; May et al., 1994). Iz tog razloga, gumiarabika posredno redukuje koncentraciju amonijaka u crevu, jer se njenom fermentacijom obezbeđuje energija potrebna intestinalnim bakterijama da koriste amonijak kao izvor azota. Smanjenje koncentracije amonijaka može da ubrza transport uree iz krvotoka u lumen, čime se smanjuje opterećenje jetre pri uklanjanju amonijaka kod pacijenata koji imaju bubrežna ili hepatična oboljenja (Ali et al., 2009). Ovo je jedna od značajnih potencijalnih vrednosti gumiarabike, pored dobro poznatih pozitivnih efekata na zdravlje, kao rezultat njenih fizičkih svojstava: usporavanja apsorpcije glukoze, sprečavanja izlivanja žučnih kiselina i poboljšanja intestinalnog tranzita.

Takođe, pokazano je i da gumiarabika ima svojstva bifidogenih vlakana (Cherbut et al., 2003; Michel et al., 1998), jer selektivno povećava broj mlečnokiselinskih bakterija i bifidobakterija u odnosu na enterobakterije kod zdravih osoba. Dokazano je da gumiarabika ima prebiotska svojstva pri unosu od 10 g dnevno.

Poslednjih godina interesovanje za biljne polimere eksponencijalno raste zbog njihove primene u farmaciji kao stabilizatora, bioadheziva, veziva, sredstava za solubilizaciju, emulzifikaciju, suspendovanje i geliranje (Prajapati et al., 2013a). Takođe, predmet su istraživanja za primenu u različitim farmaceutskim formama, kao što su matriksi, bukalni filmovi, mikrosfere, nanočestice, viskozne vodene formulacije (npr. oftalmološki rastvori), suspenzije, implantati, gde je dokazana njihova efikasnost (Alonso – Sande et al., 2009; Chamarchy i Pinal, 2008). Primena prirodnih polisaharida u farmaciji je značajna zbog ekonomične proizvodnje, lake dostupnosti, netoksičnosti, biorazgradivosti, biokompatibilnosti i mogućnosti hemijskih modifikacija.

Gumiarabika se nekada intenzivno koristila u farmaceutskoj industriji, ali je sada u brojnim aplikacijama zamenjena celulozom i modifikovanim skrobom. I dalje se koristi kao agens za suspendovanje, emulgovanje, kao adheziv i vezivo u tabletama i sirupima (Verbeken et al., 2003).

Gumiarabika ima veliku primenu u papirnoj i industriji boja (Jani et al., 2009), u pripremi gravura i oplata u litografskoj industriji (Phillips i Phillips, 2011). Koristi se i kao sredstvo za disperziju u bojama i insekticidnim emulzijama, omogućavanjem ravnomerne raspodele pigmenta i aktivnih komponenti u proizvodima.

### **2.3. Polisaharidi mikroorganizama**

Skorašnja otkrića u oblasti biosinteze bakterijskih makromolekula otvorila su nove puteve za racionalno iskorišćavanje mikroorganizama u proizvodnji polimera pogodnih za primenu u industriji i medicini. Takođe, razjašnjeni su molekularni mehanizmi i regulatorni procesi koji se nalaze u osnovi sinteze biopolimera, čime je omogućena manipulacija mikrobnim sojevima u cilju efikasne produkcije standardnih, ali i

modifikovanih i nestandardnih polimera koji imaju jedinstvene osobine pogodne za specifične aplikacije.

Bakterije efikasno pretvaraju različite izvore ugljenika u širok spektar polimera sa različitim hemijskim i tehnološkim osobinama. Bakterije sintetišu svega nekoliko intracelularnih polimera, dok je broj produkovanih ekstracelularnih polimera daleko veći. Neki od njih imaju iste biološke funkcije u velikom broju prokariota, dok drugi mogu biti specifični za određenu vrstu ili imati različite biološke uloge (Rehm i Valla, 1997). Mnoge bakterijske vrste sintetišu i po nekoliko polimera (Ryder et al., 2007; Pham et al., 2004).

Pored proteina, nukleinskih kiselina i lipida, postoje četiri klase bakterijskih polimera koji su od značaja za primenu u industriji: polisaharidi, poliestri, poliamidi i neorganski polianhidridi (npr. polifosfati) (Rehm, 2010). Ovi molekuli imaju različite biološke funkcije – ulogu rezervnog materijala ili sastavnog dela zaštitnih struktura, a od posebnog su značaja za proces preživljavanja ćelije u nepovoljnim uslovima spoljašnje sredine. Upravo zbog toga, kao odgovor na različite spoljašnje stimuluse, aktiviraju se brojni kompleksni regulatorni putevi za kontrolu biosinteze polimera i njihovih osobina.

Postoji nekoliko komercijalno dostupnih bakterijskih polimera, sa godišnjim obimom svetske proizvodnje koji se meri desetinama i stotinama hiljada tona, a među njima su najzastupljeniji polisaharidi dekstran i ksantan, kao i poliestri. Polimeri poreklom iz prirodnih izvora imaju brojne prednosti u poređenju sa sintetičkim, među kojima su najvažnije: efikasna proizvodnja iz obnovljivih izvora, biorazgradivost i biokompatibilnost.

Biopolimeri su, po definiciji, biorazgradivi i njihova primena u industriji postaje sve aktuelnija, u cilju smanjenja korišćenja sintetičkih polimera i njihovog štetnog akumuliranja u spoljašnjoj sredini. Nakon izlaganja mikrobnj flori karakterističnoj za određenu sredinu (zemljište ili vodu), biopolimeri se u potpunosti razgrađuju do ugljen-dioksida i vode. Ekstracelularni enzimi koje proizvode mikroorganizmi, kao što su hidrolaze i depolimeraze, deluju na osnovni niz polimera, pri čemu nastaju niskomolekulski proizvodi degradacije koje mikrobne ćelije dalje mogu da koriste kao izvore ugljenika i energije (Rehm, 2010). Takođe, budući da se sastoje od prirodnih

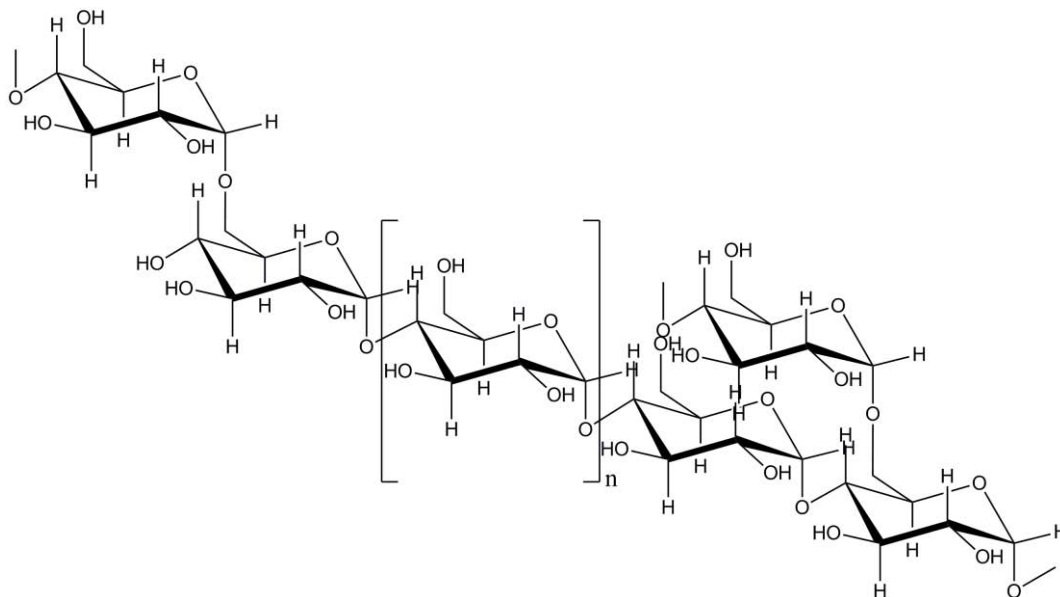
netoksičnih konstituenata, smatraju se i biokompatibilnim, zbog čega se mogu upotrebljavati u brojnim medicinskim i farmaceutskim aplikacijama: kao matrice u inženjeringu tkiva, prekrivanju rana i za kontrolisanu dostavu lekova (eng. controlled drug delivery system).

Polisaharidi mikroorganizama se mogu klasifikovati u tri grupe, zavisno od njihove lokacije u ćeliji: citosolne polisaharide, strukturne polisaharide ćelijskog zida i egzopolisaharide.

### **2.3.1. Citosolni polisaharidi mikroorganizama**

Brojni mikroorganizmi akumuliraju rezerve ugljenika i energije u uslovima privremenog nedostatka hranljivih supstrata u spoljašnjoj sredini, a biosinteza glikogena kao najzastupljenijeg intracelularnog rezervnog polimera je osnovna strategija kojom to postižu.

Glikogen je razgranati homopolisaharid koji se sastoji iz  $\alpha$ -(1,4)-vezanih molekula glukoze sa oko 5%  $\alpha$ -(1,6)-grana (slika 2.9.). Kod bakterija, prosečna dužina osnovnih lanaca je 8-12 glukoznih jedinica, a molekulska masa je  $10^7$ - $10^8$  Da. Sintetiše se u uslovima ograničenog rasta kada je izvor ugljenika dostupan u višku, dok su drugi hranljivi sastojci (izvor azota, sumpora, fosfora) iscrpljeni (Eydallin et al., 2007, Montero et al., 2009; Bourassa i Camilli, 2009). Kod kvasaca, dužina osnovnog lanca iznosi 11-12 jedinica glukoze, prečnik rezervnih granula je 20 nm, a sintetiše se u uslovima ograničenih količina ugljenika, azota, fosfora ili sumpora (Wilson et al., 2010).



Slika 2.9. Struktura glikogena

Prednost korišćenja glikogena kao rezervnog materijala je u tome što ovaj makromolekul ima mali efekat na unutrašnji osmotski pritisak ćelije. Značaj rezervnog polisaharida u preživljavanju u uslovima dugotrajnog nedostatka hranljivih supstanci je jasno potvrđen kod gljiva (Silljé et al., 1999). Utvrđeno je da ćelije koje imaju sposobnost akumulacije glikogena imaju intenzivniji rast u odnosu na one koje nemaju to svojstvo, što ukazuje na značaj ovog polisaharida na sveukupno stanje ćelije (Anderson i Tatchell, 2001). Uloga glikogena kod bakterija nije tako očigledna kao kod gljiva, ali brojna istraživanja povezuju metabolizam glikogena sa preživljavanjem, formiranjem filmova (Bonafonte et al., 2000), kolonizacijom (Henrissat et al., 2002; McMeechan et al., 2005; Jones et al., 2008; Sambou et al., 2008), virulencijom (Bonafonte et al., 2000; McMeechan et al., 2005) i stupanjem u simbiozu (Marroquí et al., 2001).

### 2.3.2. Strukturni polisaharidi ćelijskog zida mikroorganizama

Ćelijski zid *Bacteria* sadrži rigidni omotač čija je primarna funkcija obezbeđivanje njegove čvrstine. Kod pojedinih bakterija postoje i dodatni slojevi koji okružuju ovaj omotač. Upravo na osnovu razlika u strukturi ćelijskog zida koje doprinose razlikama u bojenju mikroorganizama po Gramu, izvršena je podela bakterija na Gram pozitivne (G+) i Gram negativne (G-) (Madigan et al., 2012).

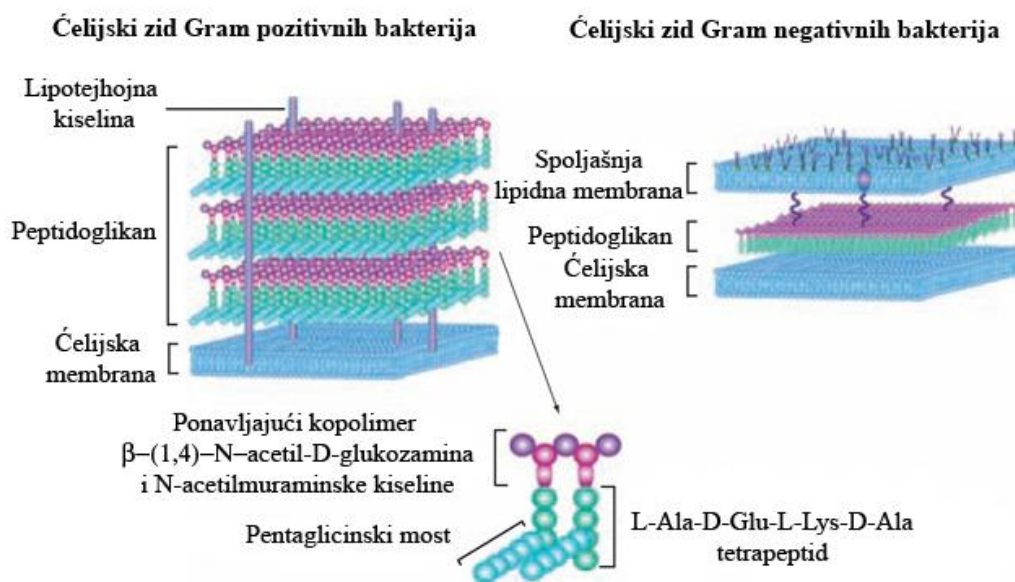
Rigidni sloj G+ i G- bakterija je veoma sličan po hemijskoj strukturi. Sastoji se od peptidoglikana (mureina), esencijalne i specifične komponente koja okružuje ćelijsku membranu gotovo svih bakterija. Peptidoglikan se sastoji iz dva ugljenohidratna derivata (N-acetilglukozamina i N-acetilmuraminske kiseline) povezana  $\beta$ -(1,4)-glikozidnim vezama i malog broja aminokiselina (L-alanina, D-alanina, D-glutaminske kiseline i lizina ili diaminopimelinske kiseline). Ovi molekuli su organizovani u ponavljajuće strukture koje su predstavljene slojevima glikanskih lanaca međusobno povezanih tetrapeptidnim mostovima (slika 2.10.). Glikozidne veze u polisaharidu su veoma jake, ali nedovoljno da obezbede rigidnost u svim smerovima, pa se dodatna stabilizacija i jačina postiže umrežavanjem glikanskih lanaca peptidnim mostovima (Madigan et al., 2012).

Kod G+ bakterija 90% strukture ćelijskog zida predstavljaju peptidoglikani, dok ostatak čine tejhodne kiseline (polimeri glicerolfosfata ili ribitolfosfata povezanih estarskim vezama, za koje su obično vezani drugi šećeri i aminokiselina D-alanin) (Madigan et al., 2012).

U strukturi ćelijskog zida G- bakterija (slika 2.10.) peptidoglikan čini svega 10%, dok je glavni konstituent spoljašnja lipidna membrana ili lipopolisaharidni sloj (LPS). LPS se sastoji od polisaharidnog jezgra u čijem sastavu se nalaze: ketodeoksioktonat, heptoze, glukoza, galaktoza i N-acetilglukozamin. Za jezgro je vezan O-specifični polisaharid – polimer galaktoze, glukoze, ramnoze, manoze, kao i netipičnih dideoksi šećera (tiveloze, paratoze, kolitoze, abekvoze). Lipidni deo LPS, lipid A, ne spada u glicerol lipide, već se u njegovoj strukturi nalaze masne kiseline vezane amin-estarskim vezama



za disaharid sačinjen od N-acetilglukozamin-fosfata (Raetz i Whitfield, 2002). Lipid A je za jezgro vezan preko ketodeoksioktonata (Madigan et al., 2012).



Slika 2.10. Struktura ćelijskog zida Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija

Preuzeto sa: [http://www.sigmaaldrich.com/technical-](http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/glycobiology/peptidoglycans.html)

[documents/articles/biology/glycobiology/peptidoglycans.html](http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/glycobiology/peptidoglycans.html)

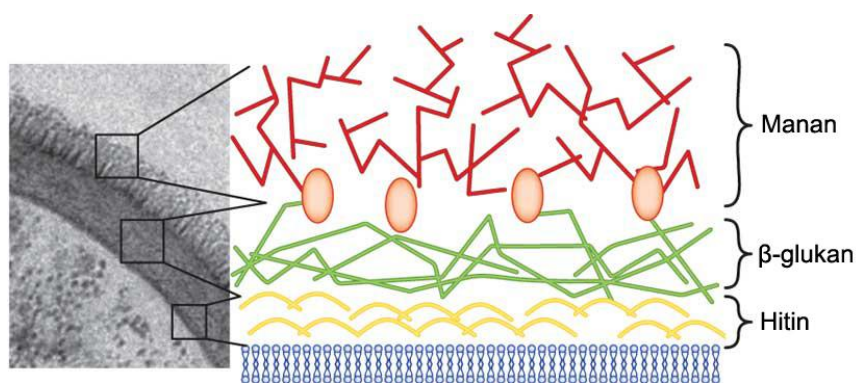
Bez obzira na razlike u sastavu ćelijskog zida, oblik G<sup>+</sup> i G<sup>-</sup> bakterija je u znatnoj mjeri određen dužinom peptidoglikanskih lanaca i prirodom njihovog umrežavanja. Izmene u osnovnom strukturnom lancu dovode do promena u trodimenzionalnoj strukturi peptidoglikana, kao i njegovim osobinama. Takve varijacije se u prirodi sreću očuvane unutar pojedinih rodova ili kao mehanizam rezistencije na antibiotike (Vollmer et al., 2008).

Neke vrste *Archaea* imaju ćelijski zid u čijoj strukturi se nalazi pseudopeptidoglikan, polisaharid veoma sličan peptidoglikanu. Njegov osnovni lanac se sastoji od ostataka N-acetilglukozamina i N-acetiltalozaminuronske kiseline povezanih  $\beta$ -(1,3)-glikozidnim vezama. Neke vrste nemaju ni peptidoglikane niti pseudopeptidoglikane, već je njihov ćelijski zid sačinjen od polisaharida, glikoproteina ili proteina. Najzastupljeniji tip

ćelijskog zida kod *Archaea* je parakristalni površinski sloj (S-sloj), koji se sastoji od proteina ili glikoproteina i ima heksagonalnu simetriju (Madigan et al., 2012).

Osnovna funkcija ćelijskog zida je zaštita ćelijskog integriteta i obezbeđivanje i održavanje turgora. Upravo zbog toga, inhibicija njegove biosinteze mutacijama ili delovanjem antibiotika tokom rasta mikroorganizma ili specifična degradacija (npr. lizozimom) dovodi do pucanja ćelije. Peptidoglikani takođe doprinose očuvanju oblika ćelije i služe kao matriks za ukotvljavanje drugih komponenata ćelijskog omotača: proteina (Dramsi et al., 2008) i tejhojnih kiselina (Neuhaus i Baddiley, 2003). Takođe, bitan su faktor u procesima ćelijskog rasta i deobe.

Ćelijski zid gljiva je strukturno jedinstven, iako je po arhitekturi sličan ćelijskom zidu biljaka. Sastoji se od glikoproteina i polisaharida, od kojih su najzastupljeniji glukan i hitin. Prisustvo manje zastupljenih komponenata varira kod različitih vrsta (Bowman i Free, 2006). Glikoprotein, glukan i hitin su umreženi u kompleksnu strukturu koja čini osnovu ćelijskog zida (slika 2.11.). Formiranje i remodelovanje ove strukture uključuje brojne biosintetske puteve i zajedničko delovanje stotina genskih produkata unutar fungalne ćelije, a sastav ćelijskog zida se menja u zavisnosti od uslova spoljašnje sredine i faze rasta.



Slika 2.11. Struktura ćelijskog zida gljiva

Preuzeto sa: [http://www.nature.com/ni/journal/v13/n9/fig\\_tab/ni.2369\\_F1.html](http://www.nature.com/ni/journal/v13/n9/fig_tab/ni.2369_F1.html)

Glukani su najzastupljenija strukturna komponenta ćelijskog zida gljiva i čine oko 50-60% suve mase zida (Kapteyn et al., 1999). Glukansku komponentu pretežno čini  $\beta$ -(1,3)-glukan (65-90%), dok su i alternativno vezani glukani (npr.  $\beta$ -(1,6),  $\beta$ -(1,4),  $\alpha$ -(1,3) i  $\alpha$ -(1,4)-glukani) pronađeni kod nekih vrsta (Bernard i Latgé, 2001; Klis et al., 2001; Grün et al., 2005). Beta-(1,3)-glukan je osnovni strukturni konstituent za koji su kovalentno vezane ostale komponente ćelijskog zida. Zbog toga je biosinteza ovog polisaharida neophodna za formiranje ćelijskog zida i normalan razvoj gljiva.

Hitin je linearni homopolimer  $\beta$ -(1,4)-vezanih ostataka N-acetilglukozamina. Kvantitativno je manje zastupljena komponenta ćelijskog zida od glikoproteina i glukana, ali je strukturno veoma značajan. Kod kvasaca, hitin čini svega 1-2% w/w (Klis et al., 2002), dok je kod filamentoznih gljiva (npr. *Neurospora*, *Aspergillus*) zastupljeniji i čini 10-20% mase (Bowman i Free, 2006). Hitinski miofibrili se formiraju vodoničnim vezivanjem lanaca polisaharida, pri čemu nastaju kristalne strukture velike čvrstine. Inhibicijom biosinteze hitina dolazi do poremećaja u strukturi ćelijskog zida i malformacije ćelija koje postaju osmotski nestabilne (Specht et al., 1996).

Ćelijski zid gljiva ima proteinsku komponentu koja se proteže unutar hitinskog i glukanskog matriksa. Proteini čine 30-50% suve mase zida kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* i *Candida albicans* (Brown i Catley, 1992), dok je kod filamentoznih gljiva *Neurospora crassa* i *Aspergillus fumigatus* njihov sadržaj nešto manji, 15-30% (Bowman et al., 2006). Najzastupljeniji su glikoproteini koji su u velikoj mjeri modificirani N- i O-vezanim oligosaharidima, mananima ili glukomananima, čija struktura varira kod različitih vrsta (Latgé, 2007). U mnogim slučajevima mogu biti dodatno stabilizovani molekulima glikozilfosfatidilinozitola koji ih učvršćuju za ćelijsku membranu. Proteini ćelijskog zida imaju brojne uloge u održavanju oblika ćelije, adheziji prilikom ćelijskog kretanja i fuzije, zaštiti od stranih supstanci, apsorpciji molekula iz spoljašnje sredine, prenosu intracelularnih signala koji potiču od spoljašnjih stimulusa, kao i sintezi i remodelovanju komponentata ćelijskog zida.

Struktura ćelijskog zida algi je veoma raznolika – u mnogim slučajevima ćelijski zid je sačinjen od mreže celuloznih fibrila, ali u svom sastavu često sadrži i druge polisaharide (pektine, ksilane, manane i alginsku kiselinu). Kod nekih vrsta ćelijski zid je dodatno

stabilizovan kalcijum-karbonatom, dok druge vrste algi sadrže hitin. Kod dijatomeja, ćelijski zid se sastoji iz silikata (Madigan et al., 2012).

### **2.3.3. Egzopolisaharidi**

Egzopolisaharidi (EPS) se izlučuju u spoljašnju sredinu (ili sintetišu ekstracelularno pomoću enzima ćelijskog zida) u formi kapsula ili biofilmova. Na osnovu strukture, mogu se podeliti na homopolisaharide i heteropolisaharide.

U strukturi homopolisaharida (npr. dekstrana, pululana, levana) se nalazi samo jedna vrsta monosaharidnih jedinica. Sintetišu se pomoću specifičnih sekretornih enzima, a sinteza se može odvijati van ćelije ili unutar ćelijskog zida (Donot et al., 2012).

Heteropolisaharidi (npr. ksantani, gelani) su polimeri kompleksne strukture u čijem sastavu se nalazi nekoliko različitih monosaharida. Obično se sintetišu unutar ćelije u formi ponavljajućih jedinica i čine najveći deo bakterijskih egzopolisaharida. Biosintetski putevi heteropolisaharida su, u odnosu na homopolisaharide, znatno kompleksniji i mogu se podeliti na tri faze: asimilaciju monosaharida i njihovo prevođenje u nukleotidne derivate (aktivacija), vezivanje pentasaharidnih jedinica za lipidni transporter (undekaprenil-fosfat ili izoprenoid-fosfat) i polimerizaciju pentasaharida i sekreciju u ekstracelularni prostor (Donot et al., 2012). Mikroorganizmi obično ne proizvode čiste supstance, već smešu polimera u čiju sintezu je uključeno i po nekoliko genskih klastera (Hay et al., 2010; Orr et al., 2009).

Biosinteza egzopolisaharida je direktan odgovor mikroorganizma na selektivan pritisak sredine: promene temperature, pritiska, pH vrednosti ili intenziteta svetlosti (Otero i Vincenzini, 2003). U slučaju acidofilnih ili hipertermofilnih vrsta ovakvi molekuli su neophodni za adaptaciju ćelije na ekstremne uslove (Donot et al., 2012). Ovi molekuli utiču i na način na koji mikroorganizmi interaguju sa spoljašnjom sredinom, bilo da je ona tečna ili čvrsta. Takođe, učestvuju i u formiranju biofilmova velike ćelijske gustine, procesu u kome esencijalnu ulogu ima glikokaliks, sačinjen uglavnom iz EPS.

Egzopolisaharidi utiču na stabilnost biofilma, kompleksnim interakcijama između polisaharidnih lanaca.

Kapsularni polisaharidi se izlučuju iz ćelije, ali ostaju vezani za njenu površinu i najčešće funkcionišu kao osnovni površinski antigeni i faktori virulencije. Kod pojedinih patogenih vrsta (npr. *Klebsiella pneumoniae* i *Streptococcus pneumoniae*) utvrđeno je da ovi protektivni polisaharidi doprinose sprečavanju fagocitoze od strane makrofaga (Arakawa et al., 1995; Pan et al., 2008). Proučavanjem biosinteze ovih polimera moguće je identifikovati ciljna mesta za tretman antibioticima ili hemioterapeuticima, a kapsularni polisaharidi i njihovi derivati potencijalno mogu biti aktivne supstance u vakcinama (Rehm, 2010).

Egzopolisaharidi omogućavaju mikrobnjoj flori da bude vezana za biološki nosač, koji može poslužiti kao supstrat za rast mikroorganizama. Anjonska priroda spoljašnjeg polisaharidnog sloja može biti od pomoći u vezivanju esencijalnih minerala i nutrijenata, što se može iskoristiti za uklanjanje jona metala iz prirodne sredine (Ozturk et al., 2009; Radulović et al. 2008). Polisaharidni omotač takođe reguliše difuziju određenih molekula između ekstracelularne i intracelularne sredine. Ova strogo regulisana difuzija omogućava određenim sojevima rezistenciju na antibiotike i surfaktante. Međutim, oni ne predstavljaju rezerve energije i mikroorganizmi ne mogu da katabolišu EPS koje proizvode. Njihova osnovna uloga je zaštitna – mikroorganizmi se, okruživanjem slojem hidrofилnih polisaharida, štite od isušivanja i štetnog delovanja protozoa. Pored adhezivnih i zaštitnih funkcija, formiranje biofilma poboljšava asociiranje različitih mikrobnih vrsta, kao u slučaju intestinalne mukoze (Yegorenkova et al., 2011), a nakon takvog spajanja, metabolički proizvodi jedne vrste mogu postati supstrati za metaboličke procese druge vrste, kao što i vezivanje jedne vrste za biofilm može da formira mesta vezivanja za druge vrste (Dunne, 2002).

Veliki broj bakterija i neke vrste *Archaea* proizvode egzopolisaharide. U zavisnosti od strukture, monosaharidnog sastava i molekulske mase, egzopolisaharidi mogu imati komercijalno poželjne osobine za primenu u medicini i industriji.

Primeri nekih polisaharida, njihove lokalizacije u ćeliji, osnovnih strukturnih karakteristika, mikroorganizama koji ih proizvode i primene dati su u tabeli 2.2.

Tabela 2.2. Primeri mikrobnih polisaharida, njihove strukture, porekla i primene

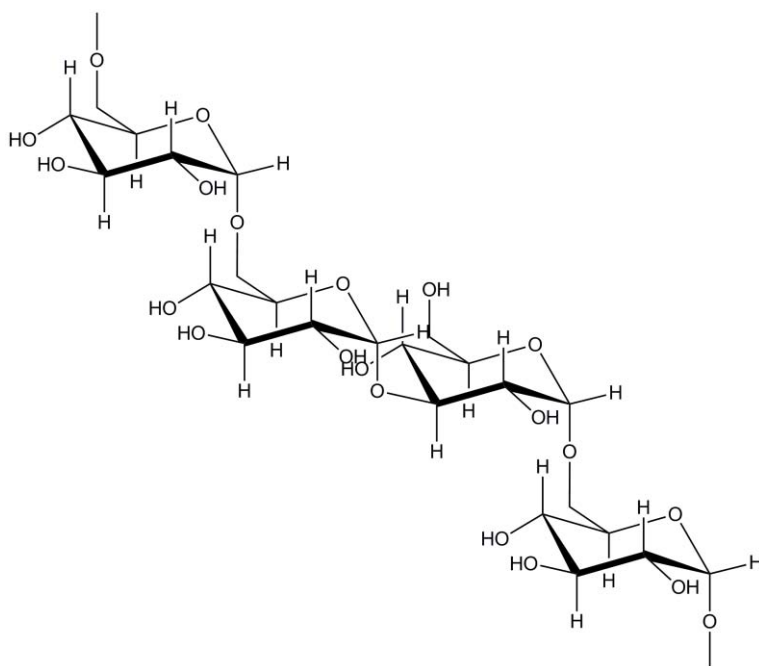
Polisaharid	Lokalizacija	Primarna struktura	Glavne komponente	Producent	Primena
Alginat	Ekstracelularni	$\beta$ -(1,4)- Heteropolimer	Manuronska i guluronska kiselina	<i>Pseudomonas spp.</i> <i>Azotobacter spp.</i>	Biomaterijal Kontrolisana dostava lekova Aditiv u hrani
Celuloza	Ekstracelularni	$\beta$ -(1,4)- Homopolimer	Glukoza	Alphaproteo-bacteria Betaproteobacteria Gammaproteobacteria G+ Bacteria	Aditiv u hrani Dijafragme akustičnih pojačala Prekrivanje rana
Dekstran	Ekstracelularni	$\alpha$ -(1,2)/ $\alpha$ -(1,3)/ $\alpha$ -(1,4)- Razgranati $\alpha$ -(1,6)- homopolimer	Glukoza	<i>Leuconostoc spp.</i> <i>Streptococcus spp.</i>	Zamena za krvnu plazmu Matriks za hromatografiju
Gelan	Ekstracelularni	$\beta$ -(1,3)- Homopolimer	Glukoza, ramnoza, glukuronska kiselina	<i>Sphingomonas spp.</i>	Aditiv u mikrobiološkim podlogama Aditiv u hrani
Glikogen	Intracelularni	$\alpha$ -(1,6)-Razgranati $\alpha$ -(1,4)- homopolimer	Glukoza	<i>Bacteria</i> <i>Archea</i>	Nema
$\beta$ – Glukani	Strukturna komponenta ćeljskog zida	$\beta$ -(1,6) i $\beta$ -(1,3)- Homopolimeri	Glukoza	<i>Fungi</i>	Antitumorska, antioksidativna, imunostimulatorska, prebiotska aktivnost

Tabela 2.2. (nastavak)

Polisaharid	Lokalizacija	Primarna struktura	Glavne komponente	Producent	Primena
Hijaluronska kiselina	Ekstracelularni	$\beta$ -(1,4)- Heteropolimer	Glukuronska kiselina, N-acetilglukozamin	<i>Streptococcus spp.</i> <i>Pasteurella multocida</i>	Kozmetička industrija Obnavljanje tkiva Viskosuplementacija Ciljana dostava lekova
Ksantan	Ekstracelularni	$\beta$ -(1,4)- Heteropolimer	Glukoza, manozna, glukuronska kiselina	<i>Xanthomonas spp.</i>	Aditiv u hrani Naftna industrija Kozmetička industrija
Kurdlan	Ekstracelularni	$\beta$ -(1,3)- Homopolimer	Glukoza	<i>Agrobacterium spp.</i> <i>Rhizobium spp.</i> <i>Cellulomonas spp.</i>	Aditiv u hrani Uklanjanje teških metala Farmaceutska industrija
Levan	Ekstracelularni	$\beta$ -(2,1)-Razgranati $\beta$ -(2,6)- homopolimer	Fruktoza	<i>Bacillus spp.</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Zymomonas mobilis</i> <i>Erwinia herbicola</i>	Aditiv u hrani Farmaceutska i kozmetička industrija
Pululan	Ekstracelularni	$\alpha$ -(1,6)- Razgranati $\alpha$ -(1,4)- homopolimer	Glukoza	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Aditiv u hrani Biosorpcija metala Ciljana dostava lekova i gena
Skleroglukan	Ekstracelularni	$\beta$ -(1,6)- Razgranati $\beta$ -(1,3)- homopolimer	Glukoza	<i>Sclerotium glaucum</i> <i>Sclerotium rolfii</i>	Bioremedijacija Antitumorska i antiviralna aktivnost

Komercijalno najzastupljeniji egzopolisaharidi mikroorganizama su: dekstran, ksantan i alginat.

Dekstran je razgranati egzopolisaharid koji se sastoji od D-glukopiranoznih ostataka međusobno povezanih  $\alpha$ -(1,6)-glikozidnim vezama u osnovnom nizu, sa različitim sadržajem  $\alpha$ -(1,2),  $\alpha$ -(1,3) i  $\alpha$ -(1,4) grana (Sarwat et al., 2008) (slika 2.12.). Dobro se rastvara u vodi, a dobijeni rastvori se ponašaju kao Njutnovi fluidi čiji viskozitet se menja u funkciji koncentracije, temperature i molekulske mase. Nativni dekstrani su polidisperzni – njihova prosečna molekulska masa je  $10^6 - 10^9$  Da. Kiselom hidrolizom u kontrolisanim uslovima nastaju frakcije definisane molekulske mase, a ova osobina, pored neimunogenosti, čini ih izuzetno povoljnim za upotrebu u brojnim kliničkim i farmaceutskim aplikacijama (Rehm, 2010).

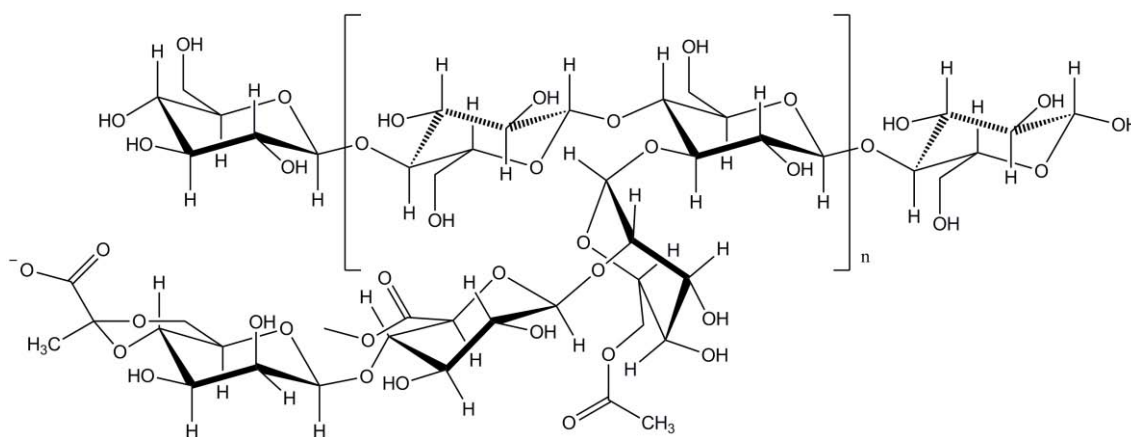


Slika 2.12. Struktura dekstrana

Ksantan je heteropolisaharid koji u primarnoj strukturi sadrži ponavljajuće pentasaharidne jedinice sastavljene iz dva molekula glukoze, dve manoze i jedne glukuronske kiseline, u molarnom odnosu 2,8 : 2,0 : 2,0. Osnovni lanac se sastoji od ostataka D-glukoze povezanih  $\beta$ -(1,4)-glikozidnim vezama. Trisaharidni bočni lanci



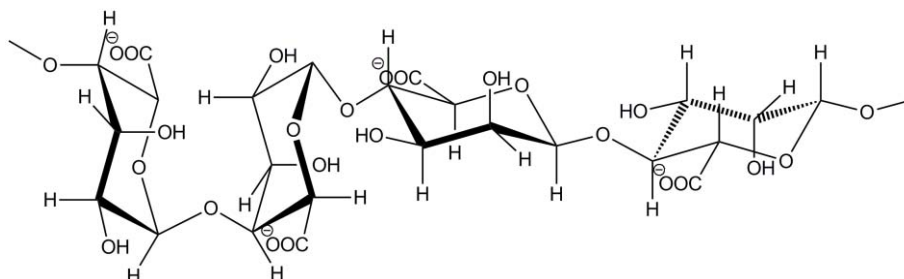
sadrže D-glukuronsku kiselinu između dva ostatka D-manoze vezane u O-3 položaju svake druge glukoze u osnovnom lancu. Polovina terminalnih D-manoznih jedinica sadrži ostatak piruvata vezan preko keto grupe za položaje C-4 i C-6, sa nepoznatom distribucijom. Jedinice D-manoze koje su vezane za osnovni lanac sadrže acetil-grupu u položaju O-6 (slika 2.13.). Prisustvo glukuronske kiseline, acetata i piruvata daje anjonski karakter ovom polisaharidu (García – Ochoa et al., 2000). Ksantan je kompleksni egzopolisaharid čiji su vodeni rastvori već u niskim koncentracijama veoma viskozni i pseudoplastični. On ne menja svojstva prilikom izlaganja širokom opsegu temperature, pH vrednosti ili koncentracije elektrolita. Zbog ovih osobina ksantan ima brojne primene u naftnoj, prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj, papirnoj i tekstilnoj industriji, gde se uglavnom koristi kao flokulant, adheziv, agens za geliranje, stabilizovanje, učvršćivanje i emulgovanje (Becker, 1998).



Slika 2.13. Struktura ksantana

Iako se alginati komercijalno dobijaju iz morskih algi, sposobnost genetski modifikovanih bakterija (kao što su *Azotobacter vinelandii* i *Pseudomonas fluorescens*) da produkuju alginat je veoma perspektivna (Remminghorst i Rehm, 2006). Alginati predstavljaju čitavu familiju linearnih kopolimera koji sadrže blokove (1,4)-vezanih ostataka  $\beta$ -D-manuronske kiseline i  $\alpha$ -L-guluronske kiseline (slika 2.14.), čija sekvenca i molarni odnos zavisi od mikrobnog izvora (Lee i Mooney, 2012). Osobine alginata u

najvećoj meri zavise od strukture, stepena acetilovanja i molekulske mase (Steigedal et al., 2008).



Slika 2.14. Struktura alginata

Uprkos velikom diverzitetu mikrobnih egzopolisaharida sa fizičko-hemijskim osobinama pogodnim za primenu u industriji, samo dva su odobrena za primenu u prehrambenoj industriji u Evropi i SAD: ksantan i gelan. Zbog sve većeg interesovanja za obnovljive resurse, u industrijskim istraživanjima (posebno u sektoru biogoriva, za produkciju bioetanol) su sve više uključeni egzopolisaharidi, njihova produkcija i primena.

Neki mikroorganizmi proizvode i izlučuju veoma velike količine egzopolisaharida: *Agrobacterium spp.* (76 g/L kurdiana) (McIntosh et al., 2005), *Alcaligenes faecalis* (72 g/L kurdiana) (Wu et al., 2008), *Xanthomonas campestris* (53 g/L ksantana) (de Sousa Costa et al., 2014), *Bacillus licheniformis* (99,2 g/L levana) (Kekez et al., 2015) i *Aureobasidium pullulans* (52,5 g/L pululana) (Ravella et al., 2010).

Mikrobiološka produkcija EPS ima brojne prednosti: trajanje proizvodnog procesa se meri danima (u poređenju sa biljkama, gde traje i 3-6 meseci), energetska je efikasna (npr. kod algi koje koriste solarnu energiju za fotosintezu), kao izvor ugljenika može se koristiti industrijski otpad (glicerol, ugljenohidratni ostaci i ugljen-dioksid) i nema zahteva za postojanjem obradivih površina, kao u slučaju biljaka. Takođe, EPS brojnih mikroorganizama se prirodno izlučuju u ekstracelularnu sredinu i pozitivno utiču na njen oporavak (Chen et al., 2006; Chi et al., 2007; Li et al., 2006; Survase et al., 2006). Osnovni faktori koji ograničavaju proizvodnju pojedinih EPS su povezani sa

troškovima produkcije – zahtevima za specifičnim supstratima ili posebnom infrastrukturom (npr. bioreaktorima), obezbeđivanjem aseptičnih uslova i slično.

### 2.3.4. Pululan

Mikrobiološki izvor pululana, *Aureobasidium pullulans* (prvi put opisan kao *Dematium pullulans*) otkrio je de Bary 1866. godine (de Bary, 1866). Bernier je prvi izolovao i okarakterisao polisaharid iz fermentacione tečnosti *A. pullulans* 1958. godine (Bernier, 1958), a Bender i saradnici su ga 1959. godine nazvali pululan (Bender et al., 1959). Osnovna struktura pululana predložena je 1960. godine od strane Wallenfels-a i saradnika, koji su 1961. godine otkrili i enzim pululanazu koja hidrolizuje  $\alpha$ -(1,6)-glikozidne veze (Prajapati et al., 2013b). Catley i saradnici su 1986. godine uočili da pojedini pululani imaju razgranatu strukturu, kao i manji sadržaj drugih tipova veza u molekulu, što je sugerisalo da ne postoji jedinstvena, strogo definisana struktura ovog polisaharida (Catley et al., 1986).

#### 2.3.4.1. Osobine pululana

Osušen pululan je bele boje, prah bez ukusa i mirisa koji gradi viskozne nehigroskopne rastvore u vodi u koncentracijama 5-10%. Viskozitet rastvora pululana ne menja se zagrevanjem, promenama pH vrednosti i prisustvom metalnih jona. Pululan počinje da se razlaže na 250 °C, a ugljeniše se na 280 °C. Dobro se rastvara u vodi i razblaženim bazama, a nerastvoran je u etanolu i drugim organskim rastvaračima, sa izuzetkom dimetilsulfoksida i formamida. Molekulske mase pululana su u opsegu  $5 \cdot 10^3 - 9 \cdot 10^6$  g/mol, a molekul je linearan i veoma fleksibilan (Prajapati et al., 2013b).

Pululan je netoksičan, nemutagen, nekancerogen, jestiv (Kimoto et al., 1997); ima dobra mehanička svojstva i druge funkcionalne osobine, kao što su adhezivnost, sposobnost formiranja filmova, enzimska degradabilnost (Shingel, 2004). Biorazgradiv je,

nepropusan za kiseonik i ne razlaže se u gastrointestinalnom traktu ljudi, zbog čega se može primenjivati kao nosač za oralnu dostavu lekova.

#### 2.3.4.2. Mikrobiološki izvor pululana

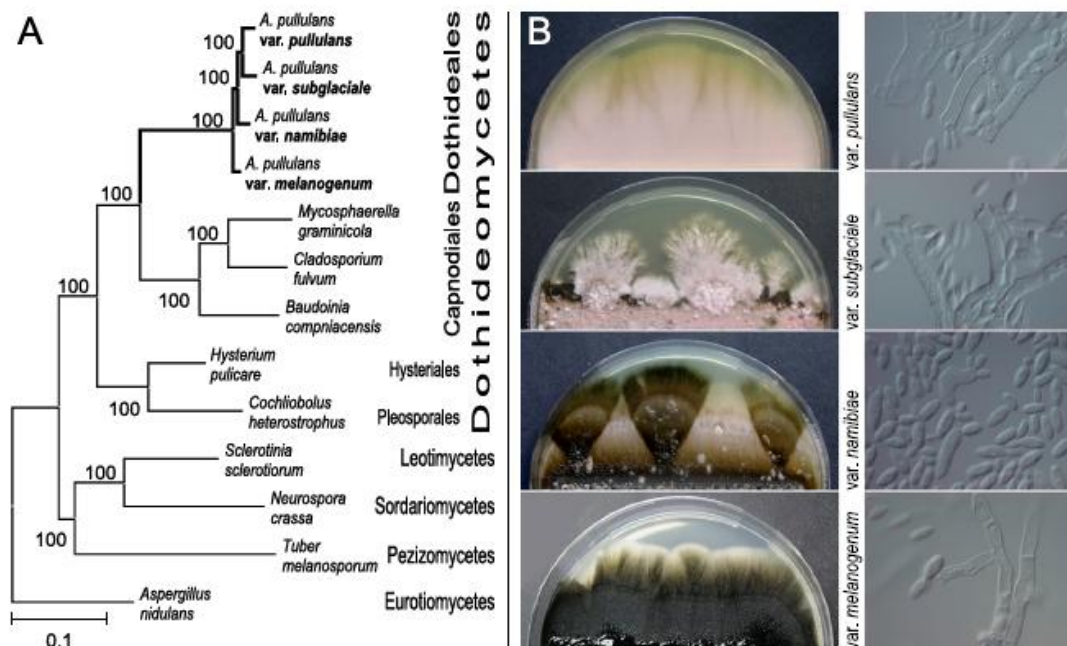
Pululan proizvode određeni sojevi polimorfne gljive *Aureobasidium pullulans* (De Bary) Arnaud (ranije nazivane i *Pullularia pullulans* (De Bary) Berkhout ili *Dematium pullulans* (De Bary)) kao egzopolisaharid rastvoran u vodi (Singh et al., 2008).

*Aureobasidium pullulans* je oligotrofna gljiva koja je veoma zastupljena u prirodi: nalazi se u zemljištu, u vodi i kao saprofit na lišću, drveću i drugim biljnim organima. Takođe, može se naći i u osmotski stresnim uslovima: u vodama u kojima su visoke koncentracije soli i na stenama (Zalar et al., 2008). Izolati ovog mikroorganizma proizvode različite degradativne enzime: amilazu, proteazu, esterazu, pektinazu i hemicelulazu (ksilanazu i mananazu), a neki pigmentisani sojevi (crvene, žute, roze ili ljubičaste boje) su mikrobiološki proizvođači endoksilanaza sa visokim prinosom (Singh et al., 2008).

*A. pullulans* je polimorfna gljiva koja ima različite morfološke forme: kvascu – slične ćelije, blastospore, hlamidospore i micelijum (Ronen et al., 2002). Jedna od nepoželjnih osobina *A. pullulans*, sa tehnološke tačke gledišta, je produkcija jedinjenja sličnog melaninu koje može biti tamno zelene do crne boje. Druga nepovoljna karakteristika se uočava tokom submerznog gajenja kulture: kako fermentacija napreduje, viskozitet ćelijske suspenzije se smanjuje usled smanjenja prosečne molekulske mase akumuliranog ekstracelularnog pululana (Singh et al., 2008).

*A. pullulans* je nekada svrstavan u klasu *Deuteromycetes* ili *Fungi Imperfecti*. U novije vreme, opisuje se kao filamentozna askomiceta (*Euascmycetes*, red *Dothideales*, familija *Dothideaceae*) koja ima sposobnost kvascu – sličnog rasta u kulturi (Singh et al., 2008). Postoji pet varijeteta ove vrste (var. *pullulans*, var. *melanogenum*, var. *aubasidani* Yurlova, var. *subglaciale*, var. *namibiae*) koji se razlikuju po molekulskim karakteristikama, fiziologiji ishrane i strukturi produkovanih polisaharida (Ma et al., 2014). Varijeteti pokazuju razlike u strukturi EPS, a u zavisnosti od sastava hranljive

podloge dobijaju se različiti polisaharidi. Produkcija pululana je stimulirana prisustvom amonijum-sulfata kao izvora azota kod varijeteta *pullulans*, dok je natrijum-nitrat optimalan za produkciju aubazidana od strane varijeteta *aubasidani* Yurlova (Yurlova i de Hoog, 1997). Makromorfologija i filogenetska povezanost različitih varijeteta *A. pullulans* prikazana je na slici 2.15.



Slika 2.15. Varijeteti *A. pullulans*: filogenetska povezanost četiri varijeteta i njihov filogenetski položaj dobijen poravnanjem odabranih gljivičnih proteoma (A); makromorfologija različitih varijeteta inkubiranih 30 dana na sladnom agaru i mikroskopije sedmodnevnih kultura (B)

Preuzeto iz: Zalar et al., 2008

Pored *Aureobasidium pullulans*, postoje i drugi mikroorganizmi koji produkuju pululan (tabela 2.3.).

Tabela 2.3. Mikrobiološki izvori pululana

Mikroorganizam	Literatura
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Leathers, 2003
<i>Cryphonectria parasitica</i>	Forabosco et al., 2006
<i>Cytaria darwinii</i>	Oliva et al., 1986
<i>Cytaria harioti</i>	Oliva et al., 1986
<i>Rhodotorula bacarum</i>	Chi i Zhao, 2003
<i>Teloschistes flavicans</i>	Reis et al., 2002
<i>Tremella mesenterica</i>	Fraser i Jennings, 1971

#### 2.3.4.3. Produkcija pululana

Produkcija pululana zavisi od parametara fermentacije, soja mikroorganizma i njegovog morfološkog stanja. Na industrijskom nivou, ovaj polisaharid se proizvodi fermentacijom vodenog rastvora skroba u specifičnim uslovima, pomoću nepatogenog i netoksičnog soja *A. pullulans* koji nije genetski modifikovan.

U komercijalnoj proizvodnji, *A. pullulans* se gaji na podlozi koja sadrži hidrolizat skroba u koncentraciji 10-15%. Podloga za fermentaciju sadrži pepton, fosfate i osnovne soli, a početna pH vrednost je 6,5 (vrednost pH opada tokom prva 24 časa fermentacije do 3,5). Vitamini (biotin, tiamin) i minerali (hlorid, mangan, gvožđe) takođe utiču na produkciju EPS (Singh et al., 2008). Dodavanje natrijum-nitrata hranljivoj podlozi pospešuje produkciju pululana (Ravella et al., 2010), dok je cikloheksimid inhibira (Singh et al., 2008). Maksimalan rast kulture se postiže tokom 75 h, a optimalni prinos pululana nakon 100 h. Inokulisana podloga se meša i aeriše, a optimalna temperatura za rast i produkciju je 24-30 °C, zavisno od upotrebljenog mikroorganizma. Produkcija pululana varira među sojevima: 1,3-52,5 g/L, a prinos može biti i veći od 70% u odnosu na inicijalni supstrat.

Brojna su istraživanja uslova pod kojima dolazi do efikasne hiperprodukcije pululana: „screening” sojeva visoke produktivnosti (Ma et al., 2014), optimizacija uslova fermentacije (Choudhury et al., 2012; Yu et al., 2012), razjašnjavanje mehanizama hiperprodukcije pululana (Jiang et al., 2011; Duan et al., 2008). Nizak prinos i spora produkcija pululana „batch” fermentacijom su ograničenja koja su prevaziđena upotrebom „fed-batch” i kontinualnih fermentora. Međutim, ovi procesi zahtevaju prekomernu potrošnju supstrata za rast ćelija, što smanjuje količinu šećera dostupnu za biosintezu pululana. Biokonverzija imobilizovanim enzimima i ćelijama ima potencijal u ostvarivanju znatno većih prinosa proizvoda, a biokonverzija glukoze pomoću imobilizovanih ćelija *A. pullulans* predstavlja atraktivan pristup u produkciji pululana (Ju et al., 2015).

Uslovi fermentacije – izvor ugljenika i azota, koncentracija rastvorenog kiseonika, temperatura, pH vrednost, konfiguracija fermentora (Jiang, 2010; McNeil i Kristiansen, 1990; Vijayendra et al., 2001) i selekcija sojeva su parametri koji su značajni za dobijanje pululana velikih molekulskih masa koji ne sadrži primese melanina. Ćelije mikroorganizma se uklanjaju iz razblažene fermentacione tečnosti filtracijom, a melanin tretiranjem aktivnim ugljem. Pululan se izoluje i prečišćava taloženjem organskim rastvaračima, najčešće etanolom. Može se dodatno prečistiti ultrafiltracijom ili pomoću jonoizmenjivača.

Izbor izvora ugljenika i njegova koncentracija u hranljivoj podlozi imaju najznačajniju ulogu u produkciji pululana (Seo et al., 2004; Singh et al., 2008). Pululan se može sintetisati iz različitih ugljenohidratnih supstrata, koji mogu biti u sastavu definisanih (sintetičkih) ili nedefinisanih podloga (agro-industrijskog otpada). Pored glukoze, *A. pullulans* za rast može da koristi i saharozu, manozu, galaktozu, maltozu, fruktozu, dok upotreba sekundarnih industrijskih sirovina (melase, pulpe grožđa, hidrolizata skroba, ostataka maslinovog ulja i sl.) u proizvodnji pululana ima brojne ekonomske prednosti i daje veće ili jednake prinose u poređenju sa konvencionalnim supstratima (Cheng et al., 2011). Pululan dobijen na ovaj način je vrlo heterogen po sastavu i molekulskoj masi.

Enzimi koji učestvuju u biosintezi pululana još uvek nisu identifikovani u potpunosti. Visoki prinosi fermentacije su povezani sa aktivnošću  $\alpha$ -fosfoglukozomutaze, UDP-glukozopirofosforilaze i glukoziltransferaze kod *A. pullulans* koji raste na različitim

šećerima (Chi et al., 2009). Manji prinos polisaharida u fermentacijama kod kojih se u sastavu hranljivih podloga nalaze fruktoza i ksiloza može da bude posledica dužeg biosintetskog puta koji vodi od ovih monosaharida do UDP-glukoze.

Postoje brojna istraživanja bioloških mehanizama biosinteze egzopolisaharida kod bakterija, ali relativno malo se zna o biosintezi pululana od strane *A. pullulans*. Rasvetljavanjem biosinteze pululana i njene regulacije, moći će da se poveća prinos dobijenog pululana primenom metoda molekularne biologije.

#### 2.3.4.4. Mehanizam biosinteze pululana

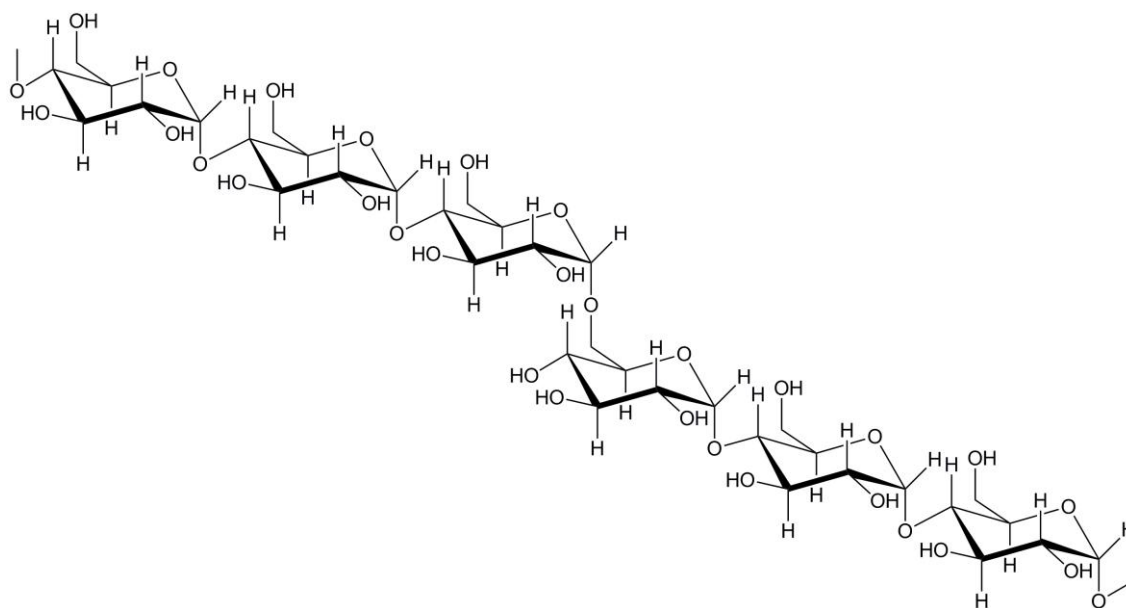
U zavisnosti od uslova kultivacije, najviše od izvora ugljenika i azota, *A. pullulans* se nalazi u filamentoznoj i/ili celularnoj formi. Već u prvim pokušajima rasvetljavanja biosinteze pululana uočeno je da *A. pullulans* proizvodi dva različita egzopolisaharida. Jedan je pululan, a drugi se opisuje kao želatinozni materijal nerastvoran u vodi. Metodama elektronske mikroskopije utvrđeno je da su oba polisaharida lokalizovana na spoljašnjoj strani hlamidiospora, ćelija koje se smatraju glavnim producentom pululana u prirodnim uslovima. Veoma gust periferni sloj se pripisuje lancima pululana organizovanim u mrežu koja pokriva unutrašnji sloj  $\beta$ -(1,3)-glikana sačinjenog iz glukoze i manoze (Simon et al., 1993).

Pululan se sintetiše u citosolu, a zatim se sekretuje u ekstracelularni prostor. Iako biosintetski putevi pululana nisu u potpunosti razjašnjeni, neki autori su predložili model po kome sinteza prekursora prethodi polimerizaciji. Model se zasniva na postojanju glikolipidnog intermedijera (Lph-Glc) koji nastaje vezivanjem D-glukoze za lipidni molekul, lipid-hidroperoksid sa fosfoestarskim mostom (Donot et al., 2012). Prekursori za molekul pululana se formiraju u tri glavne faze. Prva faza je formiranje Lph-Glc preko intermedijera uridindifosfat-glukoze (UDPG), koja je posredovana ATP-om. U drugoj fazi vrši se transfer sledeće glukoze iz UDPG i formira se molekul izomaltoze (LPh-Glc-(1,6)-Glc). U poslednjoj fazi, izomaltoza interaguje sa glikozil-lipidnim prekursorom iz prve faze i nastaje molekul izopanoze (LPh-Glc-(1,6)-Glc-(1,4)-Glc). Molekuli izopanoze se dalje polimerizuju do pululana (Shingel, 2004).



### 2.3.4.5. Struktura pululana

Pululan je linearni polisaharid koji se sastoji od ponavljajućih jedinica maltotrioze povezanih  $\alpha$ -(1,6)-glikozidnim vezama (slika 2.16.). Alternativno, strukturna formula pululana može biti predstavljena sekvencom panoza povezanih  $\alpha$ -(1,4)-vezama. Ovaj podatak se čini tačnijim ako se uzme u obzir mehanizam biosinteze pululana. U molekulu pululana su uočene manje strukturne nepravilnosti: hidrolizom ovog glukana endo- i egzoenzimima nastaju fragmenti koji su rezistentni na dalje dejstvo tih enzima. Ova pojava je objašnjena prisustvom maltotetraoznih jedinica koje su nasumično distribuirane duž polisaharidnog lanca. Međutim, ove strukturne nepravilnosti generalno ne utiču na fizičko-hemijske osobine pululana (Donot et al., 2012).



Slika 2.16. Struktura pululana

#### 2.3.4.6. Hemijske modifikacije pululana

Pululan može biti modifikovan hemijskim vezivanjem različitih funkcionalnih grupa za hidroksilne grupe osnovnog niza (Kumar et al., 2012). U molekulu pululana, prosečno devet hidroksilnih grupa po ponavljajućoj jedinici je dostupno za supstituciju, a njihova reaktivnost zavisi od prirode rastvarača i polarnosti reagenasa (Shingel, 2004). Primeri hemijskih modifikacija pululana prikazani su u tabeli 2.4.

#### 2.3.4.7. Primena pululana

Zbog svojih jedinstvenih osobina – biorazgradivosti, formiranja viskoznih vodenih rastvora bez ukusa i mirisa, elektroneutralnosti i netoksičnosti, pululan se može koristiti kao ekološka ambalaža za prehrambene proizvode (Singh et al., 2008). Upotrebljava se za enzimsku proizvodnju maltotrioznog sirupa (Singh et al., 2010a; Singh et al., 2010b; Singh et al., 2011). Može se oblikovati u filmove koji su jestivi, nepropusni za kiseonik i mikroorganizme i dobro rastvorni u vodi (Leathers, 2003). U različitim prehrambenim proizvodima se koristi kao adheziv, emulgator, stabilizator, vezivo, lubrikant i gelirajući agens (Singh et al., 2008).

Utvrđeno je da je za adekvatnu bioaktivnost pululana neophodna odgovarajuća molekulska masa i njena distribucija. Pululan mase 60 kDa se može koristiti kao zamena za krvnu plazmu. Molekuli mase manje od 15 kDa mogu da izazovu oštećenja bubrega, dok oni čija je masa veća od 150 kDa dovode do povećanja venskog pritiska (Singh et al., 2015). Ovaj polisaharid se delimično vari u humanom digestivnom traktu, zbog čega se pokazao kao dobar prebiotik. Koristi se i kao dodatak u niskokaloričnim pićima, pekarskim proizvodima i dezertima. Neke od brojnih aplikacija pululana, zahvaljujući njegovoj netoksičnosti, neimunogenosti i nekancerogenosti, su: ciljane dostava lekova i gena, inženjering tkiva, pospešivanje zarastanja rana, primena u vakcinama, omotačima kapsula i ekspanderima krvne plazme (Shingel, 2004).

Neke od oblasti u kojima je istraživana primena derivata pululana su navedene u tabeli 2.5.

Tabela 2.4. Primeri hemijskih modifikacija pululana

Tip reakcije	Hemijska struktura supstituisanog pululana (Pul-OH)
Amidacija	Pul-O-CO-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -NH-CO-holesterol
Azido-pululan	Pul-CH <sub>2</sub> -N <sub>2</sub>
Derivati uretana	Pul-O-CO-NH-fenil Pul-O-CO-NH-heksil
Esterifikacija	Pul-O-CO-CH <sub>3</sub> (acetilovanje) Pul-O-CO-CH <sub>2</sub> -Cl (hloroacetilovanje) Pul-O-CO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH (sukcinitilacija) Pul-O-CO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO-holesterol Pul-stearat PulA (pululan acetat)-folat Pul-biotin
Eterifikacija	Pul-O-CH <sub>3</sub> (permetilovanje) Pul-O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2,3</sub> -CH <sub>3</sub> (alkilovanje) Pul-O-CH <sub>2</sub> -COOH (karboksimetilovanje) Pul-O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2,3</sub> -CH <sub>2</sub> -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> (katjonizacija) Pul-O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CN (cijanoetilovanje) Pul-O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>1,4</sub> -Cl (hloroalkilovanje) Pul-O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -SOCH <sub>3</sub> (sulfiniletilovanje)
Karboksimetil pululan / amidacija	Pul-O-CH <sub>2</sub> -CO-NH-CH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> -CH <sub>3</sub> Pul-O-CH <sub>2</sub> -O-CO-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -poli(metakrilat) Pul-O-CH <sub>2</sub> -O-CO-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -poli(metilmetakrilat)
Karboksimetil pululan / hidrazon derivatizacija	Pul-O-CH <sub>2</sub> -CO-NH-doksorubicin Pul-O-CH <sub>2</sub> -CO-NH-antitelo
Kopolimerizacija	Pul-O-CH <sub>2</sub> -O-CO-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -R R = poli(hidroksietilmetakrilat), poli(sulfopropilmetakrilat), poli(butilmetakrilat), poli(N-izopropilakrilamid)
Oksidacija	Pul-COOH (C <sub>6</sub> oksidacija) Otvaranje glikozidnog prstena (perjodatna oksidacija)
Sulfatacija	Pul-O-SO <sub>3</sub> Na

Tabela 2.5. Primena derivata pululana

<b>Derivat pululana</b>	<b>Sadašnja ili potencijalna primena</b>	<b>Literatura</b>
Pululan-alginat filmovi	Zadržavanje vlage, očuvanje teksture i ukusa hrane	Pan et al., 2014
Filmovi pululana i proteina surutke	Pakovanje hrane	Khanzadi et al., 2015
Celuloza-pululan bionanokompoziti	Pakovanje hrane	Cozzolino et al., 2014
Antibakterijski filmovi pululana	Konzerviranje hrane	Kandemir et al., 2005; Gounga et al., 2008
3-Aminopropiltrimetoksisilan-pululan	Antibakterijski transparentni filmovi	Fernandes et al., 2014
Polialdehidni derivat pululana	Nosači lekova	Bruneel i Schacht, 1993
Palmitoil- i holesteril- derivati	Hidrofobni reaktanti; Nosači za hidrofobne lekove	Nishikawa et al., 1994; Singh et al., 2015
Karboksimetil-pululan gel	Prevlačenje rana; Dostava lekova	Li et al., 2011; Singh et al., 2015
Pululan-acetat u formi nanočestica	Oralna dostava lekova	Ravi et al., 2014
Mikrosfere, nanočestice i nanogelovi pululana	Dostava lekova	Singh et al., 2015
Pululanska smeša	Dostava lekova i gena	Suginoshita et al., 2002; San Juan et al., 2009; Boridy et al., 2009
Polietilenimin-pululan	Dostava gena	Singh et al., 2015
Anjonski modifikovan pululan	Supstituent krvne plazme	Shingel i Petrov, 2002
Heparin-pululan konjugat	Inženjering ćelija / tkiva	Na et al., 2003
Metakrilat-pululan gel	Ćelijska proliferacija i formiranje klastera	Bae et al., 2011
Pululan gel	Elektroforeza	Olmo et al., 2008
2-nitroalkil-pululan estar	EPS sa amino – funkcijama	Heeres et al., 2000

### 2.3.5. Levan

Fruktani su polisaharidi koji se nalaze u mnogim vrstama biljaka i mikroorganizama. Strukturna organizacija svih poznatih fruktana se bazira na (2,1) i/ili (2,6)-vezanim  $\beta$ -D-fruktofuranoznim jedinicama sa jednim glukoznim ostatkom na kraju ili u sredini polisaharidnog niza. Polifruktozidi se uopšteno mogu podeliti na dve grupe: levane, kod kojih su predominantne  $\beta$ -(2,6)-glikozidne veze, i inulin, kod koga je najzastupljenija  $\beta$ -(2,1)-veza. I inulin i levani su veoma rasprostranjeni u carstvu biljaka, gde se javljaju kao linearni i razgranati polimeri relativno niskih molekulskih masa (Dahech et al., 2013).

Levan je homopolisaharid koga produkuje veliki broj mikroorganizama tokom asimilacije saharoze, a takođe i određen broj biljaka kod kojih ima ulogu rezervnog polisaharida, slično skrobu ili saharozi. Kod mikroorganizama ovaj polifruktozan ima ulogu u formiranju egzopolisaharidnog matriksa i biofilmova (Franken et al., 2013).

#### 2.3.5.1. Osobine levana

Levan je beli praškast materijal koji ima osobine jakog adheziva. Njegove čestice su sfernog oblika prečnika 75-200 nm, gusto pakovane. Sastav i osobine levana zavise od sredine u kojoj raste mikroorganizam koji ga proizvodi, a njegova opšta svojstva su slična kao kod dekstrana. Levan je levorotatoran, amorfne ili mikrokristalne strukture. Dobro je rastvoran u vreloj vodi, dok je rastvorljivost u hladnoj vodi različita kod levana koji su dobijeni iz različitih izvora. Nerastvoran je u gotovo svim organskim rastvaračima: metanolu, etanolu, izopropanolu, n-propanolu, acetonu, metiletiketonu, toluenu, polietilen-glikolu, dimetilformamidu i drugim. Vodeni rastvori ovog fruktana imaju neuobičajeno nizak viskozitet u poređenju sa drugim molekulima velikih molekulskih masa. Molekulska masa levana zavisi od vrste mikroorganizma koji ga produkuje i parametara fermentacije i nalazi se u opsegu od 11 kDa (levani niskih molekulskih masa kod *B. subtilis* (natto) Takahashi) (Shih et al., 2010) do  $2,5 \cdot 10^4$  kDa (Arvidson et al., 2006). Molekulska masa i viskozitet vodenih rastvora se povećavaju u

prisustvu određenih soli, a opadaju već sa malim sniženjem temperature (Gupta et al., 2011). Levan je stabilan na visokim temperaturama, a tačka topljenja mu je 225 °C.

Ovaj polisaharid je biokompatibilan, netoksičan i biorazgradiv, sa antioksidativnim, antiinflamatornim i antikancerogenim osobinama (Srikanth et al., 2015). Koristi se kao izvor fruktooligosaharida koji su od izuzetnog značaja zbog svojih povoljnih svojstava – niskokalorični su, nekancerogeni i predstavljaju faktore rasta za mikroorganizme intestinalne flore, što levan čini izuzetnim prebiotikom (Belghith et al., 2012).

### 2.3.5.2. Mikrobiološki izvor levana

Produkcija egzopolisaharida levana je karakteristika brojnih mikroorganizama, od kojih su najviše izučavani *Zymomonas mobilis* i neke vrste roda *Bacillus*. Primeri mikroorganizama koji produkuju levan prikazani su u tabeli 2.6.

*Bacillus licheniformis* je G<sup>+</sup> štapićasta sporogena bakterija koja proizvodi levan u obliku egzopolisaharida. U prirodi je veoma rasprostranjena kao saprofit: nalazi se u zemljištu, čak i u predelima siromašnim hranljivim supstancama, kao što su pustinje i tresetišta. Često se nalazi i u hrani, posebno u žitaricama, a spore ove bakterije se mogu naći u obrađenim ili sušenim namirnicama, kao što su kakao i začini (de Boer et al., 1994). Za razliku od većine bacila koji su predominantno aerobi, *B. licheniformis* je fakultativni anareob, a pojedini izolati ovog mikroorganizma mogu da vrše denitrifikaciju. Kao i većina vrsta roda *Bacillus*, u spoljašnju sredinu sekretuje veliki broj hidrolitičkih enzima, što omogućava ćelijama da razgrađuju različite supstrate i rastu na velikom broju hranljivih izvora (Rey et al., 2004).

Tabela 2.6. Primeri mikroorganizama koji produkuju levan

Mikroorganizam	Literatura
<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	Lim et al., 2001
<i>Bacillus licheniformis</i>	Ghaly et al., 2007
<i>Bacillus methylotrophicus</i>	Zhang et al., 2014
<i>Bacillus subtilis</i>	Esawy et al., 2013
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Inthanavong et al., 2013
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Molinari i Boiardi, 2013
<i>Halomonas spp.</i>	Poli et al., 2009
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Sims et al., 2011
<i>Microbacterium laevaniformans</i>	Moosavi – Nasab et al., 2010; Bae et al., 2008
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Jathore et al., 2012
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Franken et al., 2013
<i>Serratia levanicum</i>	Kikuchi et al., 2010
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Linde et al., 2012
<i>Zymomonas mobilis</i>	Silbir et al., 2014; de Paula et al., 2008; de Oliveira et al., 2007

U okviru roda *Bacillus*, grupa u koju je svrstan *B. licheniformis* se sastoji od pet fiziološki sličnih vrsta: *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* i *B. subtilis* (de Boer et al., 1994). *B. licheniformis* se može izolovati od ostalih vrsta roda *Bacillus* metaboličkim i fiziološkim testovima, međutim, biohemijske i fenotipske karakteristike mogu biti veoma slične sa blisko povezanim vrstama. Taksonomskim studijama na bazi poređenja 16S rDNK i 16S-23S nukleotidnih sekvenci unutrašnjih transkribovanih spejsera (eng. internal transcribed spacer) ustanovljeno je da je *B. licheniformis* blisko povezan sa *B. amyloliquefaciens* (9-15% homologije DNK) (Xu i Côté, 2003). Za razliku od ostalih vrsta, *B. licheniformis* može da raste u anaerobnim uslovima, produkuje arginin-dehidrolazu, hidrolizuje skrob i može da koristi propionat kao izvor ugljenika (de Boer et al., 1994).

Brojne su komercijalne i agronomske primene *B. licheniformis* i njegovih ekstracelularnih proizvoda. Decenijama se upotrebljava u industrijskoj proizvodnji enzima (proteaza,  $\alpha$ -amilaze, penicilinaze, pentozanaze, cikloglukoziltransferaze,  $\beta$ -mananaze i nekoliko pektinolitičkih enzima) koje sekretuje u velikim količinama (20-25 g/L) (Parrado, 2014). Određeni sojevi se koriste u proizvodnji peptidnih antibiotika (bacitracina i proticina), kao i limunske kiseline, inozina i poli- $\gamma$ -glutaminske kiseline.

### 2.3.5.3. Produkcija levana

Faktori koji utiču na produkciju levana su: izvor ugljenika i azota, pH vrednost, intenzitet mešanja i aeracije i temperatura na kojoj se odvija fermentacija.

Mikrobiološka produkcija levana se odvija u prisustvu saharoze (Silbir et al., 2014), ali i drugih supstrata baziranih na fruktozi: melase (Küçükaşık et al., 2011; de Oliviera et al., 2007), soka šećerne trske (Borsari et al., 2006), šećerne repe (Bekers et al., 2001), surutke (Macedo et al., 2002) i sličnih alternativnih izvora ugljenika. Energija neophodna za sintezu polimera se obezbeđuje hidrolizom glikozidne veze disaharida, što je i osnovni razlog zbog kojeg u prisustvu fruktoze kao jedinog izvora ugljenika nastaju mali prinosi levana (Keith et al., 1991). Najviši prinosi se dobijaju upotrebom saharoze kao jedinog izvora ugljenika u koncentracijama 50-200 g L<sup>-1</sup>, a uočeno je da visoke koncentracije ovog supstrata (preko 400 g L<sup>-1</sup>) dovode do smanjenja produkcije levana (Mariya Divya i Sugumaran, 2015; Kekez et al., 2015).

Izvori azota koji se upotrebljavaju u fermentacijama mikroorganizama producenata levana mogu biti različiti: organski – ekstrakt kvasca, pepton (Silbir et al., 2014; Liu et al., 2010b) ili neorganski – amonijum-hlorid, amonijum-sulfat (Kekez et al., 2015; Mariya Divya i Sugumaran, 2015). Inicijalna pH vrednost fermentacione podloge ima značajnu ulogu u ćelijskom rastu i produkciji polisaharida, jer utiče na ćelijsku membranu, morfologiju i strukturu ćelije, unos hranljivih supstanci i biosintezu egzopolisaharida (Liu et al., 2009). Optimalna pH vrednost za produkciju levana se razlikuje od optimalne pH vrednosti za rast biomase i zavisi od vrste mikroorganizma koji se koristi za fermentaciju. Optimalna temperatura za rast biomase i produkciju



levana takođe zavisi od mikroorganizma producenta. Uopšteno, optimalna temperatura za produkciju levana je ispod 30 °C, dok je optimalna temperatura za rast mikroorganizma nešto veća, 35-37 °C (Kekez et al., 2015).

#### 2.3.5.4. Mehanizam biosinteze levana

Enzim levan-saharaza (EC 2.4.1.10), takođe poznat i kao saharoza-6-fruktoziltransferaza,  $\beta$ -(2,6)-fruktoziltransferaza ili  $\beta$ -(2,6)-fruktan:D-glukoza 1-fruktoziltransferaza (Donot et al., 2012), uočen je kod velikog broja mikroorganizama kao aktivna komponenta u metabolizmu saharoze. Fruktoziltransferaze su grupa enzima koji imaju hidrolitičku i transferaznu aktivnost. Transferaznom aktivnošću nastaju fruktooligosaharidi, usled delovanja enzima na saharozu, raskidanja  $\beta$ -(1,2)-veza i transfera fruktozil-grupe na akceptor kao što je saharoza, pri čemu se oslobađa jedan molekul glukoze (Belghith et al., 2012). Selektivnost između transferazne i hidrolitičke aktivnosti zavisi od različitih faktora, kao što su: izvor enzima, temperatura (Jang et al., 2001), početna koncentracija saharoze (Korakli et al., 2003) i prisustvo organskih rastvarača u reakcionom medijumu (Kim et al., 1998).

Većina levan-saharaza su ekstracelularni monomerni enzimi sa molekulskom masom 46-73 kDa, a izuzetak su enzimi sojeva *Rahnella aquatilis* JMC-1683, *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC i *Actinomyces viscosus* T-14 V koji formiraju dimere i prema tome imaju veće molekulske mase (Velázquez-Hernández et al., 2009). Vrednosti pI za levansaharaze su 2,6-5,5, dok su optimalne pH vrednosti za aktivnost enzima 5,0-6,2. Vrednosti Michaelis – Menten konstante su u opsegu 4-160 mmol L<sup>-1</sup>, a postojanje kofaktora je uočeno kod enzima poreklom iz *Lactobacillus reuteri*, *Leuconostoc mesenteroides* i *Bacillus subtilis*, kojima je za aktivnost neophodno prisustvo Ca<sup>2+</sup> jona (van Hijum et al., 2004; Ozimek et al., 2005; Morales-Arrieta et al., 2006).

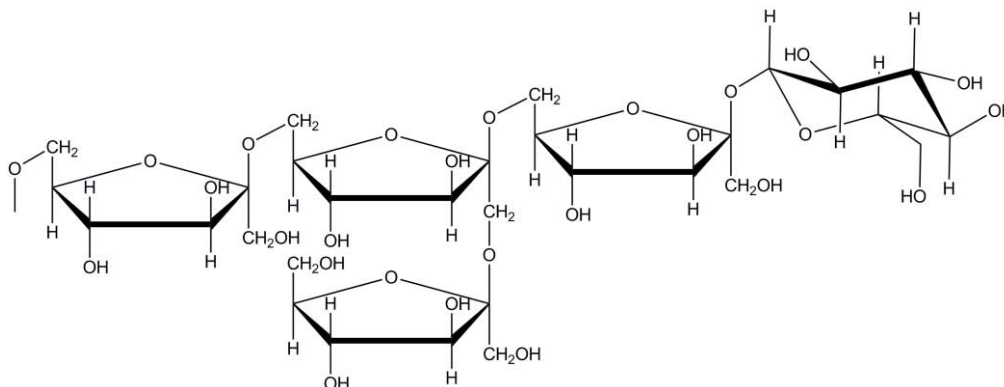
Postoje brojna istraživanja uslova koji utiču na ćelijski rast i produkciju levan-saharaze kod mikroorganizama. Osobine mikrobne fruktoziltransferaze mogu da variraju u

zavisnosti od mikrobnog soja i sastava hranljive podloge, najviše od izvora ugljenika koji ima ulogu indukujućeg agensa (Wang i Rakshit, 2000; Nguyen et al., 2005).

Pokazano je da je saharoza najbolji supstrat za ćelijski rast i produkciju enzima. Male koncentracije saharoze (1-10%) se smatraju optimalnim za ćelijski rast, dok visoke koncentracije dovode do veće indukcije enzima, ali i inhibicije ćelijskog rasta. Visoka produkcija levan-saharaze se ostvaruje pri koncentracijama saharoze od oko 30% w/v. Sa povećanjem koncentracije saharoze raste i aktivnost enzima, ali je pri veoma visokim koncentracijama supstrata favorizovana hidroliza u odnosu na transferazne reakcije, koje mogu biti i potpuno inhibirane (Belghith et al., 2012). Prema drugim šećerima (npr. fruktozi, manozni, rafinozi, maltozi), enzim pokazuje veoma malu aktivnost. Izvor azota predstavlja važan faktor u produkciji levan-saharaze, a optimalnim se smatra ekstrakt kvasca. Amonijum-sulfat i amonijum-nitrat su komponente podloge koje ograničavaju produkciju ovog enzima (Balasubramaniam et al., 2001). Maksimalna produkcija levan-saharaze kod *Bacillus spp.* je uočena na 50 °C. Na toj temperaturi enzim je stabilan i ima maksimalnu aktivnost. Takođe, prisustvo metalnih jona i detergenata značajno utiče na produkciju i aktivnost enzima: joni  $Mg^{2+}$  i  $Fe^{2+}$  povećavaju aktivnost, dok je  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , natrijum-dodecilsulfat i ditiotreitol smanjuju (Belghith et al., 2012).

#### 2.3.5.5. Struktura levana

Levan je homopolisaharid koji se sastoji od D-fruktofuranoznih ostataka vezanih  $\beta$ -(2,6)-glikozidnim vezama koji čine osnovni niz na čijem neredukujućem kraju se nalazi jedan ostatak D-glukoze (slika 2.17.). U njegovoj strukturi mogu biti prisutna grananja koja se ostvaruju preko  $\beta$ -(2,1)-veza kojih ima oko 12%. Grane su obično kratke i često se sastoje od samo jednog ostatka fruktoze. Uopšteno, levani koji potiču od različitih organizama imaju slične strukture. Razlike mogu biti u stepenu polimerizacije i učestalosti grananja (Gupta et al., 2011).



Slika 2.17. Struktura levana

### 2.3.5.6. Primena levana

Levan se od drugih polisaharida razlikuje po niskom viskozitetu vodenih rastvora, rastvorljivosti u lipidima, stabilnosti na visokim temperaturama i u baznim uslovima. Zbog ovih svojstava, može da se koristi kao stabilizator, emulgator, krioprotektor, sredstvo za zgušnjavanje, enkapsulaciju i osmoregulaciju u prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj i hemijskoj industriji (Sima et al., 2011).

U medicini, levan se koristi kao zamena za krvnu plazmu, radio-protektor, antitumorski i antihiperlipidemijski agens. Može da se koristi kao nosač za peptidne i proteinske lekova (Sezer et al., 2011). Povećanim unosom levana smanjuje se pH vrednost i  $\beta$ -glukuronidazna aktivnost u intestinumu i povećava se broj bifidobakterija i kratkolančanih masnih kiselina u kolonu. Na taj način se stimuliše rast mlečnokiselinskih bakterija i kolon se štiti od kancerogenih supstanci. Takođe, pokazano je da levan ima imunomodulatorni efekat na makrofage, B i T ćelije i da efikasno ubija izvestan broj tumorskih ćelija, zbog čega se može koristiti za smanjivanje tumorske mase kao pripreme za imunoterapiju (Srikanth et al., 2015).

Nesvarljivi oligosaharidi, posebno fruktooligosaharidi, stimulatívno deluju na rast specifičnih grupa bakterija u sastavu crevne flore. Levan se u uslovima kisele hidrolize fragmentiše, zbog čega se smatra da ovaj polisaharid ima svojstva prebiotika (Dal Bello et al., 2001). Suvi levan, nehigroskopni prah koji se sporo rastvara u vreloj i hladnoj

vodi, predstavlja netoksično i nemutageno dijetetsko vlakno koje pomaže u održavanju zdrave mikroflore creva povećavanjem populacije određenih bakterija (*Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*).

Primeri primene derivata levana prikazani su u tabeli 2.7.

Tabela 2.7. Primena derivata levana

Derivat levana	Sadašnja ili potencijalna primena	Literatura
Polietilenglikol-levan dvofazni tečni sistem	Prečišćavanje biološkog materijala (goveđi serum albumin, albumin jajeta)	Chung et al., 1997
Oksidovani levan	Nanostruktuirani filmovi (dostava lekova, agensi za prevlačenje u raznim industrijama)	Sima et al., 2011
Umreženi levan	Adheziv	Srikanth et al., 2015
Derivatizacija katjonskim supstituentima	Sredstva za ličnu higijenu	Gunn et al., 2009
Levan-sulfat; Levan-fosfat; Levan-acetat	Inhibitori proliferacije glatkih mišića; Anti-HIV agensi; Subkutana dostava lekova	Garegg i Roberts, 1998
Acetilovani levan; Fosforilovani levan; Benzoilovani levan	Antioksidansi; Antitumorski agensi	Liu et al., 2012

## 2.4. Antibiotici

Antibiotici su niskomolekulski sekundarni mikrobni metaboliti koji u niskim koncentracijama inhibiraju rast drugih mikroorganizama. Sintetišu ih brojne bakterije i gljive i nisu neophodni za rast organizma producenta (Bérdy, 2005).

Aktinomicete su G+ bakterije koje predstavljaju izvor oko 60% do sada otkrivenih antibiotika mikroorganizama, a među njima 80% čine vrste roda *Streptomyces* (Bérdy, 2005). Procenjuje se da streptomicete proizvode oko 250000 različitih biološki aktivnih jedinjenja, u koje spadaju i neki značajni antitumorski, antiparazitski agensi i imunosupresivi (Watve et al., 2001).

Antimikrobna aktivnost antibiotika se izražava u mikromolarnim, ponekad čak i nanomolarnim koncentracijama, što je posledica njihove velike specifičnosti. Parametar koji se koristi za izražavanje antimikrobne aktivnosti je minimalna inhibitorna koncentracija (MIK). MIK se definiše kao najniža koncentracija antibiotika pri kojoj, nakon odgovarajućeg perioda inkubacije, nema vidljivog rasta ispitivanog mikroorganizma. Vrednost MIK je karakteristika svakog antibiotika prema određenom mikrobnom soju.

Prema hemijskoj strukturi, antibiotici su veoma heterogena grupa prirodnih proizvoda. U tabeli 2.8. je navedena klasifikacija po Berdy-u (Bérdy, 1974) koja najbolje odražava ovu složenost.

Prema mehanizmu dejstva, antibiotici se dele na: antibiotike koji inhibiraju metabolizam mikroorganizama (inhibicijom enzima, biosinteze DNK ili proteina), antibiotike koji inhibiraju sintezu ćelijskog zida i antibiotike koji narušavaju permeabilnost ćelijske membrane. Primeri nekih mehanizama dejstva, kao i mehanizama rezistencije osetljivih mikroorganizama prikazani su u tabeli 2.9.

Tabela 2.8. Klasifikacija antibiotika po Berdy-u

Osnovni kodni broj	Grupa antibiotika
1	Antibiotici ugljeni hidrati
1.1	Čisti saharidi
1.2	Aminoglikozidi
1.3	Drugi (O- i N-) glikozidi
1.4	Različiti derivati šećera
2	Makrociklični laktoni
2.1	Makrolidni antibiotici
2.2	Polienski antibiotici
2.3	Drugi makrociklilaktonski antibiotici Makrolaktamski antibiotici
2.4	Makrolaktamski antibiotici
3	Hinoni i slični antibiotici
3.1	Linearno kondenzovana policiklična jedinjenja
3.2	Naftohinonski derivati
3.3	Benzohinonski derivati
3.4	Različita jedinjenja slična hinonu
4	Aminokiseline, peptidni antibiotici
4.1	Derivati aminokiselina
4.2	Homopeptidi
4.3	Heteromerni peptidi
4.4	Peptolidi
4.5	Peptidi visoke molekulske mase
5	Heterociklični antibiotici koji sadrže azot u prstenu
5.1	Nekondenzovani heterocikli
5.2	Kondenzovani heterocikli
5.3	Alkaloidi sa antiobotskom (antitumorskom) aktivnošću

Tabela 2.8. (nastavak)

Osnovni kodni broj	Grupa antibiotika
6	Heterociklični antibiotici koji sadrže kiseonik u prstenu
6.1	Derivati furana
6.2	Derivati pirana
6.3	Derivati benzopirana
6.4	Mali laktoni
6.5	Polietarski antibiotici
7	Aliciklični antibiotici
7.1	Derivati cikloalkana
7.2	Mali terpeni
7.3	Oligoterpenski antibiotici
8	Aromatični antibiotici
8.1	Derivati benzena
8.2	Kondenzovana aromatična jedinjenja
8.3	Nebenzoidna aromatična jedinjenja
8.4	Različiti derivati aromatičnih jedinjenja
9	Alifatični antibiotici
9.1	Derivati alkana
9.2	Derivati alifatičnih karboksilnih kiselina
9.3	Alifatična jedinjenja sa sumporom i fosforom
0	Razni antibiotici (sa nepoznatim skeletom)

Tabela 2.9. Primeri mehanizama dejstva antibiotika i rezistencije osetljivih mikroorganizama

Klasa antibiotika	Primeri antibiotika	Ciljno mesto delovanja	Mehanizam rezistencije
$\beta$ -Laktami	Penicilini, cefalosporini, penemi, monobaktami	Biosinteza peptidoglikana	Hidroliza, efluks, promena ciljnog molekula
Aminoglikozidi	Gentamicin, streptomycin	Translacija	Fosforilovanje, acetilovanje, nukleotidilovanje, efluks, promena ciljnog molekula
Glikopeptidi	Vankomicin	Biosinteza peptidoglikana	Reprogramiranje biosinteze peptidoglikana
Tetraciklini	Minociklin	Translacija	Monooksigenacija, efluks, promena ciljnog molekula
Makrolidi	Eritromicin, azitromicin	Translacija	Hidroliza, glikozilovanje, fosforilovanje, efluks, promena ciljnog molekula
Streptogramini	Sinercid	Translacija	C-O liaza, acetilovanje, efluks, promena ciljnog molekula
Fenikoli	Hloramfenikol	Translacija	Acetilovanje, efluks, promena ciljnog molekula
Hinoloni	Ciprofloksacin	Replikacija DNK	Acetilovanje, efluks, promena ciljnog molekula
Pirimidini	Trimetoprim	C1 metabolizam	Efluks, promena ciljnog molekula
Sulfonamidi	Sulfametoksazol	C1 metabolizam	Efluks, promena ciljnog molekula
Rifamicini	Rifampin	Transkripcija	ADP-ribosilovanje, efluks, promena ciljnog molekula
Lipopeptidi	Daptomicin	Ćelijska membrana	Promena ciljnog molekula



### 2.4.1. Polienski antibiotici

Invazivne gljivične infekcije predstavljaju glavni uzrok visokog stepena morbiditeta i smrtnosti kod pacijenata čiji je imuni sistem narušen (Mohr et al., 2008). Njihova povećana učestalost i promene u epidemiologiji predstavljaju značajan dijagnostički i terapijski izazov u ovoj populaciji pacijenata (Mathew i Nath, 2009). Iako su *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* i *Aspergillus fumigatus* i dalje najčešći uzročnici gljivičnih oportunističkih infekcija, sve su češći slučajevi pojave retkih patogenih vrsta (*Trichosporon spp.*, *Rhodotorula spp.*, *Fusarium spp.*, *Scedosporium spp.* i drugih) (Pfaller et al., 2006).

Tri osnovne klase antifungalnih supstanci su dostupne u terapiji invazivnih gljivičnih infekcija: polieni, azoli i ehinokandini. Njihov mehanizam delovanja se zasniva na narušavanju strukture ćelijskog zida ili membrane (Chandrasedkar, 2011). Postoje i drugi antifungalni agensi koji se primenjuju samostalno ili u kombinaciji sa pomenutim jedinjenjima: alilamini, derivati pirola i drugi.

Polieni predstavljaju najstariju familiju antifungalnih antibiotika koji su u standardnu medicinsku praksu uvedeni su 50-ih godina (Mohr et al., 2008). Mnogi od njih su izolovani iz vrsta roda *Streptomyces*, međutim, samo amfotericin B, nistatin, pimaricin i kandicidin pokazuju značajno terapijsko dejstvo. U širokoj kliničkoj praksi, poslednjih godina upotrebljavaju se samo amfotericin B i njegove lipidne formulacije, dok se nistatin, zbog velike toksičnosti i nepostojanja adekvatnih formulacija, koristi samo za spoljašnju upotrebu (Mathew i Nath, 2009).

Od svih primenljivih antifungalnih agenasa, polieni imaju najširi spektar aktivnosti (Mathew i Nath, 2009). Aktivni su prema kvascima i dimorfnim gljivama (*Candida*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Coccidiodes*), dermatofitima (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*) i plesnima (*Aspergillus*, *Penicillium*). Takođe, deluju na endemske mikoze, a neki od njih pokazuju i antibakterijsku aktivnost (Cornely, 2008). Mnogi polieni ostvaruju letalno dejstvo na protozoe (*Entamoeba histolytica*, *Leishmania*, *Trichomonas*, *Trypanosoma*, patogene vrste roda *Mycoplasmatales*), a u najvećem broju slučajeva ne deluju inhibitorno na vrste roda *Schizomycetes*.

### 2.4.1.1. Struktura polienskih antibiotika

Polienski antibiotici u svom molekulu imaju seriju konjugovanih dvostrukih veza *trans*-konfiguracije u sistemu laktonskih makrolidnih prstenova, usled čega imaju karakteristične UV–Vis apsorpcione spektre (tabela 2.10.). Polarne hidroksilne grupe se nalaze sa suprotne strane molekula u odnosu na dvostruke veze. Ova strukturna karakteristika obezbeđuje polienskim antibioticima amfipatičnu prirodu koja se nalazi u osnovi mehanizma njihove biološke aktivnosti (Mathew i Nath, 2009).

Ugljenohidratni ostatak koji ulazi u sastav gotovo svih polienskih antibiotika je heksozamin mikoamin (3-amino-3,6-dideoksi-D-manopiranoza). Izuzetak je perimicin, koji sadrži izomer mikoamina, perozamin (4-amino-4,6-dideoksi-D-manopiranoza). Ugljeni hidrat je za aglikonski deo molekula vezan  $\beta$ -glikozidnom vezom i nalazi se u konformaciji stolice. Prisustvo mikoamina ili perozamina čini molekul antibiotika amfoternim. Na pH vrednostima između 5,0 i 9,0 molekul je elektroforetski neutralan: pK vrednost amino grupe šećera je 8,6, dok pK vrednost karboksilne grupe varira u različitim molekulima (od 4,0 do 5,1) (Hamilton – Miller, 1973).

Tabela 2.10. Klasifikacija polienskih antibiotika na osnovu UV-Vis spektara

Klasa polienskih antibiotika	Broj dvostrukih veza	Kodni broj (po Berdy-u)	Položaj apsorpcionog maksimuma (nm)
Trieni	3	2.2.1.	260; 270; 280; $\pm 2$
Tetraeni	4	2.2.2.	291; 304; 318; $\pm 2$
Pentaeni	5	2.2.3.	317; 340; 350; $\pm 2$
Metilpentaeni	5	2.2.3.1.	323; 340; 357; $\pm 2$
Karbonilpentaeni	5	2.2.7.1.	364 (širok pik)
Heksaeni	6	2.2.4.	340; 358; 380; $\pm 2$
Karbonilheksaeni	6	2.2.7.2.	385 (širok pik)
Heptaeni	7	2.2.5.	361; 382; 405; $\pm 2$
Oktaeni	8	2.2.6.	377; 399; 418; $\pm 2$

#### 2.4.1.2. Biološka aktivnost polienskih antibiotika

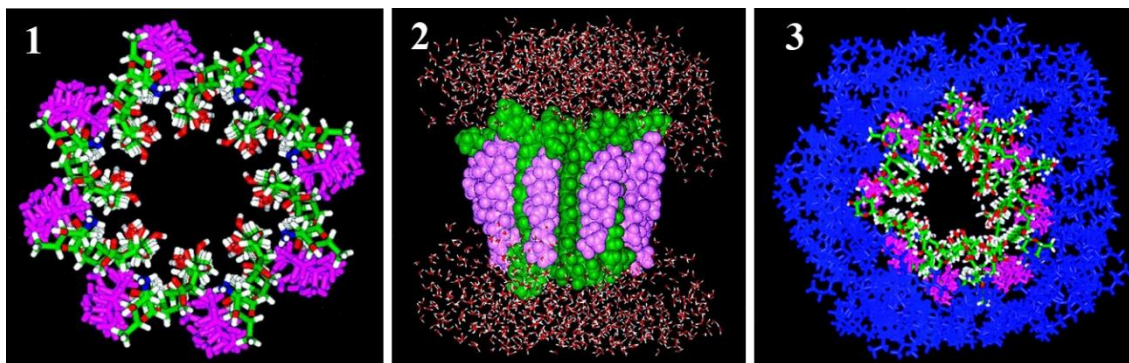
Biološka aktivnost polienskih antibiotika se ostvaruje interakcijama sa ergosterolom, esencijalnom komponentom ćelijske membrane gljiva. Ove interakcije dovode do građenja kompleksa čiji je spoljašnji omotač hidrofoban, dok je unutrašnjost hidrofilna. Na taj način formira se jedan vid transmembranskog kanala koji povećava permeabilnost membrane. Ćelijske komponente, proteini, monovalentni i divalentni katjoni prolaze kroz novostvorene pore, što dovodi do gubitka membranskog potencijala, esencijalnih ćelijskih komponenata, a zatim i do smrti ćelije (Lemke et al., 2005). Drugi efekti, kao što su inhibicija glikolize i respiracije, smatraju se sekundarnim.

Mehanizam formiranja transmembranskih kanala je najbolje objašnjen na primeru amfotericina B. Za nistatin je pokazano da formira slične, ali manje pore zbog prisustva kraćeg hidrofobnog regiona u strukturi molekula. Kompleksiranje pimaricina i membranskih sterola ne dovodi do formiranja kanala, ali takođe utiče na permeabilnost membrane (Mathew i Nath, 2009).

Relativno specifična antifungalna aktivnost polienskih antibiotika se zasniva na većem afinitetu prema ergosterolu gljiva u odnosu na holesterol sisara. S obzirom na to da oba sterola mogu da interaguju sa polienskim antibioticima, oni se smatraju toksičnim, a njihova intravenska primena je ograničena samo na teške kliničke slučajeve (Baran i Mazerski, 2015).

Na osnovu proračuna dinamičnih molekulskih interakcija i kompjuterskog modelovanja, predložen je model transmembranskog kanala koji se sastoji iz osam molekula amfotericina B i osam molekula sterola i čiji prečnik iznosi 7-10 Å (Baginski et al., 1997). Budući da je molekul ovog antibiotika amfifilan, polarne hidroksilne grupe su orjentisane prema unutrašnjosti kanala, dok lanci sa konjugovanim dvostrukim vezama interaguju sa fosfolipidima i sterolima ćelijske membrane (slika 2.18.). Proučavanjem odnosa strukture i aktivnosti amfotericina B, pokazano je da je polarni deo molekula (koji se sastoji od ugljenog hidrata i karboksilne grupe) veoma značajan za aktivnost antibiotika, a suštinski je važno prisustvo amino grupe. Na osnovu ovih informacija zaključeno je da je formiranje vodoničnih veza veoma značajno za interakcije

antibiotika sa prostorno bliskim strukturama. Objašnjenje za selektivnu interakciju amfotericina sa ergosterolom se nalazi u većoj konformacionoj pokretljivosti bočnog lanca holesterola i rigidnijoj strukturi steroidnog jezgra ergosterola.



Slika 2.18. Molekulski model amfotericin B - holesterol kanala (■molekul holesterola, ■atomi ugljenika, ■atomi azota, ■atomi kiseonika, □protoni) (1);

Pogled na amfotericin B - holesterol kanal sa lateralne strane

(■holesterol, ■amfotericin B) (2);

Snimak kanala sa ekstracelularne strane, koji pokazuje asimetričnost strukture transmembranske pore (■molekul holesterola, ■molekuli fosfolipida) (3)

Preuzeto iz: Lemke et al., 2005

#### 2.4.1.3. Rezistencija mikroorganizama na polienske antibiotike

Osnovna prednost terapije polienskim antibioticima je, pored širokog spektra dejstva, mala učestalost rezistencije u toku duge istorije njihove primene (Chandrasedkar, 2008). Rezistencija se obično javlja zbog smanjene zastupljenosti ergosterola u ćelijskoj membrani gljiva (Ellis, 2002). Neke ćelije gljiva imaju mutacije u putevima biosinteze ergosterola, pa u svojim membranama imaju druge sterole manjeg afiniteta za vezivanje poliena, kao što je zimosterol. Kod vrsta roda *Candida* i *Saccharomyces*, uočeno je da rezistencija može biti povezana sa povećanjem veličine ćelije usled poliploidije i produkcijom enzima koji razlažu poliene. Rezistentni sojevi rastu sporije, manje su virulentni i ne pokazuju ukrštnu rezistenciju na druge nepolienske antifungalne agense.

Ukrštena rezistencija je, međutim, uočena među polienskim antibioticima (Hamilton – Miller, 1973).

Budući da su rezistentne vrste retko uočene u kliničkoj praksi, razvoj rezistencije na polienske antibiotike ne predstavlja značajan faktor u lečenju mikoza (Ellis, 2002).

#### **2.4.1.4. Neželjeni efekti terapije polienskim antibioticima**

Najčešći neželjeni efekti povezani sa sistemskom terapijom polienskih antibiotika su akutne i subakutne reakcije (Mohr et al., 2008).

Akutne reakcije se susreću kod 70-90% pacijenata, a čine ih: povišena temperatura, groznica, glavobolja, mučnina i povraćanje. Znatno teža komplikacija ovakve terapije je nefrotoksičnost, koja ograničava primenu polienskih antibiotika, a neki od vidova ove komplikacije se susreće kod 30% pacijenata (Walsh et al., 1999; Bates et al., 2001). Smatra se da se uzrok nefrotoksičnosti indukovane polienima nalazi u direktnoj interakciji poliena i membrana epitelijalnih ćelija (Sabra i Branch, 1991; Sawaya et al., 1991). Poremećaji elektrolita (hipokalemija i hipomagnezemija), kao i povišen nivo kreatinina u serumu su pojave koje su povezane sa povećanjem membranske permeabilnosti i izlaženjem kalijuma i adenzintrifosfata iz ćelije, kao i smanjenom resorpcijom magnezijuma (Sawaya et al., 1995).

Zbog lipofilnog karaktera i afiniteta prema biološkim membranama i lipoproteinima, amfotericin B se akumulira u jetri, što dovodi do hepatobilijarnih poremećaja (Lemke et al., 2005), a sistemski terapija polienskim antibioticima dovodi i do promena u ćelijskom sastavu krvi (Lemke et al., 2005).

U cilju sprečavanja neželjenih efekata opasnih po život, upotreba polienskih antibiotika se izbegava kada god je to moguće. Budući da je terapija amfotericinom B neprikosnovena u tretmanu invazivnih sistemskih mikoza, sintetisane su brojne formulacije ovog antibiotika čiji je osnovni cilj da se smanji koncentracija slobodnog antibiotika u serumu, bez narušavanja njegove efikasnosti.

## 2.4.2. Amfotericin B

Amfotericin B (AmB), „zlatni standard” antifungalne terapije, prvi put su izolovali Gold i saradnici 1959. godine iz fermentacione tečnosti kulture *Streptomyces nodosus* izolovane 1955. godine iz uzoraka zemljišta dobijenih sa obala reke Orinoko u Venecueli (Dutcher et al., 1959). Širok spektar antifungalne aktivnosti *in vitro* dokazan je 60-ih godina na brojnim patogenim vrstama roda *Candida*, kada su otkrivene i amfotericin B – rezistentne forme (*Trichosporon beigelii*, *Aspergillus terreus*, *Pseudallesheria boydii*, *Malassezia furfur* i *Fusarium spp.*) (Mathew i Nath, 2009). Danas je poznato da ovaj antibiotik nema samo široku antifungalnu aktivnost, već je i vrlo efikasan antiparazitski agens. On je osnovni izbor u lečenju sistemskih infekcija gljivama, kao što su *Candida albicans* i *Aspergillus fumigatus*. Međutim, njegova primena je ograničena ozbiljnim neželjenim efektima, koji su inicirali intenzivna istraživanja u oblasti dizajna novih formulacija antibiotika (lipozoma, emulzija, nanočestica), čiji je osnovni cilj smanjenje koncentracije slobodnog amfotericina B u krvi i što efikasniji transport do ciljne lokacije (Bekersky et al., 1999).

### 2.4.2.1. Biosinteza, genetika, molekularni inženjering amfotericina B

Polienski antibiotici se sintetišu iz C2 (acetatnih) i C3 (propionatnih) jedinica, pomoću enzima poliketid-sintaze (PKS) (Caffrey et al., 2001). Polienska hromoforna substruktura se sastoji samo iz acetatnih jedinica. Amino šećeri su izvedeni iz glukoze, posredstvom GDP-manoze do GDP-mikozamina. U slučaju amfotericina B, 16 acetatnih i 3 propionatne jedinice formiraju prvi intermedijer u reakciji katalizovanoj PKS. Nakon ciklizacije, sintetisani makrolakton podleže trima modifikacijama: uvođenju hidroksilne grupe, oksigenaciji dve metil-grupe do karboksilnih funkcija, od kojih se jedna zatim vezuje za mikozamin. Nije poznato kojim redosledom se dešavaju ove faze sinteze (Lemke et al., 2005).

Biosintetski genski klaster za amfotericin B je detaljno istražen i kompletno sekvenciran (Aparicio et al., 2003; Caffrey et al., 2001). Analizom nukleotidne sekvence ovog

regiona (113 kbp) pronađeno je šest gena (geni za dva citohrom P450 enzima, dva ABC transportna proteina i geni uključeni u biosintezu i vezivanje mikoazamina) koji kodiraju heksamodularni PKS protein. Ispitivanjem PKS uključenih u biosintezu amfotericina B i nistatina dokazano je oko 72% homologije, što se može objasniti strukturnim sličnostima između ova dva poliena.

Očekuje se da će tehnike genetskog inženjeringa obezbediti nove analoge polienskih antibiotika u budućnosti. Upotrebom mutanata mikroorganizama dobijenih ovim metodama može se postići biosinteza novih pentaenskih derivata koji imaju manju antifungalnu aktivnost, ali veću rastvorljivost u vodi u odnosu na amfotericin B (Lemke et al., 2005).

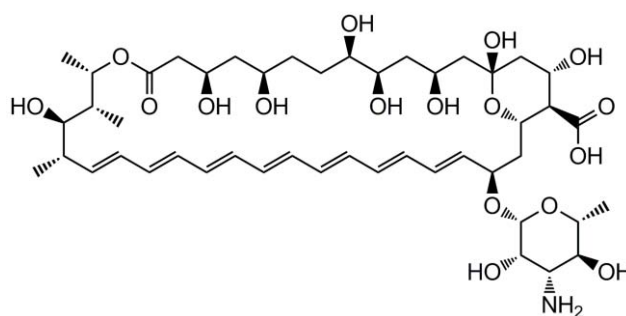
Neke kompanije su kultivisale *S. nodosus*, modifikujući metod koji je prvo opisao Dutcher 1959. (Dutcher et al., 1959), a zatim i Linke 1974. godine (Linke et al., 1974). Pokazano je da glukoza predstavlja najbolji izvor ugljenika za produkciju poliena u visokom prinosu, a inokulum gustine 10% i pH 7,8 (pre sterilizacije) smatraju se optimalnim uslovima za biosintezu amfotericina. Fermentacija se izvodi u podlozi koja sadrži 1% glukoze i 1% ekstrakta kvasca, sa dodatnim izvorom azota. Prinosi koji pri tom nastaju su 3-4 g amfotericina B po litru fermentacione tečnosti. Efikasnost produkcije značajno zavisi od intenziteta aeracije (optimalno  $0,8 \text{ mM O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ). Pošto amfotericin B nije rastvoran u vodi, on se akumulira u vidu kristala na površini ćelije ili u podlozi. Može da se ekstrahuje organskim rastvaračima kao što su: izopropilalkohol, metanol koji sadrži 2% kalcijum-hlorida ili etilacetat sa metiltrioktilamonijum-hloridom na pH 10,5 (Lemke et al., 2005).

#### **2.4.2.2. Struktura amfotericina B**

Kompletnu hemijsku strukturu amfotericina B dali su Borowski i saradnici 1970. godine (Borowski et al., 1970), a prostornu konformaciju derivata AmB sa jodom opisali su 1971. godine Ganis i saradnici (Ganis et al., 1971). Iako je konformaciona analiza slobodnog AmB ili njegovih kompleksa otežana usled prisustva makrolidnog laktonskog prstena, ovaj problem je uspešno rešen 1981. godine (Rinnert i Maigret,

1981), a u narednim godinama urađena je i kompletna stereochemijska NMR karakterizacija u rastvornom i kristalnom obliku (Sowinski et al., 1992).

Amfotericin B je rigidan molekul cilindričnog oblika. Njegov IUPAC naziv je: (1*R*, 3*S*, 5*R*, 6*R*, 9*R*, 11*R*, 15*S*, 16*R*, 17*R*, 18*S*, 19*E*, 21*E*, 23*E*, 25*E*, 27*E*, 29*E*, 31*E*, 33*R*, 35*S*, 36*R*, 37*S*)-33-[(3-amino-3, 6-dideoksi-β-D-manopiranozil)oksi]-1, 3, 5, 6, 9, 11, 17, 37-oktahidroksi-15, 16, 18-trimetil-13-okso-14, 39-dioksabiciklo [33.3.1] nonatriakonta-19, 21, 23, 25, 27, 29, 31-heptaen-36-karboksilna kiselina (slika 2.19.).



Slika 2.19. Strukturna formula amfotericina B

#### 2.4.2.3. Osobine amfotericina B

Amfotericin B je žuto-narandžasti prirodni proizvod ekstrahovan iz fermentacione tečnosti *Streptomyces nodosus*. Totalna hemijska sinteza AmB je prvi put opisana 1988. godine (Lemke et al., 2005), ali su, u poređenju sa proizvodnjom ovog antibiotika biotehnoškim procesom, troškovi sinteze znatno veći, a prinosi značajno manji. U novije vreme unapređene su procedure za proizvodnju sintetičkog AmB, ali njihov glavni cilj je zapravo sinteza novih analoga sa poboljšanom antifungalnom aktivnošću i/ili rastvorljivošću u vodi (McGarvey et al., 1996).

Do danas, opisano je oko 200 polienskih antimikotika poreklom iz prirodnih izvora, a svi se karakterišu veoma niskom rastvorljivošću (manjom od 1 mg L<sup>-1</sup>) u vodi i apsolutnim alkoholima na fiziološkim pH vrednostima (pH 6-7). Zbog svoje amfipatične strukture, AmB u vodi gradi agregate pri koncentracijama 2·10<sup>-7</sup> M



(Milhaud et al., 2002) koji se formiraju ispod kritične micelarne koncentracije ( $3 \mu\text{M}$ ) usled interakcija između susednih polienskih lanaca. Rastvorljivost u većini organskih rastvarača je neznatno veća (tabela 2.11.) (Lemke et al., 2005). Veoma niska rastvorljivost je osnovni razlog zbog kojeg je gotovo potpuno onemogućena gastrointestinalna resorpcija AmB.

Tabela 2.11. Rastvorljivost amfotericina B u organskim rastvaračima

Rastvarač	Rastvorljivost ( $\text{mg L}^{-1}$ )
Voda	<1 (na pH 6-7)
Metanol	2000
Etanol	500
Hloroform	100
Cikloheksan	20
Petroletar	10
Dimetilsulfoksid	>2
Dimetilformamid	2
Propilenglikol	1

AmB je rastvoran u vodi na pH vrednostima manjim od 2 i većim od 11. Međutim, u ovako ekstremnim uslovima, molekul AmB je nestabilan. U kiselim ili baznim sredinama AmB može da gradi soli koje imaju veću rastvorljivost u vodi, ali manju antifungalnu aktivnost. U parenteralnim aplikacijama, obično se upotrebljavaju preparati koji sadrže deoksiholat kao solubilizirajući agens. U vodi ova dva molekula formiraju micelarne koloidne komplekse, ali je ipak samo deo AmB na ovaj način rastvoren (Lemke et al., 2005).

#### 2.4.2.4. Farmakološke karakteristike amfotericina B

Amfotericin B se koristi za tretman invazivnih i sistemskih gljivičnih infekcija koje mogu biti uzrokovane vrstama rodova *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium* i *Trichosporon*, kao i pojedinih parazitskih infekcija. Čak i nakon više od 40 godina kliničke upotrebe, zabeleženo je svega nekoliko slučajeva rezistencije mikroorganizama na AmB (Ellis, 2002), verovatno zbog toga što bi u ćelijskoj membrani gljiva i protozoa bile neophodne fundamentalne citohemijske promene da bi se narušila kompleksna interakcija AmB sa ergosterolom koja se nalazi u osnovi mehanizma dejstva ovog antibiotika.

Mehanizam dejstva, mehanizmi rezistencije mikroorganizama na amfotericin B i neželjeni efekti primene ovog antibiotika objašnjeni su u poglavljima 2.4.1.2., 2.4.1.3. i 2.4.1.4.

Kao što je već pomenuto, gastrointestinalna resorpcija oralno primenjenog AmB je minimalna. Opisani su brojni uspešni pokušaji poboljšavanja resorpcije, npr. sintezom kohelata ili nanosuspenzija AmB (Santangelo et al., 2000; Kamble et al., 2010), koji dokazuju da je oralna aplikacija ipak moguća. Međutim, intravenska primena i dalje predstavlja osnovni oblik terapije ovim antibiotikom.

Detaljni opis metabolizma amfotericina B još uvek nije kompletno opisan (Lemke et al., 2005). Nakon intravenske primene preparata AmB, antibiotik se oslobađa od deoksiholata i vezuje za proteine seruma, uglavnom za  $\beta$ -lipoproteine. Najveći deo (20-30%) AmB krvotokom odlazi do jetre i izbacuje se fecesom zajedno sa sadržajem žuči. Oko 2-5% AmB koji se može naći u urinu nije metabolisano i zadržava biološku aktivnost. Kada se primenjuje u formi lipozomnih preparata, AmB dospeva u sve unutrašnje organe (uključujući i centralni nervni sistem) u znatno višim koncentracijama nego kada se primenjuje samostalno sa deoksiholatom.

### 2.4.3. Nistatin

Antibiotik nistatin su prvi put izolovali Brown i Hazen 1944. godine iz fermentacione tečnosti soja *Streptomyces noursei* (Mathew i Nath, 2009). Ovo istraživanje je prvi put objavljeno 1950. godine i predstavlja otkriće prvog klinički upotrebljivog polienskog makrolidnog antifungalnog antibiotika. U današnje vreme nistatin se rutinski koristi u profilaksi i terapiji kandidijaza, a mehanizam delovanja je isti kao i kod svih polienskih antibiotika – narušavanje integriteta ćelijske membrane gljiva formiranjem transmembranskih kanala usled interakcije antibiotika sa ergosterolom. Detaljni mehanizam dejstva polienskih antibiotika opisan je u poglavlju 2.4.1.2.

Nistatin je aktivna supstanca u terapiji gljivičnih infekcija uzrokovanih vrstama roda *Candida*, *Aspergillus*, *Coccidioides*, *Cryptococcus* i *Histoplasma*. Pokazano je da ima sličan ili širi spektar dejstva od drugih polienskih antibiotika (Offner et al., 2004). Uprkos razvoju novih antifungalnih lekova, nistatin se i dalje upotrebljava u svakodnevnoj kliničkoj praksi kao potentni fungicid širokog spektra dejstva (Ren et al., 2014).

#### 2.4.3.1. Biosinteza nistatina

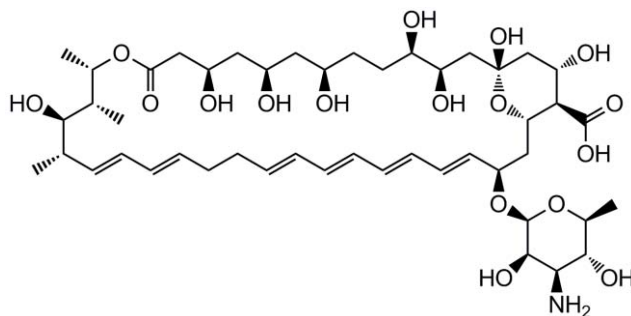
Makrolaktonski prsten tokom biosinteze nistatina nastaje kondenzacijom 16 acetatnih i 3 propionatne jedinice. Prekursori za inkorporaciju acetatnih i propionatnih ostataka u makrolaktonski prsten su malonil-CoA i metilmalonil-CoA, koji nastaju karboksilacijom acetyl-CoA i propionil-CoA. Hemijska struktura nistatina ukazuje na to da je njegov put biosinteze isti kao kod svih polienskih antibiotika, odnosno da je katalizovan enzimom poliketid-sintazom (Fjærvik i Zotchev, 2005).

DNK region koji je zadužen za biosintezu nistatina u genomu *S. noursei* se sastoji iz 123,58 kbp i sadrži 6 gena koji kodiraju modularnu PKS, gene za tioesterazu, biosintezu deoksišećera, modifikaciju i transport, kao i gene za regulatorne proteine (Brautaset et al., 2000). Biosinteza mikozamina odvija se preko GDP-D-manoze koja se inicijalno sintetisuje iz fruktozo-6-fosfata enzimima primarnog metabolizma. Genski klaster za

biosintezu polienskih makrolida sadrži gene koji kodiraju proteine koji pokazuju homologiju sa GDP-D-manoza-4,6-dehidratazama i katalizuju konverziju GDP-D-manoze do GDP-4-keto-6-deoksi-D-manoze. Ovaj metabolit podleže izomerizaciji, pri čemu nastaje GDP-3-keto-6-deoksi-D-manoza, od koje transaminacijom nastaje GDP-mikozamin. Budući da geni koji kodiraju izomerazu nisu pronađeni u ovom biosintetskom genskom klasteru, smatra se da se oni nalaze na nekom drugom mestu u genomu *S. noursei* ili da je ova reakcija neenzimska (Nedal et al., 2007). Vezivanje mikozamina za makrolaktonski prsten je modifikacija do koje dolazi u kasnim fazama biosinteze makrolida i katalizuju je glikoziltransferaze. Mikozamin je veoma značajan za biološku aktivnost poliena, pa iz tog razloga glikoziltransferaze predstavljaju predmet genetske manipulacije čiji je cilj vezivanje alternativnih šećera za ostatak molekula poliena i dobijanje nove generacije antibiotika (Hu i Walker, 2002).

#### 2.4.3.2. Struktura nistatina

Kompletna stereohemijska struktura nistatina A<sub>1</sub> je opisana 1986. godine. Molekul se sastoji od makrolaktonskog prstena od 38 atoma koji sadrži setove od dve i četiri konjugovane dvostruke veze razdvojene zasićenim vezama (slika 2.20). Nistatin se klasifikuje kao tetraen, iako se nekada svrstava i u „degenerisane heptaene“. Sadrži mikozaminski ostatak koji je za makrolidni prsten vezan β-glikozidnom vezom i egzocikličnu karboksilnu grupu koja je značajna za biološku aktivnost, ali i toksičnost ovog antibiotika (Fjærvik i Zotchev, 2005). Molekul nistatina ima amfipatičnu strukturu – sistem konjugovanih dvostrukih veza čini hidrofobni deo, dok se sa suprotne strane prstena nalaze hidroksilne, karboksilna i keto-grupa koje formiraju hidrofilni deo molekula (Hąc-Wydro i Dynarowicz-Łątka, 2006).



Slika 2.20. Strukturna formula nistatina

#### 2.4.3.3. Farmakološke karakteristike nistatina

Slaba gastrointestinalna apsorpcija i toksičnost su ograničavajući faktori za primenu nistatina u oralnoj ili lokalnoj terapiji. Intravensko davanje nistatina bi bilo efikasnije u odnosu na AmB, s obzirom na širi spektar antifungalne aktivnosti. Takođe, kao i AmB, nistatin može biti inkorporiran u liposome (komercijalno dostupan kao preparat Nyotran) i u toj formi ne gubi terapijska svojstva, dok je toksičnost značajno smanjena (Mathew i Nath, 2009). Lipozomne formulacije nistatina su podjednako efikasne kao lipozomne formulacije AmB, a u ovoj formi nistatin je efikasan u lečenju infekcija koje uzrokuju mikroorganizmi rezistentni na AmB (Moribe et al., 2000; Carrillo-Muñoz et al., 1999).

#### 2.4.4. Formulacije antibiotika

Poznato je da se mikroorganizmi koji izazivaju infektivna oboljenja konstantno transformišu, pa su neophodna nova rešenja za probleme kao što su reinfekcije i rezistencije. Za razliku od drugih lekova, antimikrobni agensi bi trebalo da deluju samo na mikroorganizme, a ne na humane ćelije, pa je neophodan uslov za njihovu primenu visoka specifičnost, kako bi se sprečila oštećenja tkiva. Pošto su celularna organizacija i procesi proliferacije gljiva blisko povezani sa procesima u humanim ćelijama, razvoj antifungalnih agenasa je znatno teži od razvoja antibakterijskih.

Posljednjih godina se sve više razvijaju sistemi za ciljanu dostavu lekova (eng. drug delivery systems), koji predstavljaju novi farmakološki pristup. Primenjuju se tehnologije kojima se poboljšavaju efikasnost i bezbednost upotrebe određenih antibiotika i kontrolišu farmakokinetičke osobine (apsorpcija, distribucija, metabolizam i ekskrecija).

Amfotericin B je jedan od najčešće korišćenih antibiotika u eksperimentalnim sintezama formulacija antibiotika, koje bi trebalo da budu dizajnirane tako da antibiotik dospe do ciljnog mesta visokoselektivno i u maksimalnoj koncentraciji, dok serumske koncentracije pri tom ostaju minimalne. Da bi se ovo postiglo, razvijaju se brojne strategije zasnovane na postojanju neke vrste nosača (Lemke et al., 2005). U idealnim uslovima, antibiotik bi trebalo da počne da deluje samo ukoliko je nosač došao u kontakt sa ciljnim tkivom ili patogenom, dok na ostala tkiva ne bi trebalo da ima bilo kakvog uticaja. U tom cilju, eksperimenti su fokusirani na razvoj koloidnih i čestičnih nosača, kao što su lipozomi ili nanočestice, kojima se postiže kontrolisano oslobađanje leka.

Da bi se prevazišao problem slabe apsorpcije u gastrointestinalnom traktu, AmB se koristi parenteralno kao lipozomna (komercijalno dostupna kao preparat AmBisome) ili koloidna disperzija (preparati Fungizone, Abelcet) za tretman sistemskih kandidijaza i visceralnih lajšmanioza. Međutim, zbog visoke cene i tehničkih problema sa primenom u zemljama endemskih područja, oralni sistem dostave je vrlo poželjan. Moderni pristupi u povećanju oralne apsorpcije uključuju mikronizaciju, polimerne nano- i mikročestice, ciklodekstrine i kohelate.

#### **2.4.4.1. Koloidne disperzije i emulzije**

Surfaktanti koji se koriste u formulacijama lekova služe za povećanje njihove rastvorljivosti. Za oralnu upotrebu su odobreni brojni surfaktanti, ali za parenteralnu upotrebu samo lecitin, Tween 80, polivinilpirolidon i poloksamerni derivati (Kayser et al., 2003). Osnovni nedostatak surfaktanata u parenteralnoj upotrebi je njihova hemolitička aktivnost i mogućnost izazivanja sindroma anafilaktičkog šoka.

Fungizone i Abelcet su formulacije odobrene za intravensku terapiju sistemskih kandidijaza (Lemke et al., 2005). Fungizone, pored amfotericina B, sadrži i natrijum-deoksiholat. Ovaj detergent pravi micelarne disperzije amfotericina B koje su pogodne za parenteralnu primenu. Međutim, više od 30% pacijenata kojima je administriran Fungizone pokazuje znake poremećaja bubrežne funkcije.

Abelcet je formulacija koja se sastoji od stabilnih monoslojeva antibiotika i fosfolipida (dimiristoilfosfatidilholin i dimiristoilfosfatidilglicerol) ili rozeta varijabilne veličine (prečnika 1-10  $\mu\text{m}$ ) (Stevens, 1994). Maksimalna tolerisana doza je do deset puta veća nego kod konvencionalnog amfotericina B, a pokazuje i manji rizik od bubrežnih oboljenja. Farmakokinetičkim studijama je pokazano da se vrlo brzo transportuje iz plazme u tkiva (pluća, jetru i slezinu).

Amphocil (Amphotec) je struktura diskoidnog oblika (prečnika 120 nm, debljine 4 nm) koja se sastoji iz ekvimolarnih količina amfotericina B i holesterol-sulfata (Stevens, 1994). To su stabilne dvoslojne strukture koje se, zbog rigidnosti svojih komponenata, mogu saviti u dovoljnoj meri da formiraju liposome. Ova jedinstvena koloidna formulacija pokazuje sličnu antifungalnu aktivnost kao Fungizone, ali je u odnosu na njega smanjena hemolitička aktivnost, akutna toksičnost i vezivanje za lipoproteine plazme. Na ovaj način se 5-8 puta smanjuje dostava toksičnog leka do bubrega, u poređenju sa konvencionalnim amfotericinom B, verovatno zbog velikog afiniteta ovog antibiotika prema holesterolu koji je već prisutan u formulaciji.

Zbog koloidnog karaktera, svi ovi lipidni kompleksi se brzo uklanjaju iz cirkulacije pomoću ćelija mononuklearnog fagocitnog sistema, kao što su Kupferove ćelije, čime se međutim povećava rizik od hepatičnih oboljenja.

#### **2.4.4.2. Lipozomi**

Otkriće da lipozomi (dvoslojne vezikule čija je struktura slična ćelijskim membranama) mogu biti formirani od fosfolipida, sterola i sličnih molekula brzo je dovelo do istraživanja potencijalnih lipidnih sistema za dostavljanje lekova. Iako lipozomi mogu biti napravljeni od neškodljivih lipida koji se javljaju u živim sistemima, otkriveno je da

su oni ipak daleko od inertnih kada se ubrizgaju u organizam. Rana istraživanja su pokazala da se lipozomi brzo uklanjaju iz cirkulacije pomoću sistema mononuklearnih fagocita, koji se sastoji uglavnom od tkivnih makrofaga distribuiranih po čitavom organizmu. Takođe, proteini plazme i lipoproteini mogu interagovati sa lipozomima, i time destabilizovati njihovu strukturu ili pospešiti fagocitozu. Daljim istraživanjima došlo se do zaključka da različite lipozomne formulacije mogu imati različite poluživote i distribucione profile u tkivima, zavisno od njihove veličine, naelektrisanja, membranske fluidnosti, sadržaja holesterola i doze. Različiti tipovi lipozoma, sa značajno različitim biološkim osobinama, mogu biti upotrebljeni kao nosači lekova, a osnovni izazov je izdvojiti (iz gotovo neograničenog niza varijanti formulacija) one sa optimalnim terapijskim svojstvima za određenu kliničku indikaciju (Bekersky et al., 1999).

Zbog jedinstvenih fizičko – hemijskih osobina (mala rastvorljivost u vodi, veliki afinitet prema biološkim membranama), amfotericin B je bio jedan od prvih lekova razmatranih za ovu formulaciju. Cilj je bio da se dobiju lipozomi koji će obezbediti bezbedniju alternativu konvencionalnom amfotericinu B (koji je solubilizovan deoksiholatom), kojom će se redukovati ozbiljna bubrežna toksičnost, a zadržati fungicidna aktivnost. Komercijalno dostupna lipozomna formulacija amfotericina B je AmBisome. AmBisome je formulacija koju čine zasićeni (rigidni) fosfolipidi i holesterol, čime je lipozomna membrana stabilizovana i oslobađanje leka iz lipozoma značajno smanjeno. Mala veličina ovih unilamelarnih lipozoma (0,1  $\mu\text{m}$ ) obezbeđuje stabilnost *in vivo* i produžava vreme u cirkulaciji (Boswell et al., 1998).

Rizik od nefrotoksičnih sporednih efekata može biti i dodatno smanjen (Moribe i Maruyama, 2002). Derivatizacija polietilen-glikolom redukuje toksičnost i produžava poluživot lipozomnih AmB formulacija u serumu. Ovo je objašnjeno uvođenjem hidrodinamičkog sloja na površinu čestice, što sprečava lipozome da interaguju sa biološkim membranama. Kao posledica, čestice se duže zadržavaju u cirkulaciji i mnogo je manja njihova fagocitoza.

Lipozomni preparati amfotericina B (kao što je AmBisome) su znatno bolji od emulzija ili koloidnih formulacija u smislu biodostupnosti i sporednih efekata (Lemke et al., 2005). Značajnija poboljšanja AmB emulzija ili koloidnih formulacija se ne mogu



očekivati u budućnosti. Alternativni sistemi, kao što su mikroemulzije, su pokazali visoku toksičnost, što ih čini lošim kandidatima za preklinička ispitivanja. Dalji, vrlo interesantan pristup uključuje upotrebu sopstvenih membranskih lipida recipijenta za produkciju lipozoma, čime se povećava biokompatibilnost.

#### **2.4.4.3. Kohelati**

Kohelati su formulacije koje imaju potencijalnu primenu u oralnoj terapiji hidrofobnih lekova. To su stabilne fosfolipid – katjon kristalne strukture koje su sačinjene od spiralnog lipidnog dvosloja čija unutrašnjost je hidrofobna. Ove multilamelarne cilindrične micidele se spontano formiraju kada se kalcijumovi joni dodaju ultrazvukom tretiranom fosfatidilserinu u fiziološkom rastvoru. Enkapsulacija amfotericina B unutar kohelata daje stabilne, netoksične i visoko efikasne lipidne čestice koje olakšavaju ciljanu dostavu antibiotika nakon oralne administracije (Zarif et al., 2000). Kohelati se mogu razmatrati kao membranski fuzioni intermedijeri koji omogućavaju bolju interakciju sa biološkim membranama. Amfotericin B je vezan između spiralnih slojeva unutar kohelata, čime je zaštićen od uslova u gastrointestinalnom traktu. Lako se oslobađa tokom interakcije sa ciljnim ćelijama.

#### **2.4.4.4. Polimerne nano- i mikročestice**

Polimerne čestice koje se koriste u sintezi formulacija antibiotika mogu biti razmatrane kao kapsule mikro- i nanometarskih dimenzija. Sintetički (npr. polilaktid (PL), poli-D,L-laktid-ko-glikolid (PLGA), akrilat, akrilamid, stirol) ili prirodni (skrob, želatin, albumin, alginat) matriks materijali mogu biti korišćeni (Kayser et al., 2003). U kapsulama, homogeno jezgro u kome se nalazi lek je okruženo polimernim filmom.

Upotreba mikročestica kao nosača antiparazitskih lekova je intenzivno proučavana na primerima stiboglukonata, amfotericina B i pentamidina. Najčešće korišćeni su biodegradabilni polimeri, kao što su PL i PLGA. Oba se razlažu u jetri do mlečne

kiseline. Problemi su što je toksičnost i dalje velika, kao i što je mogućnost enkapsulacije mala (oko 20%). Mikročestice imaju velika ograničenja kada se administriraju parenteralno - veličina čestica je ograničena na 5  $\mu\text{m}$ , jer veće čestice mogu dovesti do začepjenja kapilara. Zbog toga se mikročestice koriste isključivo za subkutane i intramuskularne aplikacije.

Osnovno ograničenje u intravenskoj upotrebi čestičnih nosača lekova jeste njihov brzi unos u ćelije mononuklearnog fagocitnog sistema. Polietilenglikol (PEG) polimeri su najviše korišćeni materijali za modifikaciju površina čestica adsorpcijom, a u cilju izbegavanja prepoznavanja od strane fagocita (Gref et al., 2000). Pošto je biorazgradnja osnovni zahtev za aplikaciju ovih nosača, proizvedeni su i polietilenglikol - modifikovani biodegradabilni nosači lekova gde je PEG kovalentno vezan za površinu čestica kako bi se izbegla zamena adsorbovanih kopolimera nekom od komponenata krvi. Istraživanja ovih čestica mogu biti korisna za dizajn nanonosača koji duže cirkulišu krvotokom i ostvaruju veoma mali broj interakcija sa proteinima plazme i fagocitnim ćelijama.

#### **2.4.4.5. Nanočestice**

Nanočestični sistemi nosača amfotericina B su se javili nakon što mnoge formulacije ovog antibiotika otkrivene 80-ih godina nisu uspele da efikasno redukuju štetne efekte bez značajnog smanjenja njegove efikasnosti. Najznačajnije formulacije su nanosuspenzije i čvrste lipidne nanočestice (eng. solid lipid nanoparticles) (Lemke et al., 2005).

Lekovi nerastvorni u vodi se transformišu u nanočestice u klipnom homogenizeru, tako što se više puta materijal potiskuje pod visokim pritiskom (150 MPa) kroz preoz promenljive veličine. Zavisno od proizvodnih parametara, kao što su: pritisak, temperatura, broj ciklusa i dodatak detergenata, dobijaju se čestice prosečne veličine od 100 do 800 nm. Selektivnim alteracijama fizičko - hemijskih osobina površina čestica, npr. derivatizacijom polietilen-glikolom, farmakološki profil može biti dodatno

optimizovan. Nanočestice pokazuju prednosti nad lipozomima, kao što su: duži poluživot na sobnoj temperaturi, mogućnost autoklaviranja i manja cena produkcije.

#### 2.4.4.6. Nanosuspenzije

Nanosuspenzije su vodene disperzije čestica nanometarskih dimenzija koje se sastoje od odgovarajućeg leka i minimalne količine surfaktanata. Njihova osnovna prednost je što im je veličina manja od 1  $\mu\text{m}$ , što ih čini pogodnim za intravensku administraciju (Kamble et al., 2010). Nanočestice, kao i mikročestice, mogu biti veoma efikasno preuzete iz cirkulacije od strane fagocitnih ćelija, ali je moguća i kontrolisana dostava lekova u tkiva, kao što su: jetra, pluća, slezina, centralni nervni sistem i kičmena moždina. Do sada je nekoliko antibiotika, među kojima je i amfotericin B, prevedeno u formu nanosuspenzija i uspešno testirano *in vitro* i *in vivo* na senzitivne mikroorganizme - *Leishmania spp.*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum* i *Pneumocystis carinii* (Kayser et al., 2003).

#### 2.4.4.7. Čvrste lipidne nanočestice

Čvrste lipidne nanočestice su izgrađene od lipidnog matriksa nanometarskog prečnika. Slično emulzijama ili lipozomima, sastoje se od fizioloških, dobro tolerisanih aditiva i mogu biti proizvedene pomoću relativno jednostavne homogenizacije pod visokim pritiskom (Schwarz i Menhert, 1999). Antibiotik nerastvoran u vodi se rastvara ili suspenduje u lipidnom matriksu (sa maksimalnim kapacitetom 20-25%) i kasnije oslobađa procesima difuzije i erozije čestica.

Čvrste lipidne nanočestice imaju kombinovane prednosti klasičnih uljanih emulzija, lipozoma i polimernih nanočestica. Kao i emulzije i lipozomi, dobro su tolerisane *in vivo* kada sadrže fiziološke masne kiseline ili lipide i toksikološki su prihvatljive. Slično polimernim nanočesticama, omogućavaju kontrolisano oslobađanje antibiotika usled postojanja čvrstog matriksa. Varijacijom obrazaca lipida ili masnih kiselina može se

manipulisati i kinetikom oslobađanja leka. Atraktivne su kao alternativni nosači antibiotika za peroralnu, parenteralnu, a posebno intravensku administraciju (Kayser et al., 2003).

Do sada je ispitan relativno mali broj formulacija antiparazitskih agenasa. Npr. klinički upotrebljavane supstance, kao što su klindamicin, pirimetamin i sulfadiazin su u obliku ovih nanoformulacija testirani na *Toxoplasma gondii*, čime je pokazano da se na taj način mogu uspešno dostavljati lekovi do mozga (Kayser et al., 2003).

#### **2.4.4.8. Ciklodekstrini**

Ciklodekstrini su ciklični oligosaharidi koji se sastoje od 6, 7 ili 8 molekula glukoze vezanih  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) glikozidnim vezama, koji formiraju  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  ciklodekstrine, redom. Njihova osnovna prednost je spontano formiranje pora sa unutrašnjim prečnikom 0,5-0,8 nm. Hidroksilne grupe su okrenute prema spoljašnjosti čestice formirajući hidrofilni omotač, dok različita hidrofobna jedinjenja mogu biti inkorporirana u unutrašnjost čestice koja je lipofilna. Na ovaj način, lipofilna jedinjenja se stabilno distribuiraju unutar ekstremno malih čestica, čime se povećava njihova površina, kao i relativna rastvorljivost. Formulacija ketokonazola sa ciklodekstrinima se koristi za tretman AIDS - povezane kriptosporidioze, a formulacija artemizinina u tretmanu malarije (Kayser et al., 2003).

#### **2.4.4.9. Konjugacija antibiotika sa polimerima rastvornim u vodi**

Formulacije antibiotika, kao što su koloidne disperzije i emulzije i razne lipidne formulacije, menjaju farmakokinetičke parametre, efikasnost i toksičnost antibiotika. Lipozomni preparati su, na primer, značajno bolji u odnosu na emulzije ili koloidne formulacije kada su biodostupnost ili sporedni efekti u pitanju. Međutim, ove prednosti ne prevazilaze uvek probleme skupe proizvodnje. Lipidni kompleksi se, zbog svog koloidnog karaktera, brzo uklanjaju iz cirkulacije delovanjem ćelija mononuklearnog

fagocitnog sistema, povećavajući tako rizik od hepatičnih oboljenja. Zbog toga je potraga za optimalnim formulacijama antibiotika i dalje od presudnog značaja. Konjugacija niskomolekulskih lekova sa polimerima rastvornim u vodi može rešiti neke probleme koji se tiču rastvorljivosti, nestabilnosti antibiotika, loših farmakokinetičkih osobina i tkivne distribucije (Elgart et al., 2010).

Biokonjugati se sastoje od biološki aktivnih (obično malih) molekula kovalentno vezanih za molekule sa drugačijim i povoljnijim fizičko-hemijskim osobinama. Dizajnirani su tako da se konjugacijom poboljšavaju svojstva aktivne supstance koje su bitne za njenu primenu, dok se biološka aktivnost zadržava. Ovakvom modifikacijom može se povećati rastvorljivost i stabilnost, smanjiti toksičnost, kao i modifikovati farmakokinetički profil određenih lekova. Može se uticati na poluživot u cirkulaciji, kao i na distribuciju i klirens molekula.

Većina polimera koji se koriste u kliničkoj praksi su sintetički i nisu biodegradabilni, a hemijskim modifikacijama prirodnih polimera takođe mogu nastati nedegradabilni proizvodi. Zbog toga se za konjugaciju mogu koristiti samo polimeri koji imaju molekulske mase ispod praga renalne filtracije (40 kDa). Takođe, mnogi su imunogeni i ne mogu se administrirati više puta.

Molekuli koji se najčešće koriste u reakcijama konjugacije sa antibioticima su polisaharidi rastvorni u vodi: arabinogalaktani (Nishi et al., 2007), pululan (Zhang et al., 2011), dekstran (Domb et al., 1996), galaktomanani (Tevyashova et al., 2007) i drugi. Njihove fizičko – hemijske osobine (molekulska masa, struktura, naelektrisanje) mogu značajno da utiču na farmakokinetiku i farmakodinamiku konjugata. Velika rastvorljivost u vodi, biokompatibilnost, biodegradabilnost i lakoća konjugacije čini ih atraktivnim potencijalnim nosačima lekova. Konjugacijom se značajno menja tkivna distribucija antibiotika, što je u korelaciji sa molekulskom masom polisaharida - konjugati sa polisaharidima velike molekulske mase doprinose ne samo povećanju rastvorljivosti antibiotika, već i povoljnijoj distribuciji i vrlo malom klirensu. Razlog tome je ograničena permeabilnost zidova krvnih sudova koja je uslovljena veličinom molekula, zbog čega je distribucija antibiotika u cirkulaciji maksimalna, odnosno koncentracija u krvi značajno veća u odnosu na nemodifikovani lek.

Amfotericin B može biti vezan za odgovarajući nosač i tako da jedan deo antibiotika reaguje sa nosačem kovalentno, a drugi deo interaguje nekovalentno (Sedlak et al., 2001). „Nekovalentni“ amfotericin B se oslobađa prvi, a „kovalentni“ dejstvom hidrolitičkih enzima, čime se postiže produženo dejstvo antibiotika u cirkulaciji. Kao nosač se može koristiti metoksiipolietilenglikol, koji je netoksičan, lako se eliminiše iz organizma putem bubrega, a njegov hidrofilni karakter doprinosi solubilizaciji hidrofobnih molekula formiranjem koloidnih sistema.

U slučaju infekcija parazitima, kao što je *Leishmania spp.*, veoma je značajno obezbediti dostavu antiparazitskog leka u parazitoporne vakuole koje se formiraju unutar inficiranih makrofaga. Ove vakuole imaju osobine veoma slične lizozomima i endozomima - nizak pH, prisustvo degradativnih enzima kao što su katepsini, kao i drugih proteina karakterističnih za ove organele. Osnovna strategija u dizajnu formulacija ciljanih za ovu vrstu infekcija je vezivanje antiparazitskih lekova za nosače koji se specifično mogu razgraditi dejstvom lizosomalnih enzima. Jedan od takvih konjugata je N-(2-hidroksipropil)-metakrilamid (HPMA) kopolimer sa amfotericinom B koji je za HPMA vezan pomoću GlyPheLeuGly linkera koji se specifično razgrađuje u lizozomima, omogućavajući pri tom ciljanu dostavu leka u parazitoporne vakuole (Nicoletti et al., 2009).

## 2.5. Boje

Prirodne i sintetičke boje su jedinjenja koja imaju značajnu ulogu u svakodnevnom životu ljudi. Širok spektar tehničkih i industrijskih aplikacija (od uobičajene primene u bojenju tekstila, preko izrade organskih svetlećih dioda, displeja na bazi tečnih kristala, do fluorescentnog obeležavanja) uslovio je obimna istraživanja u oblasti boja, čiji je osnovni razlog stalna potreba za povećanom efikasnošću bojenja, pospešivanjem fotohemijskih i fotofizičkih osobina boja (Mula et al., 2008), sa posebnim osvrtom na razvoj ekoloških procedura (Mirjalili et al., 2011), smanjenje toksičnosti (Lee i Pavlostathis, 2004) i troškova proizvodnje.

Pristup koji omogućava ispunjenje ovih zahteva je izvođenje hemijskih reakcija (kovalentnih i nekovalentnih – jonskih, dipol-dipol interakcija, formiranja inkluzionih kompleksa) između boja i polimernih materijala. Ovako dobijeni polimeri imaju brojne primene u štampanju, bojenju tekstila, medicini, analitici, fotohemiji, elektrohemiji, kao i u tretmanu otpadnih voda (Fleischmann et al., 2015). Osnovna prednost ovakvih sistema u odnosu na niskomolekulska jedinjenja je mogućnost kontrole svojstava (rastvorljivosti, stabilnosti, toksičnosti) izborom adekvatnog polimera.

### 2.5.1. Prirodne boje

Prirodne boje su upotrebljavane u bojenju tekstila sve do 1856. godine, a njihov istorijat počinje još od 2600. godine pre nove ere, kada su boje ekstrahovane iz biljnih i životinjskih izvora prvi put spomenute u Kini. Feničani su u 15. veku pre nove ere koristili Tyrian purpurnu boju koju su proizvodile pojedine vrste morskih puževa, kao i indigo-boju iz biljke indigo 3000. godine pre nove ere. Boje biljnog porekla su korišćene i u Starom Egiptu za bojenje odeće mumija, kao i kod Inka za bojenje finih tekstura (Zaharia i Suteu, 2012).

### 2.5.2. Sintetičke boje

Sintetičke boje su otkrivene 1856. godine, a prva koja je korišćena bila je „boja sleza” (anilin), brilijant-fuksin i neke azo-boje sintetisane reakcijom diazotovanja koja je otkrivena 1958. godine (Zaharia i Suteu, 2012).

Sintetičke boje su organska jedinjenja koja u svojoj strukturi imaju aromatičan prsten (benzen, naftalen ili antracen) sa delokalizovanim elektronima i različitim funkcionalnim grupama. Njihova boja potiče od hromogene – hromoforne strukture (akceptora elektrona), a kapacitet bojenja zavisi od auksohromnih grupa (donora elektrona). Konfiguracija hromofora predstavljena je: azo ( $\text{RN}=\text{NR}'$ ), etilen ( $\text{R}_2\text{C}=\text{CR}'_2$ ), metin ( $\text{RCH}=\text{R}'$ ), karbonil ( $\text{RCOR}'$ ), ketimino ( $\text{RC}(=\text{NH})\text{R}'$ ), aldimino

(RC(=NR')H), disulfidnom (RS-SR'), nitro (RNO<sub>2</sub>), nitrozo (RN=O) ili hinoidnom grupom. Auksohromi su jonizujuće grupe koje obezbeđuju kapacitet vezivanja boje za određeni materijal. Uobičajeni auksohromi su: amino (RNH<sub>2</sub>), karboksilna (RCOOH), sulfonatna (RSO<sub>3</sub>H) i hidroksil-grupa (ROH) (Suteu et al., 2011).

Sintetičke boje se klasifikuju na osnovu hromofora prisutnih u molekulu na: azo, nitro, antrahinon, karotenoid, stilben, tiazol, difenilmetan, akridin, indamin, ftalocijanin, trifenilmetan i druge boje. Imaju raznolike i stabilne hemijske strukture koje mogu da zadovolje različite industrijske zahteve i često se veoma teško razgrađuju i/ili uklanjaju konvencionalnim fizičkim i hemijskim procesima: adsorpcijom, zračenjem, jonskom izmenom, oksidacijom, koagulacijom i precipitacijom, hemijskom ili fotodegradacijom (Anjaneyulu et al., 2005; Robinson et al., 2001). Takođe, veliki broj boja je otporan na dejstvo mikroorganizama, ali se poslednjih godina intenzivno razvijaju postupci u kojima se biološki agensi upotrebljavaju za obezbojavanje i biodegradaciju ovih molekula (Álvarez et al., 2013; Deive et al., 2010).

Sintetičke boje imaju veliku primenu u tekstilnoj, papirnoj, kozmetičkoj, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Ukupna svetska proizvodnja boja je procenjena na oko 10<sup>9</sup> kg godišnje (Forss i Welander, 2011). Više od 10000 boja je komercijalno dostupno i najmanje 10% od iskorišćenih obojenih materijala dospe u spoljašnju sredinu u vidu štetnog otpada. Mnogi od ovih industrijskih efluenata, kao i proizvodi njihove degradacije, su toksični, mutageni, kancerogeni, alergeni, visoko konjugovani i mogu biti izuzetno štetni za žive organizme (Palmieri et al., 2005). Bez adekvatnog tretmana, ovi molekuli mogu ostati dug vremenski period u životnoj sredini (npr. poluživot hidrolizovane boje Reactive Blue 19 je oko 46 godina na pH 7 i 25 °C). Visoke koncentracije boja u vodama sprečavaju njihovu oksigenaciju i osvetljenost, čime onemogućavaju biološku aktivnost fotosintetskih i drugih vodenih organizama (Zaharia i Suteu, 2012).

Najzastupljenije boje u tekstilnoj industriji se mogu svrstati u dve velike klase jedinjenja – azo i antrahinonske derivate, koji čine 65-75% svih jedinjenja koja se upotrebljavaju u bojenju tekstila, zbog svojih izuzetnih svojstava (kvaliteta fiksiranja, otpornosti na mikrobnu degradaciju, visoke fotolitičke stabilnosti). Azo-boje se karakterišu reaktivnim grupama koje grade kovalentne veze sa HO-, HN- ili HS- grupama i obično



su žute, narandžaste i crvene boje. Različiti antrahinonski derivati imaju širok spektar boja, gotovo iz cele vidljive oblasti, ali se najčešće upotrebljavaju ljubičasta, plava i zelena boja (Fontenot et al., 2003).

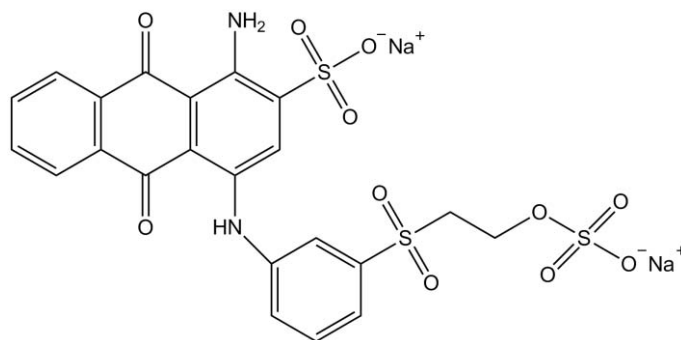
### **2.5.2.1. Antrahinonske boje**

Antrahinonske boje se sintetišu uvođenjem različitih supstituenata u molekul antrahinona koji se dobija oksidacijom antracena. Takođe, redak mineral hoelit je prirodan izvor antrahinona (Fleischmann et al., 2015). Zbog brzine bojenja i stabilnosti, ove boje su veoma zastupljene u procesima štampanja i bojenja tekstila (Epolito et al., 2005). Zavisno od supstituenata, neke antrahinonske boje (mutageni, laksativni, antifungalni derivati) pokazuju biološku aktivnost (Johnson et al., 1997), a njihove elektronske osobine ih čine značajnim kandidatima za konstruisanje fotoosetljivih materijala i uređaja za skladištenje solarne energije (Diaz, 1990).

### **2.5.2.2. Remazol Brilliant Blue R**

Remazol Brilliant Blue R (RBBR) predstavlja jednu od najznačajnijih boja u tekstilnoj industriji i često se koristi kao polazni materijal za proizvodnju polimernih boja. Koristi se za sintezu funkcionalizovanih polimera kovalentnim vezivanjem za različite mikrobne polisaharide: ksilan (Palackal et al., 2004),  $\beta$ -D-glukan iz ječma (McCleary i Shameer, 1987), kurdlan (Hartl et al., 2011) i druge, koji su komercijalno dostupni od proizvođača kao što su: „Sigma Aldrich” (Sigma Aldrich, 2015) i „Megazyme International Ireland” (Megazyme International Ireland, 2015).

RBBR je derivat antracena, dinatrijumova so 1-amino-4-[4-(1-sulfoniletil-2-sulfoksi)]-2-(9,10-antrahinon)-sulfonske kiseline (slika 2.21.). Značajan je organski zagađivač životne sredine.



Slika 2.21. Strukturna formula boje Remazol Brilliant Blue R

## 2.6. Hromogeni enzimski supstrati

Enzimi koji razgrađuju polisaharide, glikozidaze, koriste se u brojnim industrijskim aplikacijama. Jedan od najznačajnijih izvora enzima ovog tipa su mikroorganizmi koji hidrolitički razlažu polisaharide. Da bi se ovi mikroorganizmi izolovali iz prirodnih uzoraka, kolekcija sojeva ili genskih biblioteka, neophodne su efikasne „screening” metode na agarnim pločama kojima bi se napravila razlika između intaktnog i razgrađenog polisaharida. Te metode se zasnivaju na formiranju kompleksa između polisaharida i boje, gelirajućim svojstvima polisaharida i primeni rastvornih i nerastvornih obojenih polisaharida (Ten et al., 2004).

Identifikacija mikroorganizama koji proizvode određeni enzim se pretežno bazira na konvencionalnim testovima koji zahtevaju pojedinačne mikrobne kolonije, što je u mnogim slučajevima dugotrajan proces koji zahteva nekoliko koraka. Osetljivost i visoka specifičnost enzimskih testova u kojima se upotrebljavaju hromogeni enzimski supstrati (jedinjenja koja predstavljaju supstrate za ispitivane enzime čijim dejstvom dolazi do promene njihove boje koja se može pratiti vizuelno ili spektrofotometrijski) omogućava direktnu selekciju ovih mikroorganizama na agarnoj ploči, kao i određivanje enzimске aktivnosti u preparatima različitog stepena čistoće merenjem intenziteta oslobodene boje spektrofotometrijski (McCleary et al., 2014; Bøjstrup et al., 2014).

Obojeni supstrati se najčešće dodaju u hranljivu podlogu, a njihovom razgradnjom formiraju se obojeni oligosaharidi. Za razliku od intaktnih polisaharida, ovi znatno manji molekuli mogu da difunduju kroz agarnu podlogu, što uzrokuje lokalno razblaženje boje koje se može uočiti kao pojava svetlih zona na Petri šoljama oko kolonije, čiji prečnik predstavlja indikator količine produkovanog enzima (Ruijssenaars i Hartmans, 2001).

Opisane su brojne metode zasnovane na brzim, rutinskim testovima za određivanje aktivnosti velikog broja enzima koji hidrolizuju različite glikane:  $\beta$ -D-mananaze,  $\alpha$ -amilaze,  $\beta$ -(1,4)-D-glukanaze. Mnogi od njih su komercijalno dostupni i u širokoj upotrebi. Ovi hromogeni eseji su osetljivi i visoko specifični za ispitivane enzime (Ling et al., 2009).

### **3. Materijal i metode**

---

### 3.1. Materijali koji su korišćeni za sintezu funkcionalizovanih derivata polisaharida

U ovom radu su kao polazni materijali korišćeni polisaharidi biljnog (gumiarabika) i mikrobnog porekla (pululan i levan). Polisaharidi su, nakon adekvatnih hemijskih modifikacija, derivatizovani reakcijama konjugacije sa polienskim antibioticima (amfotericinom B i nistatinom) i antrahinonskom bojom Remazol Brilliant Blue R (RBBR).

Gumiarabika korišćena u ovom radu je komercijalni proizvod firme „Sigma – Aldrich Chemie GmbH“. Pululan je izolovan kao egzopolisaharid soja *Aureobasidium pullulans* CH-1, Centra za hemiju Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerziteta u Beogradu. Levan je dobijen fermentacijom saharoze pomoću soja *Bacillus licheniformis* NS032 (Gojgić – Cvijović et al., 2012).

Amfotericin B (Fungizone) i nistatin (Mycostatin) su komercijalni proizvodi firme „Bristol - Myers Squibb“, a boja Remazol Brilliant Blue R proizvođača „Sigma – Aldrich Chemie GmbH“. Enzim pululanaza M1 iz bakterije *Klebsiella planticola* je komercijalni enzim proizvođača „Megazyme International Ireland“.

### 3.2. Perjodatna oksidacija polisaharida

U cilju kovalentnog vezivanja antibiotika amfotericina B i nistatina za gumiarabiku i pululan, najpre su u molekule polisaharida uvedene reaktivne aldehidne grupe oksidacijom u kontrolisanim uslovima pomoću natrijum-perjodata. Zavisno od količine dodatog oksidacionog sredstva, dobijeni su uzorci gumiarabike koji su 18% i 50% oksidovani, kao i uzorci pululana koji su 10%, 20% i 50% oksidovani. Polialdehidni derivati polisaharida dobijeni na ovaj način mogu da se kupluju sa jedinjenjima koja imaju slobodnu amino grupu, kao što su polienski antibiotici. Pri tome nastaju Schiff-ove baze ili alkilimini, koji se u prisustvu redukcionog sredstva prevode u stabilnije alkilamine.

### 3.2.1. Perjodatna oksidacija gumiarabike

U dve Brand-ove epruvete sa zatvaračem odmereno je po 500,0 mg gumiarabike, dodato po 5,00 mL dejonizovane vode i polisaharid je rastvoren uz blago zagrevanje i intenzivno mešanje na Vortex-u. Nakon potpunog rastvaranja polisaharida, u epruvete je dodato 125,0 mg i 310,0 mg natrijum-perjodata, redom. Da bi se izbegle sporedne reakcije, epruvete su zaštićene od svetlosti uvijanjem u aluminijumsku foliju. Uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici, reakcija oksidacije je trajala šest časova na sobnoj temperaturi.

Pod istim uslovima pod kojima su pripremljeni uzorci oksidovane gumiarabike, pripremljena je i slepa proba koja u sebi nije sadržavala polisaharid, već samo identične količine natrijum-perjodata i vode kao u uzorcima analize.

Pod ovim reakcionim uslovima, očekivano je da se dobiju uzorci gumiarabike oksidovani oko 20% i 50%.

### 3.2.2. Perjodatna oksidacija pululana

U dve epruvete sa navojem rastvoreno je po 500,0 mg pululana u 10,0 mL dejonizovane vode, uz zagrevanje i intenzivno mešanje na magnetnoj mešalici. U rastvore polisaharida je zatim dodato 62,5 mg i 125,0 mg natrijum-perjodata, redom. U treći uzorak pululana (500,0 mg), rastvoren u 6,0 mL dejonizovane vode dodat je rastvor 438,5 mg natrijum-perjodata u 6,5 mL vode. Epruvete su zaštićene od svetlosti i, uz neprestano mešanje na magnetnoj mešalici, ostavljene na sobnoj temperaturi dva (prva dva uzorka), odnosno četiri časa (treći uzorak).

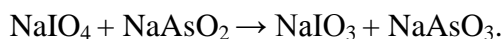
Uporedo sa ovim uzorcima pripremljeni su i odgovarajući rastvori natrijum-perjodata u identičnim koncentracijama kao u ove tri analize, bez dodatog polisaharida, koji će u daljem radu biti korišćeni kao slepe probe.

Rastvori oksidovanog pululana koji su nakon isteka reakcionog vremena bili veoma viskozni, razblaženi su dejonizovanom vodom u odnosu 1:1 (v/v).

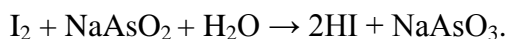
Očekivani procenti oksidacije pululana pod ovim uslovima bili su 10%, 20% i 50%.

### 3.2.3. Određivanje procenta oksidacije polisaharida jodometrijskom titracijom

Procenat oksidacije polisaharida određen je jodometrijskom titracijom, Fleury-Langeovom metodom (Dryhurst, 1966), koja se zasniva na kvantitativnoj redukciji perjodata do jodata u prisustvu natrijum-arsenita u višku:



Nakon završene reakcije, neizreagovani arsenit se titruje standardnim rastvorom joda, u prisustvu kalijum-jodida i skroba kao indikatora:



Reakcije se izvode u neutralnom ili slabo baznom rastvoru, dodavanjem određene količine natrijum-bikarbonata u višku, u cilju neutralizacije nastale jodovodonične kiseline.

Na osnovu razlika u zapreminama joda utrošenog za titraciju analize i slepe probe, može se izračunati broj molova perjodata potrošenog za oksidaciju polisaharida.

U dva erlenmajera sa šlifovanim zatvaračima od 250 mL odmereno je po 1,7 g natrijum-bikarbonata, 10,00 mL standardnog rastvora 0,1 N natrijum-arsenita i 2,0 mL slepe probe i uzorka, redom. Erlenmajeri su, uz povremeno mućkanje, ostavljeni 20 minuta zaštićeni od svetlosti. Nakon završetka reakcije između neizreagovanog natrijum-perjodata i natrijum-arsenita, u erlenmajere je dodato po 1,0 mL 20% rastvora kalijum-jodida u vodi i 0,5% rastvora skroba kao indikatora. Rastvori su titrovani standardnim rastvorom 0,02 N joda, do prve stabilne pojave plave boje.

Broj molova joda utrošenog za titraciju uzoraka izračunava se prema jednačini:

$$n = M \cdot V, \text{ gde je:}$$

$n$  – broj molova joda utrošenog za titraciju;

$M$  – molaritet standardnog rastvora joda;

$V$  – razlika zapremina standardnog rastvora joda utrošenih na titraciju uzoraka oksidovanih polisaharida i slepe probe.

Broj molova perjodata preračunat na početnu zapreminu uzorka ( $n_1$ ) izračunava se iz proporcije:

$$n_1 : V_1 = n : 2 \text{ mL, gde je:}$$

$V_1$  – celokupna zapremina analize.

Broj molova anhidrovanih jedinica polisaharida koji se nalaze u analizi ( $n_2$ ) izračunava se prema jednačini:

$$n_2 = m / 0,162 \text{ g mol}^{-1}, \text{ gde je:}$$

$m$  – masa polisaharida odmerenog za perjodatnu oksidaciju;

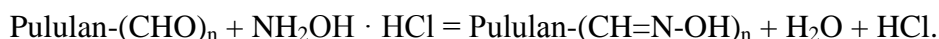
$0,162 \text{ g mol}^{-1}$  – prosečna masa anhidrovane heksoze.

Procenat oksidacije polisaharida izračunava se prema formuli:

$$\% \text{ oksidacije} = n_1 / n_2 \times 100.$$

### **3.2.4. Određivanje sadržaja aldehidnih grupa hidroksilamin-hidrohloridnim metodom**

Sadržaj aldehidnih grupa u oksidovanim uzorcima pululana određen je hidroksilamin-hidrohloridnom metodom (Zhao i Heindel, 1991), koja se zasniva na reakciji aldehidnih grupa polisaharida sa  $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$  pri čemu nastaju odgovarajući oksimi:



U reakciji se oslobađa hlorovodonična kiselina koja se titruje standardnim rastvorom natrijum-hidroksida. Završna tačka titracije određena je praćenjem promene boje indikatora metil-oranž.



Za titracije je korišćen 0,25 N hidroksilamin-hidrohlorid pripremljen na sledeći način: 1,75 g je rastvoreno u 15,0 mL dejonizovane vode u koju je dodato 0,60 mL indikatora metil-oranž (0,05%). Rastvor je zatim razblažen do zapremine od 100,0 mL u normalnom sudu.

Odmereno je po 20,0 mg liofilizovanih uzoraka oksidovanog pululana u odgovarajuće erlenmajere sa šlifom i rastvoreno u po 2,50 mL 0,25 N rastvora hidroksilamin-hidrohlorida. Erlenmajeri su ostavljeni na sobnoj temperaturi 2 h uz neprekidno mešanje na magnetnoj mešalici. Smatra se da je to vreme dovoljno da sve aldehidne grupe kvantitativno izreaguju sa hidroksilamin-hidrohloridom i da nastanu odgovarajući oksimi pululana. Nakon isteka vremena, oslobođena HCl je titrovana standardnim rastvorom 0,1 N natrijum-hidroksida, do promene boje indikatora metil-oranž iz crvene u žutu. Uporedo sa analizom, rađena je i slepa proba.

Sadržaj aldehidnih grupa u svakom uzorku oksidovanog pululana izračunat je na osnovu sledeće formule:

$$\% \text{ CHO} = [(V - V_{\text{sp}}) \cdot N \cdot 0,162] / m, \text{ gde je:}$$

V – zapremina uzorka;

V<sub>sp</sub> – zapremina slepe probe;

N – normalitet standardnog rastvora natrijum-hidroksida;

0,162 g mol<sup>-1</sup> – prosečna masa anhidrovane heksoze;

m – masa polisaharida u uzorku.

### 3.2.5. Dijaliza i liofilizacija

Da bi se uklonio višak oksidacionog sredstva iz reakcionih smeša i time eliminisala mogućnost oksidacije drugih organskih molekula, odnosno molekula polienskih antibiotika koji se dodaju u narednoj fazi eksperimenta, neizreagovani perjodat je uklonjen dijalizom naspram dejonizovane vode.

Rastvori oksidovanih polisaharida su kvantitativno preneseni u creva za dijalizu (Spectra/Por, M. W. C. O. 12000, proizvođača „Spectrum Medical Industries, Inc.”) čiji je cut off 12 kDa. Dijaliza je rađena u laboratorijskoj čaši zaštićenoj od svetlosti, na magnetnoj mešalici, uz česte izmene demineralizovane vode.

Na svaka 24 časa proveravana je uspešnost dijalize utvrđivanjem prisustva perjodata u vodi naspram koje je rađena dijaliza. Uzorak od 100 mL vode je koncentrovan na vakuum-uparivaču do zapremine od 1-2 mL u koju je zatim dodata ista zapremina rastvora srebro-nitrata koji je prethodno pripremljen dodavanjem 1,0 mL zasićenog rastvora srebro-nitrata u vodi u 200,0 mL acetona. Pojava žutog do mrkog замуćenja označava pozitivnu reakciju na prisustvo perjodatnih i jodatnih jona. Izmene vode naspram koje su vršene dijalize oksidovanih uzoraka polisaharida su ponavljane sve do negativnih reakcija na prisustvo ovih jona.

Nakon dijalize, uzorci oksidovanih polisaharida poznatog stepena oksidacije su zaleđeni preko noći i liofilizovani u aparatu Christ Alpha 2-4 LD plus, na temperaturi od -30 °C i pritisku 0,02 mbar.

### **3.3. Sinteza konjugata oksidovanih polisaharida gumiarabike i pululana sa antibioticima amfotericinom B i nistatinom**

Rastvori oksidovanih polisaharida u puferima odgovarajućih pH vrednosti u reakciji sa polienskim antibioticima grade konjugate čije su osobine ispitivane u daljem eksperimentalnom radu.

#### **3.3.1. Sinteza konjugata oksidovane gumiarabike i pululana sa amfotericinom B**

Liofilizovani uzorci gumiarabike različitog stepena oksidacije (50,0 mg) rastvoreni su u 5,00 mL 0,1 M boratnog pufera, pH 11,0. U rastvore je dodato 25,0 mg i 50,0 mg

amfotericina B, redom. Reakcija konjugacije je rađena u odsustvu svetlosti, uz neprestano mešanje na magnetnoj mešalici, na temperaturi od 40 °C, u toku 48 sati.

Uzorci liofilizovanog oksidovanog pululana sa različitim stepenom oksidacije rastvoreni su u 0,1 M boratnom puferu, pH 11:

- 36,6 mg 10% oksidovanog pululana rastvoreno je u 4,00 mL pufera i dodato je 6,0 mg amfotericina B;
- 75,0 mg 30% oksidovanog pululana rastvoreno je u 5,00 mL pufera i dodato je 35,0 mg amfotericina B;
- 75,0 mg 70% oksidovanog pululana rastvoreno je u 5,00 mL pufera i dodato je 80,0 mg amfotericina B.

Reakcione smeše su zaštićene od svetlosti i mešane na magnetnoj mešalici na 40 °C u trajanju od 48 sati.

### **3.3.2. Sinteza konjugata oksidovane gumiarabike i pululana sa nistatinom**

Liofilizovani uzorci gumiarabike očekivanih procenata oksidacije 20% i 50% (50,0 mg) rastvoreni su u 5,00 cm<sup>3</sup> 0,1 M boratnog pufera, pH 9,1. U tako pripremljene rastvore je dodato 15,0 mg i 60,0 mg nistatina, redom, posle čega su reakcione smeše zaštićene od svetlosti i mešane još 48 časova na temperaturi od 40 °C.

U uzorke liofilizovanog pululana različitog stepena oksidacije rastvorene u 0,1 M boratnom puferu, pH 9,1 dodat je nistatin, tako da je odnos polisaharida i antibiotika bio isti kao u reakcijama sa amfotericinom B (poglavlje 3.3.1.). Reakcije su izvođene u mraku, uz neprestano mešanje, 48 h na 40 °C.

### 3.3.3. Dijaliza i liofilizacija

Sintetisani konjugati oksidovanih polisaharida sa nistatinom i amfotericinom B oslobođeni su od viška neizreagovanog antibiotika dijalizom (cut off 12 kDa) naspram dejonizovane vode, u odsustvu svetlosti.

Prisustvo antibiotika u vodi naspram koje je vršena dijaliza proveravano je UV spektroskopijom: uzorak od 100 mL vode je koncentrovan na vakuum-uparivaču do zapremine od 1-2 mL, nakon čega je snimljen UV-Vis spektar u oblasti 260 – 450 nm. Odsustvo pikova karakterističnih za nistatin i amfotericin B označavalo je završetak dijalize.

Nakon dijalize, konjugati polisaharida sa antibioticima su zaleđeni preko noći i liofilizovani u aparatu Christ Alpha 2-4 LD plus, na temperaturi od -30 °C i pritisku 0,02 mbar.

### 3.3.4. Strukturna karakterizacija konjugata polisaharida sa antibioticima

U cilju karakterizacije konjugata antibiotika amfotericina B i nistatina i oksidovanih polisaharida gumiarabike i pululana i ispitivanja retencije strukture kuplovanih antibiotika koja je neophodna za njihovu aktivnost, urađene su standardne instrumentalne metode strukturne analize: spektroskopija u ultraljubičastoj i vidljivoj (UV-Vis), infracrvenoj oblasti (FT-IR) i protonska nuklearna magnetno – rezonantna spektroskopija ( $^1\text{H}$  NMR). Pored spektralnih tehnika, kovalentno vezivanje antibiotika za oksidovane uzorke polisaharida ispitano je takođe i tankoslojnom hromatografijom (TLC). Upoređivanje termalne stabilnosti dobijenih konjugata sa antibioticima i čistim polisaharidima urađeno je termogravimetrijskom i diferencijalnom termičkom analizom (TG-DTA).

UV-Vis spektri rastvora antibiotika, oksidovanih polisaharida i njihovih konjugata snimljeni su na UV-Vis skenirajućem spektrofotometru GBC Cintra 40 u oblasti 260-

450 nm. Uzorci su pripremljeni rastvaranjem u smeši rastvarača dimetil-sulfoksid i voda, 1:3 (v/v).

FT-IR spektri polisaharida, oksidovanih polisaharida, antibiotika i njihovih konjugata snimljeni su na FT-IR spektrofotometru Thermo – Nicolet 6700 (Thermo Scientific, USA) u tehnici snimanja smanjenjem totalne refleksije (eng. attenuated total reflectance, ATR) ili u kalijum-bromid disku, u oblasti  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$  pri rezoluciji od  $4\text{ cm}^{-1}$  u transmisionom modu.

$^1\text{H}$  NMR spektri polisaharida, oksidovanih polisaharida, antibiotika i njihovih konjugata snimljeni su na aparatu Varian Gemini 2000 na 500 MHz, u deuterisanom dimetil-sulfoksidu kao rastvaraču, uz dodatak tetrametil-silana kao eksternog standarda.

Termalna stabilnost polisaharida, oksidovanih polisaharida, antibiotika i njihovih konjugata ispitivana je termogravimetrijski, na aparatu SDT Q600 (TA instruments) za simultanu analizu promene mase uzorka i diferencijalnu termičku analizu (eng. thermogravimetric analysis/differential thermal analysis, TGA/DTA). Eksperimenti su izvođeni u opsegu od sobne temperature do  $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ , u platinskim posudama i dinamičnoj atmosferi azota sa protokom  $100\text{ mL min}^{-1}$ , sa brzinom zagrevanja od  $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ .

Konjugati gumiarabike i pululana sa nistatinom i amfotericinom B analizirani su tankoslojnom hromatografijom (TLC) na Silica gel 60 pločama, kao i na Silica gel 60 F<sub>254</sub> pločama sa ultraljubičastim indikatorom proizvođača „Merck & Co., Inc.” Rastvori polisaharida, antibiotika, njihove smeše (2:1, w/w) i konjugata u dimetil-sulfoksidu u koncentraciji  $1\text{ mg mL}^{-1}$  nanošeni su na ploče (po  $20\text{ }\mu\text{L}$ ). Za razdvajanje je korišćen sistem razvijača hloroform:metanol:amonijak, 4:10:1 (v/v/v). Hromatogrami su vizuelizovani pod UV svetlom, kao i prskanjem 50% sumpornom kiselinom i izazivanjem boje zagrevanjem na  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  u trajanju od 5 minuta.

### 3.3.5. Određivanje stabilnosti konjugata gumiarabike i nistatina

Ispitana je stabilnost konjugata gumiarabike i nistatina u različitim uslovima: u suvom obliku, u rastvoru i na različitim pH vrednostima.

Liofilizovani konjugat je čuvan na sobnoj temperaturi u periodu od 6 meseci, zaštićen od svetlosti. Uzorci su uzimani nakon 7, 30, 90 i 180 dana. Hemijska stabilnost rastvora konjugata u dejonizovanoj vodi određena je UV spektroskopijom, merenjem apsorbance na 307 nm.

Rastvori konjugata, nistatina i smeše gumiarabike i nistatina, 1:1 (w/w) u 0,1 M fosfatnom puferu, pH 7,4 su inkubirani na 25 °C, zaštićeni od svetlosti, u trajanju od 7 dana. Tokom ovog perioda, uzorci su uzimani na svaka 24 časa i analizirani UV spektroskopijom.

Rastvori konjugata u puferima različitih pH vrednosti (0,5 M natrijum-acetatni pufer, pH 4,0 i 5,0; 0,5 M natrijum-fosfatni pufer, pH 6,0, 7,0 i 8,0; 0,5 M natrijum-boradni pufer, pH 9,0) inkubirani su na 25 °C. Uzorci su uzimani nakon 24 časa i stabilnost je određena merenjem apsorbance na 307 nm.

### 3.3.6. Kontrolisano oslobađanje antibiotika iz konjugata pululana i nistatina

Kontrolisano oslobađanje antibiotika iz konjugata praćeno je na fiziološkoj pH vrednosti, kao i u kiseloj sredini, u vremenskom periodu od 24 časa (Nishi et al., 2007).

Rastvori konjugata (1%, w/v, 0,5 mL) u dejonizovanoj vodi stavljeni su u dva creva za dijalizu (cut off 3,5 kDa) i dijalizovani naspram 5,0 mL PBS (8,0 g L<sup>-1</sup> NaCl, 0,2 g L<sup>-1</sup> KCl, 0,2 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> i 1,15 g L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), pH 7,4 i 0,1 M hlorovodonične kiseline, pH 1,5. Dijaliza je rađena na 37 °C, uz neprestano mešanje na rotacionoj mućkalici (150 rpm), u odsustvu svetlosti. U određenim vremenskim intervalima uzimana je celokupna količina rastvora naspram kojih je rađena dijaliza i snimani su

njihovi UV-Vis spektri, kako bi se utvrdilo prisustvo oslobođenog antibiotika. Istovremeno je dodavana nova količina pufera, odnosno kiseline i eksperiment je nastavljan u istim uslovima.

### 3.3.7. Određivanje antifungalne aktivnosti konjugata polisaharida sa antibioticima

Antifungalna aktivnost konjugata je određena spot - testom na soj *Candida albicans* ATCC 24433. Polazne koncentracije konjugata su pripremljene u smeši rastvarača dimetil-sulfoksid i voda, 1:3 (v/v), a od njih su dalje pravljena razblaženja u sterilnoj demineralizovanoj vodi. Rastvori antibiotika su upotrebljeni kao pozitivna kontrola za poređenje, a smeša rastvarača kao negativna kontrola. U testu je korišćena suspenzija mikroorganizma *C. albicans* u stacionarnoj fazi rasta.

#### 3.3.7.1. Pripremanje podloge za *Candida albicans*

Za gajenje test mikroorganizma i za antibiogram test je korišćena podloga sledećeg sastava ( $\text{g L}^{-1}$ ):

Pepton 1.....	10,0
Ekstrakt kvasca.....	5,0
Mesni ekstrakt.....	5,0
Glukoza.....	10,0
Natrijum-hlorid.....	10,0
Agar.....	25,0

Podloga je sterilisana u autoklavu na 121°C, 20 minuta, a pH vrednost podloge nakon sterilizacije bila je u intervalu 6,0-6,2.

### 3.3.7.2. Antibiogram test

Agarne ploče su pripravljene tako što je 100  $\mu\text{l}$  suspenzije ( $1 \cdot 10^5$  CFU  $\text{ml}^{-1}$ ) 24-časovne kulture *C. albicans* u fiziološkom rastvoru sipano u Petri šolje i prelivano otopljenom i prohladenom podlogom.

Na zasejane agarne ploče nanošeno je po 10  $\mu\text{l}$  rastvora antibiotika. Nakon 24-časovne inkubacije na 28 °C merene su zone inhibicije na agarnoj ploči. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) je najmanja koncentracija antibiotika koja pokazuje vidljivu zonu inhibicije.

## 3.4. Sinteza konjugata pululana i levana sa antrahinonskom bojom Remazol Brilliant Blue R

Rastvor pululana pripremljen je rastvaranjem 4,000 g liofilizovanog pululana u 50,0 mL dejonizovane vode, uz zagrevanje i mešanje na magnetnoj mešalici. Rastvor RBBR pripremljen je rastvaranjem 0,500 g boje u 50 mL dejonizovane vode. Nakon potpunog rastvaranja supstanci, rastvori su pomešani u erlenmajeru i ostavljeni u termostatu na 50 °C, uz neprestano mešanje na magnetnoj mešalici u trajanju od 1 h. Tokom tog vremena, u pravilnim vremenskim intervalima, dodavane su približno jednake količine natrijum-sulfata do ukupne količine od 10,0 g. Po isteku vremena u reakcionu smešu je dodato 5,0 mL 0,6 M natrijum-fosfata i reakcija je nastavljena još 1 h pod istim uslovima (50 °C, uz neprestano mešanje).

Nakon hlađenja reakcione smeše obojeni polisaharid je staložen trostrukom zapreminom hladnog etanola i centrifugiran 15 minuta na 4000 obrtaja  $\text{min}^{-1}$ . Dobijeni talog je resuspendovan u demineralizovanoj vodi mešanjem na Vortex-u i postupak taloženja je ponovljen još četiri puta pod istim uslovima, u cilju što boljeg oslobađanja konjugata od viška neizreagovane boje.

Na isti način sintetisan je i prečišćen konjugat levana sa RBBR.



### 3.4.1. Dijaliza i liofilizacija

Posle postupka prečišćavanja taloženjem etanolom, rastvori obojenih polisaharida su stavljeni na dijalizu (cut off 8 kDa) naspram dejonizovane vode u trajanju od sedam dana, da bi se što efikasnije uklonili tragovi nevezane boje koja je na početku reakcije bila dodata u višku. Na svaka 24 časa proveravano je prisustvo RBBR u vodi naspram koje je izvođena dijaliza: uzorak od 100 mL je koncentrovan na vakuum uparivaču do zapremine od 1-2 mL, a zatim je spektrofotometrijski (merjenjem apsorbance na 595 nm) utvrđivano prisustvo boje.

Nakon dijalize, uzorci obojenih polisaharida su zaleđeni preko noći i liofilizovani na temperaturi od -30 °C i pritisku 0,02 mbar.

### 3.4.2. Strukturna karakterizacija konjugata pululana i levana sa bojom Remazol Brilliant Blue R

Strukturna karakterizacija konjugata pululana i levana sa RBBR urađena je standardnim instrumentalnim metodama: UV-Vis, FT-IR, <sup>1</sup>H NMR spektroskopijom, elementalnom organskom mikroanalizom (EOMA) i termogravimetrijom. Tankoslojnom hromatografijom potvrđeno je kovalentno vezivanje boje za molekule polisaharida.

UV-Vis spektri vodenih rastvora RBBR i konjugata snimljeni su na UV-Vis skenirajućem spektrofotometru GBC Cintra 40 u oblasti 250-800 nm.

FT-IR spektri polisaharida, RBBR i konjugata snimljeni su aparatom Thermo – Nicolet 6700 (Thermo Scientific, USA) u tehnici snimanja ATR, u oblasti 4000-400 cm<sup>-1</sup> pri rezoluciji od 4 cm<sup>-1</sup> u transmisionom modu.

<sup>1</sup>H NMR spektri polisaharida, RBBR i konjugata snimljeni su na aparatu Varian Gemini 2000 na 200 MHz, u deuterijum-oksidu kao rastvaraču, uz dodatak tetrametil-silana kao eksternog standarda.

Elementalna organska mikroanaliza uzoraka polisaharida, RBBR i konjugata urađena je na aparatu Vario EL III Analyzer (Hanau Instruments, Germany). Uzorci su analizirani u duplikatu.

Termalna stabilnost pululana, RBBR i konjugata ispitivana je termogravimetrijski, na aparatu SDT Q600 (TA instruments) za simultane TGA/DTA analize. Eksperimenti su rađeni u opsegu od sobne temperature do 600 °C, u dinamičnoj atmosferi azota, sa brzinom zagrevanja od 20 °C min<sup>-1</sup>.

Tankoslojnom hromatografijom na Silica gel 60 pločama proizvođača „Merck & Co., Inc” analizirani su rastvori pululana i levana, RBBR, i njihovih konjugata (1 mg mL<sup>-1</sup>) u demineralizovanoj vodi. Za razdvajanje je korišćen sistem razvijaača metanol:amilalkohol:voda, 5:5:2 (v/v/v). Hromatogrami su vizuelizovani direktno na dnevnoj svetlosti, kao i prskanjem 10% sumpornom kiselinom i zagrevanjem na 100 °C, 5 minuta.

### **3.4.3. Određivanje stabilnosti konjugata pululana i levana sa bojom Remazol Brilliant Blue R**

Zbog potencijalne primene konjugata kao hromogenih supstrata za enzimske testove i ispitivanje pululanazne i fruktanazne aktivnosti mikroorganizama, ispitivana je stabilnost rastvora kovalentno kuplovanih polisaharida pululana i levana sa RBBR na različitim pH vrednostima na sobnoj temperaturi, kao i u uslovima sterilizacije u autoklavu.

Napravljeni su 0,1% rastvori konjugata pululana i levana sa RBBR u puferima čije su pH vrednosti optimalne za rast većine mikroorganizama: 100 mM acetatnom (pH 4,0), 100 mM citratnom (pH 5,0), 100 mM TRIS-HCl (pH 7,5) i 100 mM boratnom puferu (pH 9,0). Rastvori približno neutralne pH vrednosti su sterilisani u autoklavu na 121 °C u trajanju od 30 min. Da bi se ispitala stabilnost rastvora u pomenutim uslovima, snimani su UV-Vis spektri i poređeni položaji i intenziteti apsorpcionih maksimuma

rastvora u puferima različitih pH vrednosti i u demineralizovanoj vodi, na sobnoj temperaturi, pre kao i posle autoklaviranja.

#### **3.4.4. Ispitivanje pululanazne aktivnosti upotrebom konjugata pululana sa RBBR kao hromogenog supstrata**

Pomoću sintetisanih konjugata kao hromogenih supstrata ispitivana je aktivnost komercijalnog enzima pululanaze, kao i mikroorganizma *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Enzimski test je razvijen i optimizovan sa komercijalno dostupnim enzimom pululanazom M1 iz mikroorganizma *Klebsiella planticola* (EC 3.2.1.41, 700 U mL<sup>-1</sup>). Pululanaza (1,6- $\alpha$ -pululan – hidrolaza) je enzim koji vrši hidrolizu pululana i skrobu sličnih polisaharida raskidanjem  $\alpha$ -(1,6)-glikozidnih veza (Domafi – Pytka i Bardowski, 2004; Hii et al., 2012). Enzimskom hidrolizom hromogenih supstrata dolazi do oslobađanja boje čiji intenzitet može da se prati spektrofotometrijski, merenjem apsorbanca na određenoj talasnoj dužini.

Enzim i obojeni polisaharid (1%, w/v) su rastvoreni u 200 mM natrijum-acetatnom puferu, pH 5,0 i rastvori su ekvilibrisani u termostatu na 37 °C u trajanju od 10 minuta. U uzorke rastvora obojenog pululana dodate su različite zapremine enzima, a supstrat bez dodatog enzima je korišćen kao slepa proba. Enzimska reakcija je izvođena 10 minuta na 37 °C, nakon čega je polimer iz reakcione smeše staložen dodavanjem trostruke zapremine hladnog etanola. Nakon centrifugiranja (10000 rpm, 10 minuta), u supernatantima je merena apsorbanca na 595 nm.

Da bi se dokazala pululanazna aktivnost mikroorganizma *Bacillus subtilis* ATCC 6633 pripremljena je hromogena hranljiva podloga sledećeg sastava (g L<sup>-1</sup>):

Pepton 1.....	15,0
Mesni ekstrakt.....	3,0
Natrijum-hlorid.....	5,0
Kalijum-hidrogenfosfat.....	0,3
Konjugat pululan – RBBR.....	1,0
Agar.....	18,0

Podloga je sterilisana u autoklavu na 121°C, 20 minuta.

Nakon očvršćavanja, na podlogu je zasejan test – mikroorganizam i Petri šolje su ostavljene u termostatu na 37 °C 48 časova.

## **4. Rezultati i diskusija**

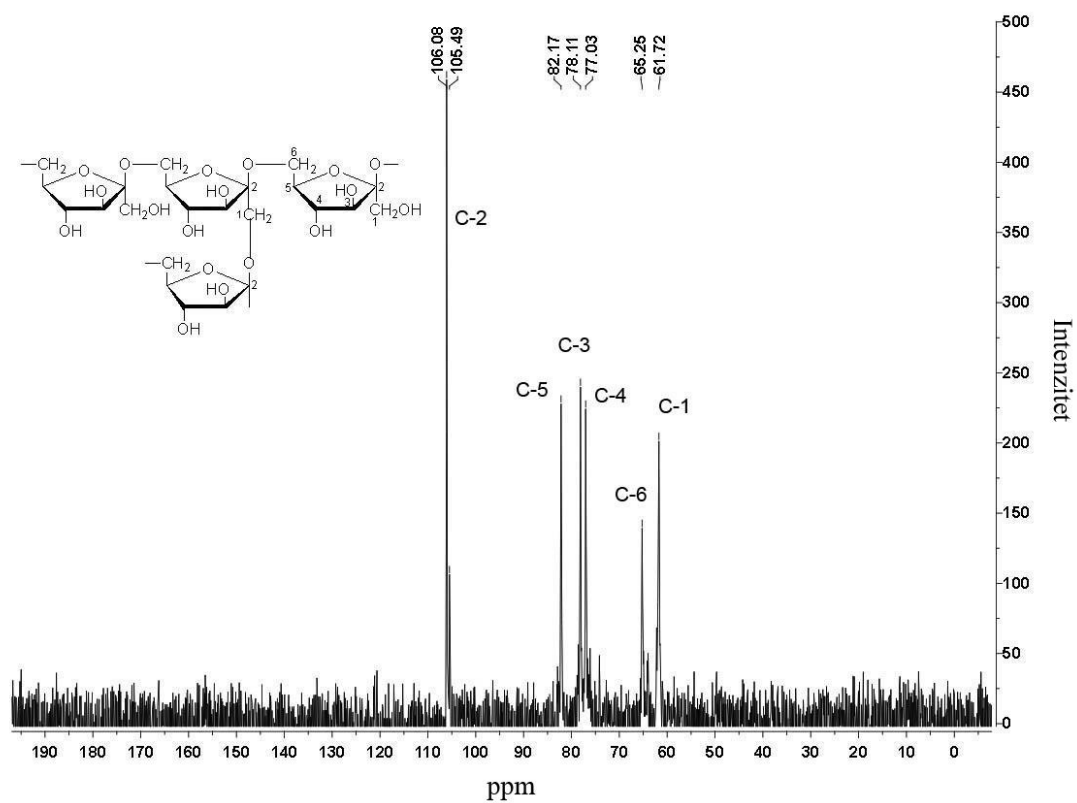
---

U okviru ove doktorske teze sintetisani su i strukturno okarakterisani konjugati gumiarabike i pululana sa polienskim antifungalnim antibioticima nistatinom i amfotericinom B, kao i konjugati pululana i levana sa antrahinonskom bojom Remazol Brilliant Blue R. Ispitana je biološka aktivnost sintetisanih funkcionalizovanih polisaharida i dokazana mogućnost njihove primene.

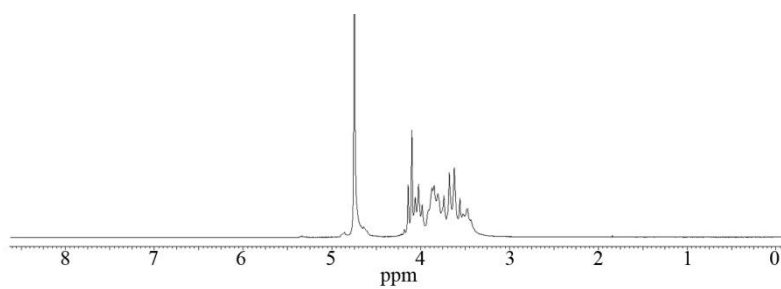
#### 4.1. Polisaharidi upotrebljeni za sintezu konjugata

Pululan koji je korišćen u ovom radu proizvod je dimorfnog mikroorganizma, kvascu slične gljive *A. pullulans* CH-1 iz Zbirke Centra za hemiju Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju u Beogradu. Na osnovu strukturne karakterizacije ovog polisaharida utvrđeno je da osnovni niz čine maltotriozni fragmenti povezani (1→6)-glikozidnim vezama koji se ponavljaju, kao i maltotetraozni ostaci (oko 7%) čiji je raspored u polimernom nizu nasumičan (Jakovljević et al., 2001).

Levan je dobijen fermentacijom saharoze pomoću soja *B. licheniformis* NS032 (Gojgić – Cvijović et al., 2012). Egzopolisaharid je izolovan iz fermentacione tečnosti taloženjem etanolom, dijalizom i liofilizacijom. Specifična rotacija ovog polimera je iznosila  $[\alpha]_{25} = -41,8$  ( $C = 0,1 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ), što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim na osnovu određivanja ovog parametra u drugim fruktanima sa  $\beta$ -glikozidnim vezama koji su izolovani iz različitih mikrobioloških materijala (Han, 1990). Elementalnom organskom mikroanalizom pokazano je da se sastoji samo iz C, H i O. Totalnom hidrolizom u kiseloj sredini utvrđeno je da se u strukturi polisaharida nalazi samo D-fruktoza, što je dodatno potvrđeno i strukturnim instrumentalnim metodama (Kekez et al., 2015). Na slikama 4.1. i 4.2. su prikazani  $^{13}\text{C}$  i  $^1\text{H}$  NMR spektri dobijenog egzopolisaharida. Na osnovu spektroskopskih podataka utvrđeno je da izolovani polisaharid sadrži samo  $\beta$ -glikozidne veze i ima strukturu levana.



Slika 4.1.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar egzopolisaharida izolovanog iz fermentacione tečnosti  
*B. licheniformis* NS032



Slika 4.2.  $^1\text{H}$  NMR spektar egzopolisaharida izolovanog iz fermentacione tečnosti  
*B. licheniformis* NS032

## 4.2. Perjodatna oksidacija polisaharida

Polisaharidi koji nakon adekvatne hemijske modifikacije u osnovnom nizu imaju uvedene reaktivne aldehidne grupe mogu se kuplovati sa različitim jedinjenjima koja imaju slobodnu amino grupu, kao što su polienski antibiotici. Pri tome nastaju Schiff-ove baze ili alkilimini, koji se u prisustvu redukcionog sredstva mogu prevesti u stabilnije alkilamine.

Natrijum-perjodat je oksidujući agens koji raskida C-C veze brojnih 1,2-difunkcionalizovanih organskih jedinjenja: 1,2-diola, 1,2-hidroksi-ketona, 1,2-diketona,  $\alpha$ -ketokiselina,  $\alpha$ -hidroksikiselina, aminokiselina, 1,2-aminoalkohola, 1,2-diamina i epoksida, pri čemu nastaju odgovarajući aldehidi, ketoni i karboksilne kiseline. U hemiji polisaharida perjodat se može koristiti za vrlo efikasno i selektivno otvaranje prstenova monosaharidnih jedinica koje imaju nesupstituisane vicinalne hidroksilne grupe. Inicijalni proizvod je dialdehid u svakoj oksidovanoj monomernoj jedinici koji se može dalje oksidovati do dikarboksilata (Cumpstey, 2013). Na ovaj način se dobijaju nove reaktivne grupe duž polisaharidnog niza, kao i veća fleksibilnost, odnosno rotaciona sloboda polimera u rastvoru. Osim toga, kontrolisanim variranjem koncentracije oksidacionog sredstva, mogu se dobiti proizvodi različitog stepena oksidacije. Ekskluzija svetlosti tokom oksidacije je neophodna zbog sprečavanja sporednih reakcija (Yang et al., 2011).

U hemiji ugljenih hidrata, perjodatna oksidacija se koristi za utvrđivanje molekulske strukture šećera, analitička određivanja, kao i pripremu jedinjenja za dalji preparativni rad. Poslednjih godina se oksidaciji polisaharida pridaje veliki značaj, jer oksidovani polisaharidi imaju znatno reaktivnije grupe i brže se metabolički razgrađuju kada se koriste u kontrolisanoj dostavi lekova (Cumpstey, 2013).

Perjodatna oksidacija gumiarabike i pululana je rađena u cilju dobijanja aktiviranih polisaharida koji mogu da reaguju sa polienskim antibioticima. Polialdehidni derivati dobijeni su reakcijom sa natrijum-perjodatnim solima u vodenom rastvoru, kojom se omogućava variranje aldehidnog sadržaja u parcijalno oksidovanim polimerima, u zavisnosti od odnosa količina polisaharida i perjodata, kao i vremena trajanja reakcije.



Oksidovani proizvodi su liofilizovani nakon dijalize. Na ovaj način dobijeni su prečišćeni parcijalno oksidovani polimeri oslobođeni od viška neizreagovanih perjodatnih i jodatnih jona, čime je sprečena mogućnost oksidacije i degradacije polienskih antibiotika koji se dodaju u narednoj fazi eksperimenta.

#### 4.2.1. Perjodatna oksidacija gumiarabike

Sinteza polialdehidnog derivata gumiarabike obuhvata reakciju između ovog polisaharida i oksidujućeg agensa (natrijum-perjodata) u vodenoj fazi, prečišćavanje parcijalno oksidovanog glikana od viška perjodata i jodata pomoću dijalize i liofilizaciju (Nishi i Jayakrishnan, 2004). Oksidacija je rađena u vremenskom intervalu od 6 časova na sobnoj temperaturi, različitim koncentracijama natrijum-perjodata. Aldehidni sadržaj u oksidovanim polimerima određen je jodometrijskom titracijom. Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 4.1.

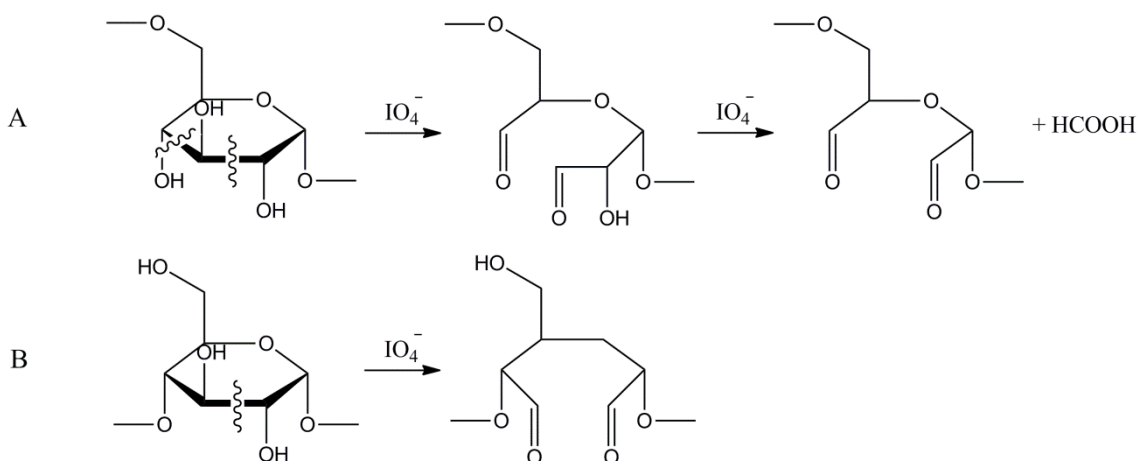
Tabela 4.1. Rezultati oksidacije gumiarabike natrijum-perjodatnim reagensom

Trajanje oksidacije (min)	Koncentracija polisaharida (mol mL <sup>-1</sup> )	Koncentracija perjodata (mol mL <sup>-1</sup> )	Stepen oksidacije (%)
360	0,6	1,2 x 10 <sup>-4</sup>	17,63
360	0,6	2,9 x 10 <sup>-4</sup>	50,00

S obzirom na kompleksnost strukture gumiarabike, ne može se prikazati tačan mehanizam oksidacije, kao ni pretpostavljena struktura dobijenog polisaharidnog derivata.

#### 4.2.2. Perjodatna oksidacija pululana

Pululan sadrži tri različite anhidroglukozne jedinice u maltotrioznom ostatku koji se pravilno ponavlja:  $-1\rightarrow6\text{-Glc}p\text{-}1\rightarrow4\text{-}$ ,  $-1\rightarrow4\text{-Glc}p\text{-}1\rightarrow4\text{-}$  i  $-1\rightarrow4\text{-Glc}p\text{-}1\rightarrow6\text{-}$ . Otuda, ovaj polisaharid sadrži različite tipove vicinalnih diolnih grupa, pa se perjodatnom oksidacijom pululana dobijaju različiti tipovi dialdehidnih struktura. Oksidacija  $-1\rightarrow6\text{-Glc}p\text{-}1\rightarrow4\text{-}$  anhidroglukoze je dvostepeni proces kojim, preko hidroksialdehidnog intermedijera, nastaju dialdehidna polisaharidna jedinica i mravlja kiselina (slika 4.3. A). Oksidacijom  $-1\rightarrow4\text{-Glc}p\text{-}1\rightarrow4\text{-}$  i  $-1\rightarrow4\text{-Glc}p\text{-}1\rightarrow6\text{-}$  anhidroglukoza nastaje isti dialdehidni proizvod (slika 4.3. B), a potrošnja perjodata je dvostruko manja, budući da u ovim jedinicama postoji po jedan par vicinalnih diola.



Slika 4.3. Oksidacija anhidroglukoza u polisaharidnom nizu:

$-1\rightarrow6\text{-Glc}p\text{-}1\rightarrow4\text{-}$  (A) i  $-1\rightarrow4\text{-Glc}p\text{-}1\rightarrow4\text{-}$  ili  $-1\rightarrow4\text{-Glc}p\text{-}1\rightarrow6\text{-}$  (B)

Oksidacijom natrijum-perjodatnim reagensom, dijalizom reakcione smeše i liofilizacijom prečišćenog glikana dobijeni su polialdehidni funkcionalizovani derivati pululana. Oksidacija je rađena 2 ili 4 časa na sobnoj temperaturi, sa različitim odnosom polisaharida i oksidacionog sredstva. Stepenn oksidacije u dobijenim polimerima određen je titracijom standardnim rastvorom joda, a procenat aldehidnih grupa hidroksilamin-hidrohlordnom metodom. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 4.2.

Sa povećanjem koncentracije natrijum-perjodata uočeno je da dolazi do geliranja nastalih parcijalno oksidovanih proizvoda. Usled otežanog preciznog odmeravanja alikvota, za uzorak najvećeg stepena oksidacije nije urađena jodometrijska titracija.

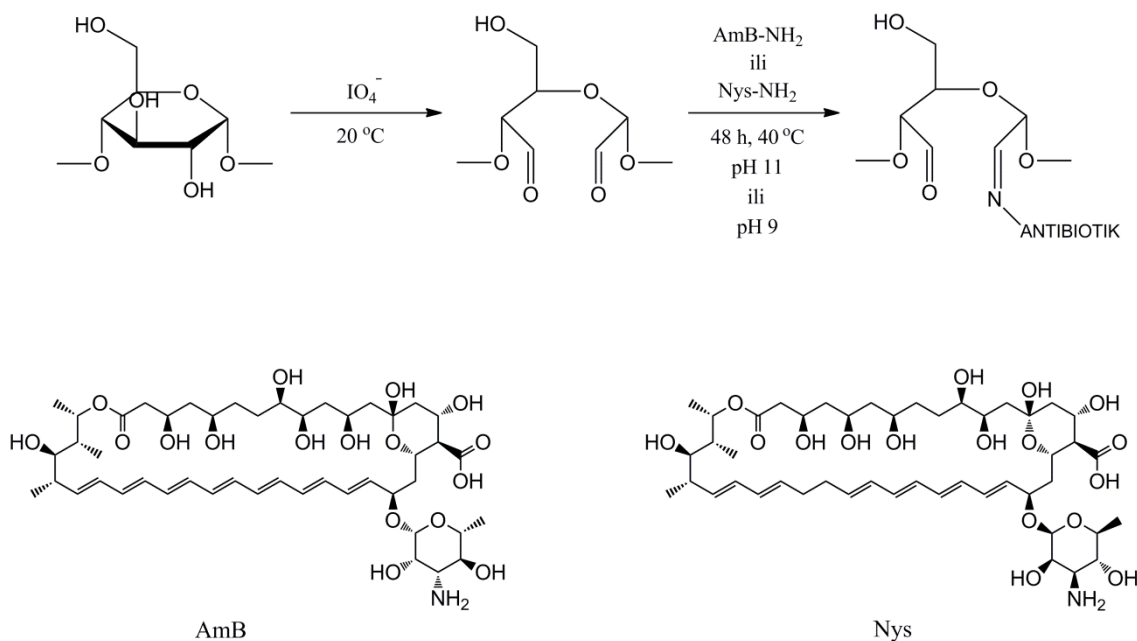
Tabela 4.2. Rezultati oksidacije pululana natrijum-perjodatnim reagensom

Trajanje oksidacije (min)	Koncentracija polisaharida (mol mL <sup>-1</sup> )	Koncentracija perjodata (mol mL <sup>-1</sup> )	Stepen oksidacije (%)	Sadržaj aldehidnih grupa (%)
120	0,3	2,9 x 10 <sup>-5</sup>	8,65	10,17
120	0,3	5,8 x 10 <sup>-5</sup>	17,44	19,29
240	0,2	1,6 x 10 <sup>-4</sup>	–	50,21

Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je da je sadržaj slobodnih aldehidnih grupa koji je određen konvencionalnim hidroksilamin-hidrohlorid-metodom nešto veći u odnosu na stepen oksidacije polisaharida određen jodometrijski. To se može objasniti otežanim prilazom titracionog sredstva (0,02 N I<sub>2</sub>) unutrašnjosti gela uzoraka, s obzirom na to da se ova titracija vrši direktno u alikvotu rastvora polisaharida i NaIO<sub>4</sub>, dok se titracija hidroksilamin-hidrohloridnog rastvora izvodi nakon dijalize i liofilizacije parcijalno oksidovanih pululana koji su potom tačno odmereni u 0,25 M rastvor NH<sub>2</sub>OH·HCl za reakciju sinteze odgovarajućih oksima.

### 4.3. Sinteza konjugata polisaharida sa antibioticima

Makrolidni polienski antibiotici nistatin i amfotericin B su kuplovani sa oksidovanim polisaharidima formiranjem veze između primarne amino grupe antibiotika i aldehidne grupe oksidovanih polisaharida, kao što je prikazano na slici 4.4.



Slika 4.4. Shema reakcije sinteze konjugata oksidovanih polisaharida sa polienskim antibioticima, amfotericinom B (AmB) i nistatinom (Nys)

Da bi se sinteza konjugata polisaharida i antibiotika ostvarila u visokom prinosu, neophodno je izabrati adekvatne reakcione uslove: određeni pufer, pH vrednost reakcione smeše i vreme trajanja reakcije. Na osnovu literaturnih podataka, najviši prinosi konjugata sa amfotericinom B dobijaju se u boratnom puferu (> 90%), u poređenju sa karbonatnim i fosfatnim (70%) (Ehrenfreund – Kleinman et al., 2002). Mogući razlog je taj da borna kiselina stvara komplekse sa diolima amfotericina B, čime se povećava njegova rastvorljivost i smanjuje mogućnost formiranja agregata. Takvo kompleksiranje pomaže da se rastvore molekuli amfotericina B u reakcionom medijumu, čime postaju dostupni za hemijsku reakciju sa oksidovanim polisaharidom. Rastvorljivost kompleksa se povećava u alkalnom rastvoru, a minimalna je u neutralnom rastvoru. Otuda, kada se reakcija konjugacije vrši u boratnom puferu na pH ispod 11, prinos je nizak (oko 30%), dok je na pH 11 prinos preko 90% (Ehrenfreund – Kleinman et al., 2002).

S obzirom na to da za nistatin nije karakteristično agregiranje molekula, za sintezu odgovarajućih konjugata sa ovim polienskim antibiotikom izbor boratnog pufera na pH oko 9 pokazao se kao optimalan (Domb et al., 1996).

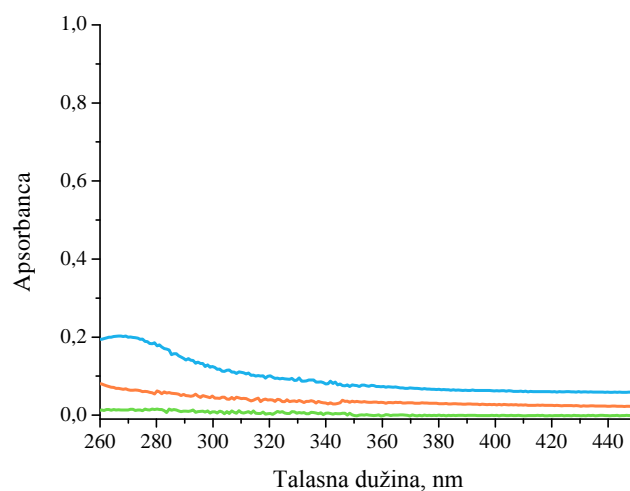
Reakcije konjugacije uzoraka oksidovanih polisaharida sa amfotericinom B rađene su u boratnom puferu, pH 11,0 u trajanju od 48 časova, na temperaturi od 40 °C, uz neprestano mešanje na magnetnoj mešalici, zaštićene od svetlosti.

Sinteze konjugata oksidovane gumiarabike i pululana sa nistatinom rađene su u boratnom puferu, pH 9,1 u vremenskom intervalu od 48 časova, uz neprestano mešanje, u odsustvu svetlosti, na temperaturi od 40 °C.

#### **4.4. UV-Vis spektroskopska karakterizacija konjugata gumiarabike i pululana sa nistatinom i amfotericinom B**

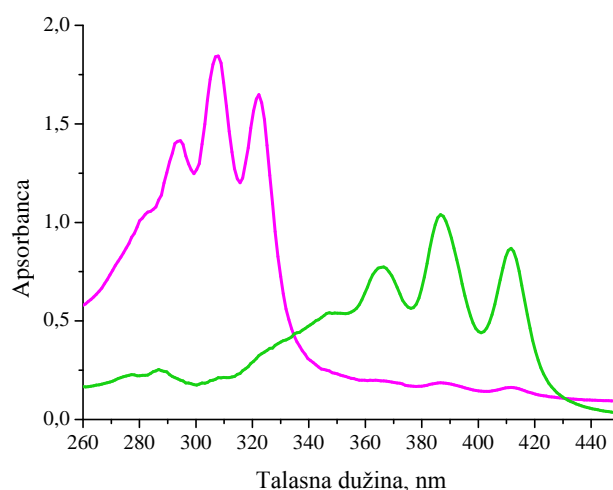
Uspešnost reakcije kuplovanja polisaharida i polienskih antibiotika ispitana je na osnovu UV-Vis spektroskopskih podataka sintetisanih konjugata. Dobijeni podaci su poređeni sa UV-Vis spektrima čistih i parcijalno oksidovanih polisaharida, kao i polienskih antibiotika.

Rastvori gumiarabike i pululana u smeši rastvarača dimetil-sulfoksid i voda, 1:3 (v/v) ne pokazuju apsorpciju u UV-Vis oblasti spektra (slika 4.5.), budući da polisaharidi, uopšteno, ne sadrže hromoforne grupe koje bi apsorbovale u ovom regionu. U spektrima rastvora oksidovanih derivata polisaharida na pH vrednostima većim od 5,2 može se uočiti pik na 240 nm koji potiče od enola nastalih tautomerizacijom aldehidnih funkcionalnih grupa formiranih tokom procesa oksidacije hidroksilnih grupa polisaharida (Drobchenko et al., 1993). U spektralnoj oblasti (260 – 450 nm) prikazanoj na slici 4.5. ne uočavaju se pikovi apsorpcije navedenih polisaharida, kao ni njihovih oksidovanih derivata. Konjugacijom oksidovanih polisaharida sa polienskim antibioticima dolazi do izrazitih promena u izgledu spektara nastalih proizvoda, što predstavlja značajnu indikaciju uspešnog kuplovanja molekula antibiotika za molekule polisaharida.

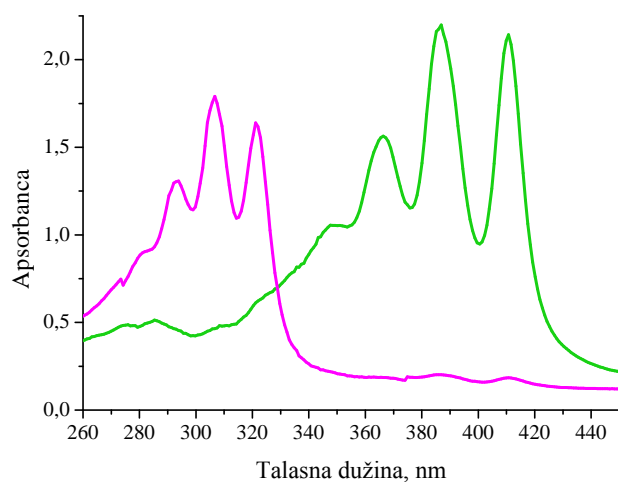


Slika 4.5. UV-Vis spektar gumiarabike (zeleno), oksidovane gumiarabike (plavo) i oksidovanog pululana (narandžasto)

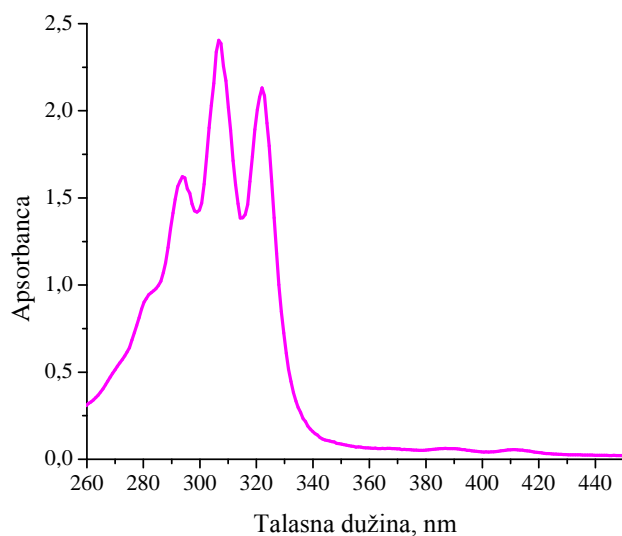
U spektrima konjugata oksidovanih polisaharida sa nistatinom (slike 4.6. i 4.7.), uočavaju se četiri karakteristična apsorpciona maksimuma na 281 nm, 294 nm, 307 nm i 323 nm. Poređenjem ovih spektara sa spektrom čistog nistatina (slika 4.8.), koji zbog prisustva polienskog segmenta u strukturi ima jedinstven i dobro definisan UV-Vis spektar (Brescansin et al., 2013), uočava se da ne postoje razlike u položaju i relativnim intenzitetima apsorpcionih pikova.



Slika 4.6. UV-Vis spektar konjugata 50% oksidovanog pululana sa nistatinom (ljubičasto) i 50% oksidovanog pululana sa amfotericinom B (zeleno)



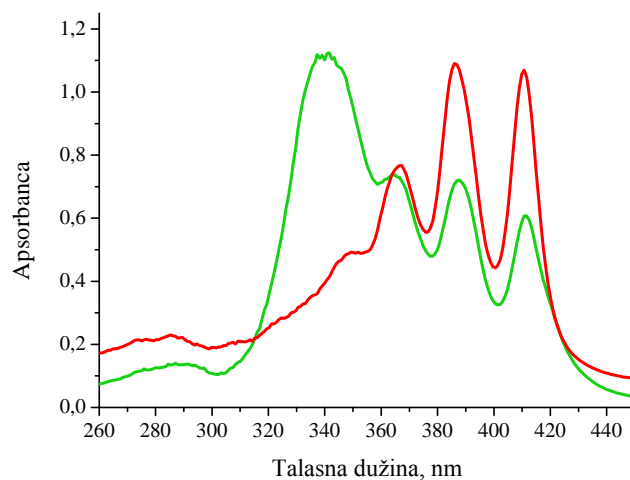
Slika 4.7. UV-Vis spektar konjugata 50% oksidovane gumiarabike sa nistatinom (ljubičasto) i 50% oksidovane gumiarabike sa amfotericinom B (zeleno)



Slika 4.8. UV-Vis spektar nistatina

U spektrima konjugata gumiarabike i pululana sa amfotericinom B (slike 4.6. i 4.7.), uočavaju se maksimumi apsorpcije karakteristični za ovaj antibiotik, na 365 nm, 387 nm i 412 nm (slika 4.9.). Slično kao kod nistatina, pik na najmanjoj talasnoj dužini ima najmanju apsorbancu, dok je srednji pik najvećeg intenziteta (Larabi et al., 2004). U

sintezama konjugata se uobičajeno koristi preparat Fungizone (slika 4.9.) koji pored amfotericina B sadrži i 50% (w/w) natrijum-deoksiholata, čija je funkcija povećavanje rastvorljivosti antibiotika (Falk et al., 1999). Pik na 340 nm potiče od agregata amfotericina B koji su stabilizovani interakcijama sa natrijum-deoksiholatom (Stoodley et al., 2007, Barwicz et al., 1993). Ovaj pik se ne uočava u spektrima konjugata, s obzirom na to da je natrijum-deoksiholat (kao niskomolekularno jedinjenje) dijalizom uklonjen iz reakcione smeše.



Slika 4.9. UV-Vis spektar preparata Fungizone (zeleno) i amfotericina B (crveno)

Mogućnost apsorpcije koja bi poticala od viška nevezanih molekula antibiotika je isključena, s obzirom na to da su oni u potpunosti uklonjeni dijalizom. Konjugati pokazuju iste apsorpcione pikove kao molekuli poliena, što je i očekivano uzimajući u obzir činjenicu da su oni jedine hromofore u sintetizovanim proizvodima. Takođe, budući da su UV-Vis spektri poliena veoma osetljivi na konformacione promene koje su indukovane različitim molekulskim interakcijama, u koje spada i agregacija (Nishi et al., 2007), zadržavanje karakterističnog izgleda spektara kuplovanih proizvoda ukazuje na to da se nistatin i amfotericin B u konjugatima nalaze u svojoj nativnoj konfiguraciji, što je neophodan preduslov za aktivnost ovih antibiotika.

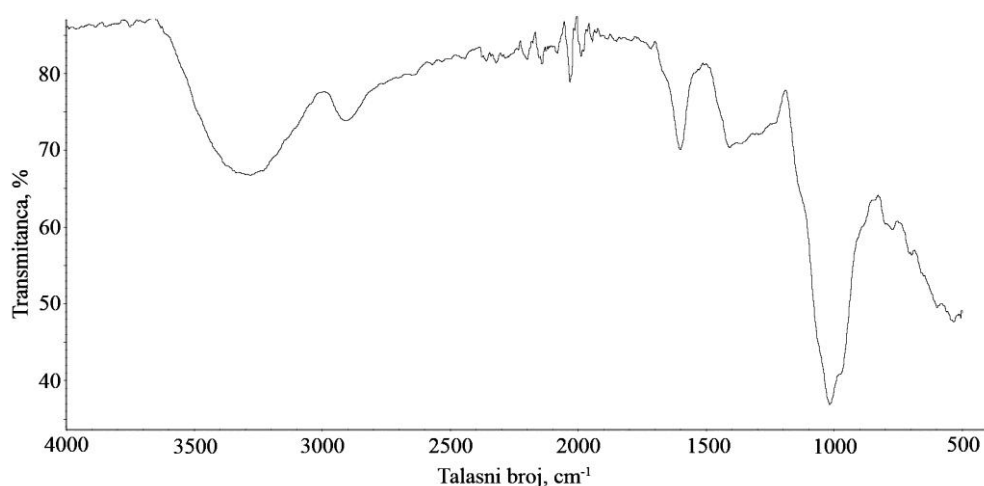


## 4.5. FT-IR spektroskopska karakterizacija konjugata gumiarabike i pululana sa nistatinom i amfotericinom B

Sintetisani konjugati su dodatno okarakterisani FT-IR spektroskopijom.

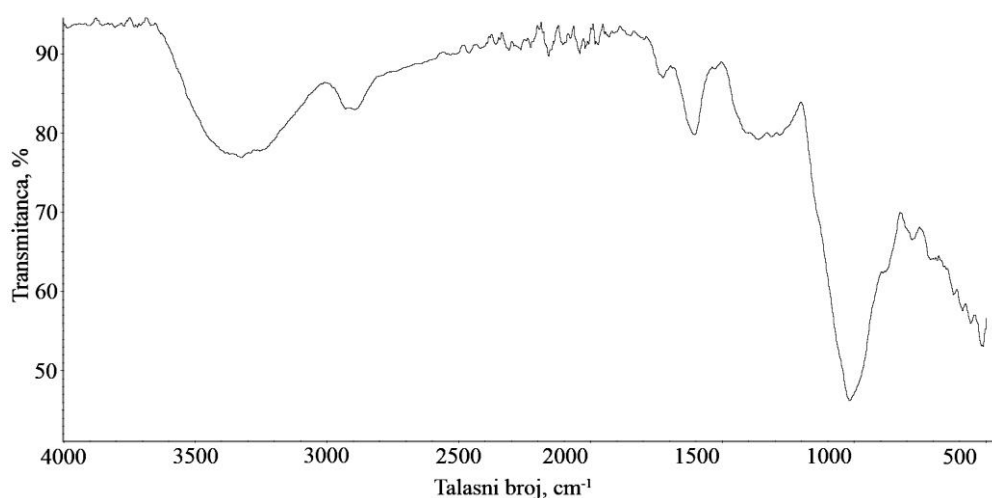
### 4.5.1. FT-IR spektroskopska karakterizacija konjugata gumiarabike sa antibioticima

U FT-IR spektru gumiarabike (slika 4.10.) uočava se široka traka karakteristična za vibracije istezanja hidroksilnih grupa na  $3000 - 3500 \text{ cm}^{-1}$ , traka na  $2910 \text{ cm}^{-1}$  usled istezanja  $\text{CH}_2$  grupe, kao i frekvencije na  $1630 - 1600 \text{ cm}^{-1}$  i široka traka na  $1400 \text{ cm}^{-1}$  koje su karakteristične za asimetrične i simetrične vibracije istezanja karboksilatnog anjona, redom. U regionu „otiska prsta” ugljenih hidrata u oblasti  $1200 - 900 \text{ cm}^{-1}$ , uočavaju se pikovi na  $1020 \text{ cm}^{-1}$  koji potiču od C-O istezanja, kao i apsorpcija na  $850 \text{ cm}^{-1}$  karakteristična za  $\beta$ -glikozidne veze (Mathlouthi i Koenig, 1987).



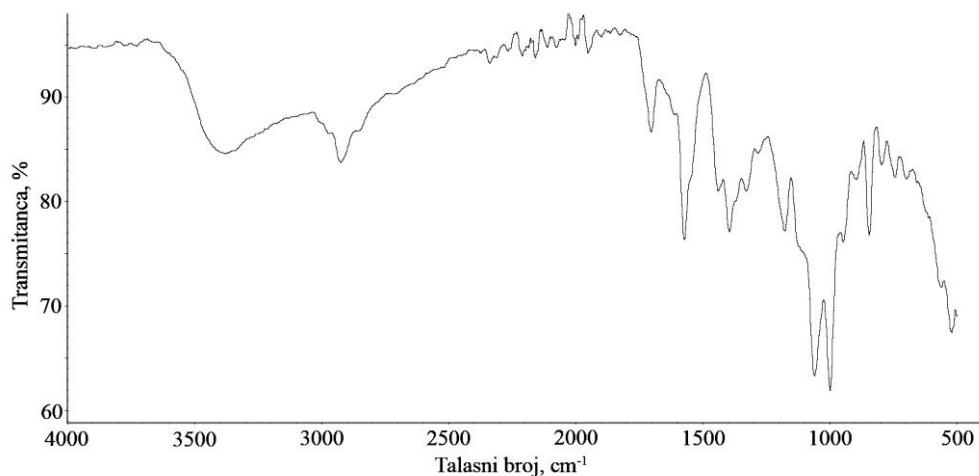
Slika 4.10. FT-IR spektar gumiarabike

U FT-IR spektru 50% oksidovane gumiarabike (slika 4.11.) uočavaju se apsorpcione trake karakteristične za dialdehidne polisaharidne strukture na  $1730\text{ cm}^{-1}$  i  $880\text{ cm}^{-1}$ . Apsorpcija na  $1730\text{ cm}^{-1}$  potiče od simetričnih valencionih vibracija karbonilne grupe, a traka slabog intenziteta na  $880\text{ cm}^{-1}$  od hemiacetalnih struktura (Kim et al., 2000). U spektru 20% oksidovane gumiarabike ne uočava se pik karakterističan za aldehidnu grupu, što je i očekivano s obzirom na manji stepen oksidacije i građenje hemiacetala (Maia et al., 2005).



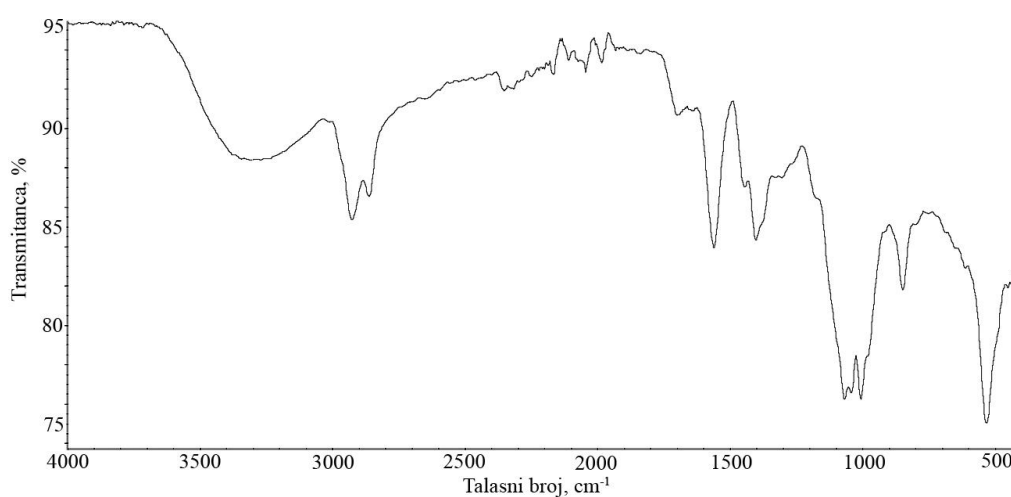
Slika 4.11. FT-IR spektar 50% oksidovane gumiarabike

Karakteristične FT-IR apsorpcione trake u spektru nistatina (slika 4.12.) su: široka intenzivna apsorpciona traka sa maksimumom na  $3370\text{ cm}^{-1}$  usled vibracija istežanja O-H i N-H grupa, traka na  $2930\text{ cm}^{-1}$  koja odgovara simetričnim i asimetričnim -CH vibracijama  $\text{CH}_2$  grupa, apsorpcija na  $1703\text{ cm}^{-1}$  koja potiče od karbonilne funkcije u estarskoj grupi, kao i trake na  $1437\text{ cm}^{-1}$ ,  $1396\text{ cm}^{-1}$  and  $1010\text{ cm}^{-1}$  koje potiču od - $\text{CH}_3$ , - $\text{COO}^-$  i polienskih sekvenci, redom (Umezawa, 1978). Apsorpcije u oblasti  $1500 - 1700\text{ cm}^{-1}$  posledica su prisustva dvostrukih veza u molekulu, dok konjugovani tetraenski segment daje pik na  $1575\text{ cm}^{-1}$  (Lewis et al., 1988).



Slika 4.12. FT-IR spektar nistatina

FT-IR spektar amfotericina B (slika 4.13.) karakterišu trake na  $2850\text{ cm}^{-1}$  i  $2915\text{ cm}^{-1}$  koje odgovaraju simetričnim i asimetričnim vibracijama C-H veza iz  $\text{CH}_2$  grupa, pik na  $1716\text{ cm}^{-1}$  koji potiče od karbonilnih funkcija u estarskim grupama antibiotika, kao i apsorpciona traka na  $1012\text{ cm}^{-1}$  koja je karakteristična za polienski niz. U spektralnom regionu  $1400 - 1800\text{ cm}^{-1}$  uočavaju se trake koje nastaju usled vibracija istežanja karbonilne grupe, asimetričnih i simetričnih vibracija istežanja karboksilne ( $1692\text{ cm}^{-1}$  i  $1401\text{ cm}^{-1}$ , redom) i vibracija istežanja amino grupe (Gagoš i Arczewska, 2010).

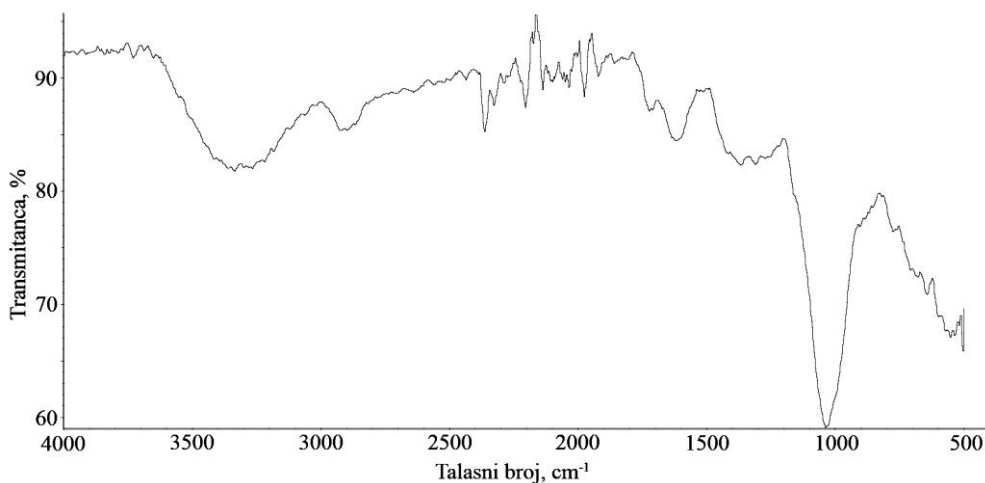


Slika 4.13. FT-IR spektar amfotericina B

FT-IR spektri konjugata pokazuju kombinovane apsorpcione trake karakteristične za polisaharide i polienske antibiotike.

FT-IR spektri konjugata gumiarabike sa antibioticima pokazuju apsorpcione trake koji su tipični za obe klase molekula (slika 4.14.). Takođe, uočava se da je karakteristična oštra apsorpciona traka dialdehidnih grupa polisaharida neznatno smanjena u odnosu na spektar oksidovanog polisaharida, što ukazuje na kuplovanje sa molekulima nistatina, kao i na to da izvestan broj ovih grupa nije stupio u reakciju usled sternih i konformacionih smetnji.

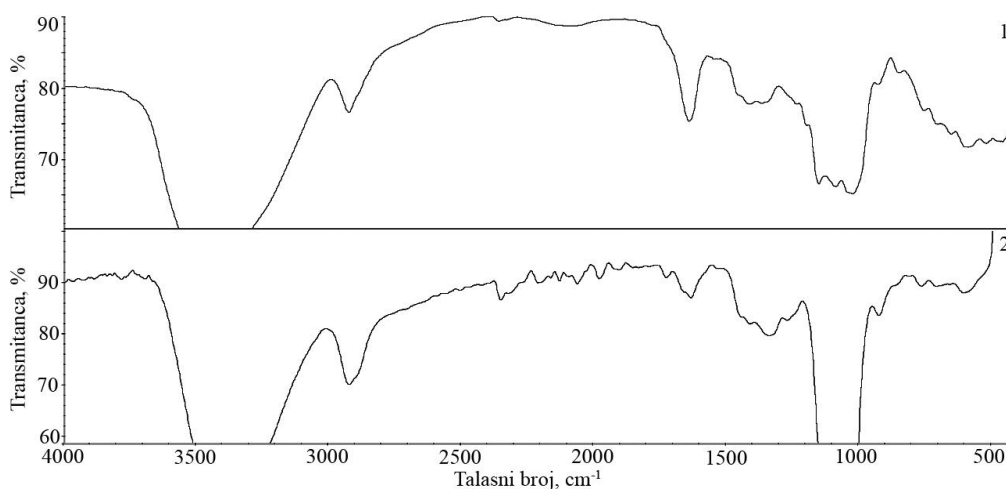
Pik na  $1719\text{ cm}^{-1}$  je karakterističan za C=O aldehydne karbonilne grupe, široka traka sa maksimumom na  $3266\text{ cm}^{-1}$  se odnosi na vibracije istezanja OH grupa, frekvencija na  $1700\text{ cm}^{-1}$  potiče od C=O karbonilne estarske grupe antibiotika, dok je apsorpciona traka na  $1556\text{ cm}^{-1}$  karakteristična za C=C dvostruke veze koje su prisutne u polienskom nizu. Pik na oko  $1730\text{ cm}^{-1}$ , koji se neznatno smanjuje nakon konjugacije sa antibiotikom, je karakterističan za aldehydne grupe parcijalno oksidovane gumiarabike. Traku koja potiče od apsorpcije imino veze u regionu  $1580 - 1690\text{ cm}^{-1}$  je bilo teško detektovati zbog preklapanja sa karakterističnim apsorpcijama drugih grupa u istom spektralnom opsegu.



Slika 4.14. FT-IR spektar konjugata 50% oksidovane gumiarabike i nistatina

#### 4.5.2. FT-IR spektroskopska karakterizacija konjugata pululana sa antibioticima

FT-IR spektar pululana (slika 4.15.) sadrži jake vibracije istezanja vodonično vezanih hidroksilnih grupa u regionu  $3000 - 3500 \text{ cm}^{-1}$  i vibracije C-H istezanja na  $2922 - 2932 \text{ cm}^{-1}$ . Apsorpcija na  $1647 \text{ cm}^{-1}$  odgovara deformacionim vibracijama adsorbovanih molekula vode. Pikovi u oblasti  $1200 - 900 \text{ cm}^{-1}$  koji predstavljaju „otisak prsta” glikanskih polimera karakteristični su za apsorpcije C-O veza: apsorpcioni pik na  $1020 \text{ cm}^{-1}$  potiče od vibracije istezanja C-O, traka na  $1150 \text{ cm}^{-1}$  od C-O-C istezanja, dok je jak pik između  $1000$  i  $1100 \text{ cm}^{-1}$  karakterističan za C-O istezanje unutar -C-O-C-glikozidnih veza. (Mathlouthi i Koenig, 1987; Kačuráková i Wilson, 2001). Slaba apsorpcija na  $850 \text{ cm}^{-1}$  i  $920 \text{ cm}^{-1}$  je pripisana  $\alpha$ -glikozidnim vezama. Intenzivna traka na  $1080 \text{ cm}^{-1}$  se odnosi na vibracije piranoznih prstenova, kao i na deformacije van ravni C-OH grupa. Intenzitet trake na  $996 \text{ cm}^{-1}$  indicira stepen asocijacije između lanaca (Shingel, 2002).

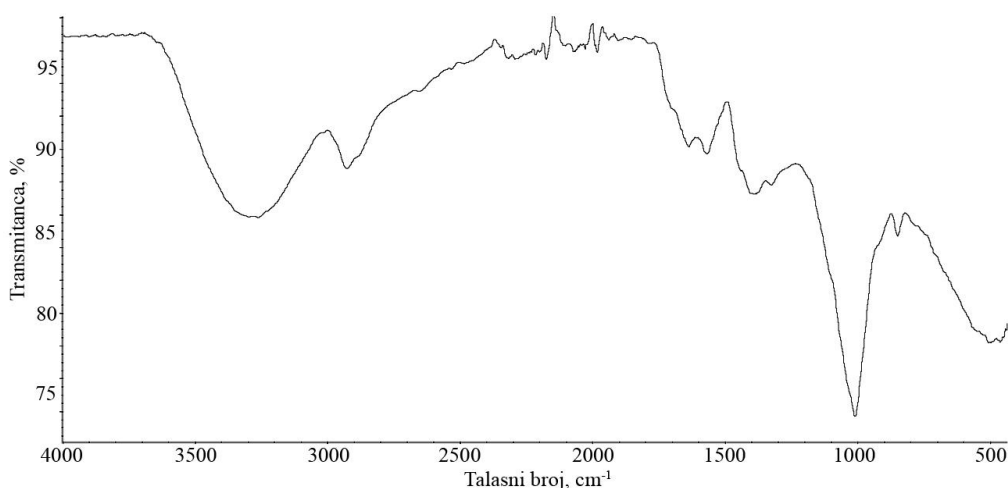


Slika 4.15. FT-IR spektar pululana (1) i parcijalno oksidovanog pululana (2)

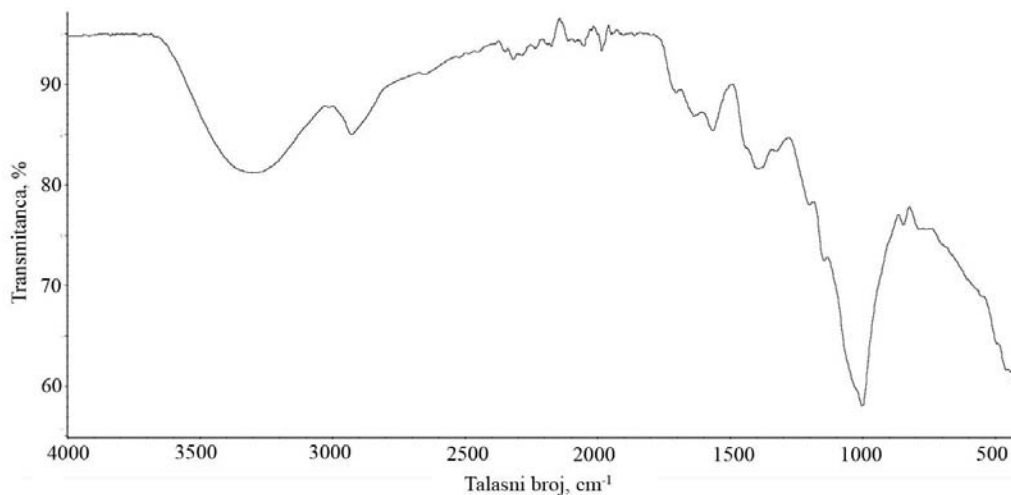
Promene u hemijskoj strukturi pululana, kao rezultat parcijalne perjodatne oksidacije ovog glikana potvrđene su pojavom novih traka u spektru, na  $880 \text{ cm}^{-1}$  i  $1740 \text{ cm}^{-1}$ , kao

i kod drugih perjodatno oksidovanih  $\alpha$ - i  $\beta$ -glukana (slika 4.15.). Slaba difuzna traka na  $880\text{ cm}^{-1}$  koja odgovara vibracijama formiranih hemiacetalnih struktura između aldehidnih i njima susednih hidroksilnih grupa preklopljena je sa trakom na  $850\text{ cm}^{-1}$  koja je karakteristična za  $\alpha$ -glikozidne veze. Oštar pik na  $1740\text{ cm}^{-1}$  odgovara aldehidnim simetričnim vibracijama. Ova traka se ne uočava kod 10% oksidovanog pululana, verovatno zbog malog stepena oksidacije (Kim et al., 2000; Maia et al., 2005).

U FT-IR spektrima sintetisanih konjugata pululana sa amfotericinom B (slika 4.16.), kao i sa nistatinom (slika 4.17.) karakteristične apsorpcione trake koje odgovaraju karbonilnim grupama dialdehidnih derivata pululana su smanjene, što ukazuje na to da je deo aldehidnih grupa u molekulima oksidovanih uzoraka ovog glukana reagovao sa molekulima antibiotika, dajući Schiff-ove baze. Ovaj podatak se slaže sa rezultatima UV-Vis spektroskopije i odgovara činjenici da nistatin i amfotericin B, kao relativno veliki molekuli, usled sternih smetnji ne mogu da reaguju sa svim aldehidnim grupama u oksidovanim polimerima. Dodatno, kvantitativna reakcija pululana i antibiotika nije moguća usled konformacionih promena parcijalno oksidovanog polisaharidnog lanca koje su indukovane različitim molekulskim interakcijama (Kim et al., 2000). U FT-IR spektru konjugata uočava se prisustvo apsorpcionih traka karakterističnih za polienski antibiotik i pululan, međutim, apsorpciju imino veze na  $1580 - 1690\text{ cm}^{-1}$  je teško uočiti usled preklapanja sa drugim apsorpcionim trakama u istom regionu.



Slika 4.16. FT-IR spektar konjugata 50% oksidovanog pululana sa amfotericinom B

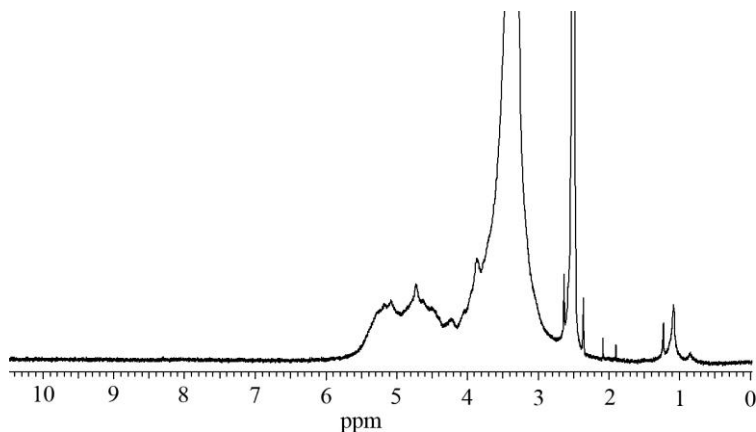


Slika 4.17. FT-IR spektar konjugata 50% oksidovanog pululana sa nistatinom

#### 4.6. $^1\text{H}$ NMR spektroskopska karakterizacija konjugata gumiarabike i pululana sa nistatinom i amfotericinom B

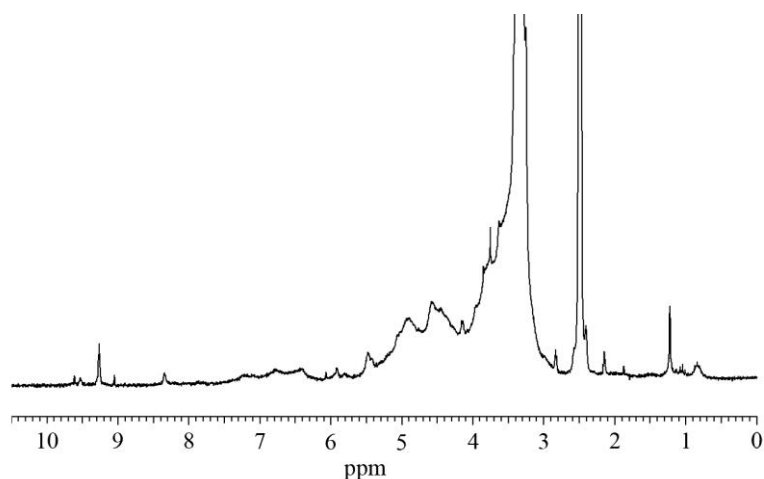
Sintetisani konjugati polisaharida i polienskih antibiotika analizirani su  $^1\text{H}$  NMR spektroskopijom.

U  $^1\text{H}$  NMR spektru gumiarabike (slika 4.18.) uočavaju se karakteristična hemijska pomeranja u oblasti 5,00 – 5,43 ppm koja potiču od protona monosaharidnih ostataka  $\alpha$ -D-GlcpA,  $\alpha$ -D-Galp, terminalne  $\alpha$ -L-Araf i 3- $\alpha$ -L-Araf. Signali u oblasti 4,69 – 4,81 ppm pripisani su protonima iz  $\beta$ -D-Galp i  $\alpha$ -L-Rhap, a signali na 4,28 – 4,48 ppm potiču od ostataka  $\beta$ -D-GlcpA (Sims i Furneaux, 2003; Cui et al., 2007; Tan et al., 2004).

Slika 4.18.  $^1\text{H}$  NMR spektar gumiarabike u  $\text{DMSO-d}_6$ 

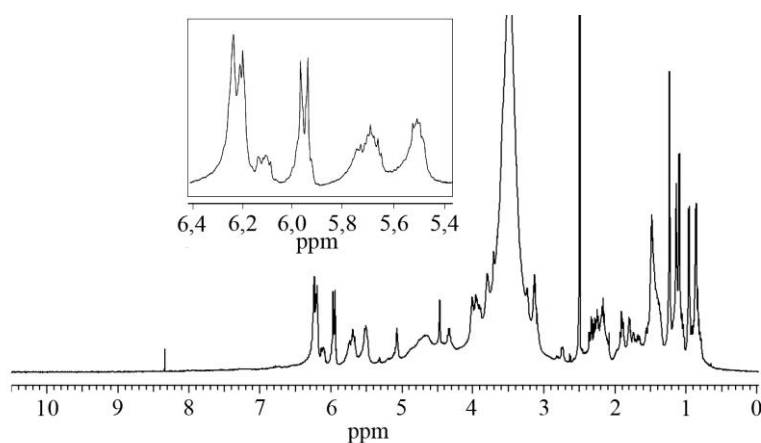
S obzirom na kompleksnost heteropolisaharidne strukture gumiarabike, u  $^1\text{H}$  NMR spektru oksidovanog uzorka ovog polisaharida nisu jasno vidljivi karakteristični signali koji se odnose na oksidovane dialdehidne strukture, što se posebno odnosi na signal aldehidne grupe na 9,30 ppm. Da bi se dokazalo prisustvo ovih grupa urađena je parcijalna kisela hidroliza u kontrolisanim uslovima (Defaye et al., 1986), a zatim perjodatna oksidacija dobijenih fragmenata prema postupku opisanom za dobijanje 50% oksidovane gumiarabike (poglavlje 3.2.1.). Na  $^1\text{H}$  NMR spektru tako dobijenog derivata (slika 4.19.) zapaža se pojava novih pikova čiji se položaji nalaze na hemijskim pomeranjima većim od 5,30 ppm. Ova hemijska pomeranja su pripisana protonima hemiacetala koji se formiraju tokom reakcije oksidacije (Yu i Bishop, 1967; Maia et al., 2005; Ishak i Painter, 1978). Takođe, uočen je i signal na 9,30 ppm koji ukazuje na prisustvo slobodnih aldehidnih grupa generisanih u toku oksidacije.





Slika 4.19.  $^1\text{H}$  NMR spektar 50% oksidovanog parcijalnog hidrolizata gumiarabike u  $\text{DMSO-d}_6$

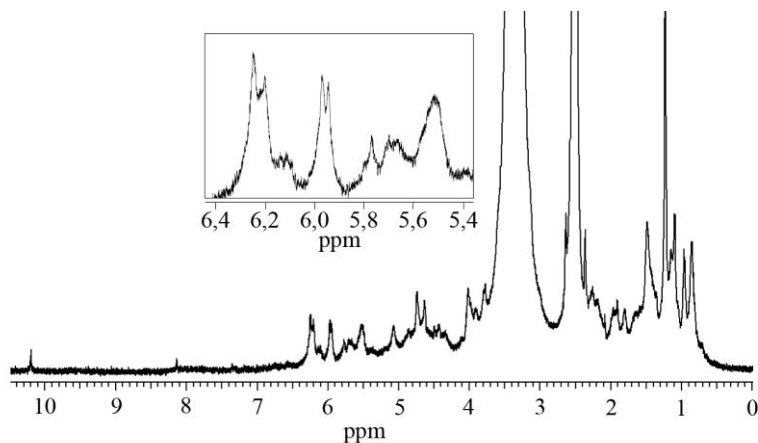
$^1\text{H}$  NMR spektar nistatina (slika 4.20.) sadrži dominantne pikove koji potiču od polienskog dela molekula (5,43 – 6,39 ppm), poliolskog segmenta (3,10 – 4,25), šestočlanog hemiketalnog prstena (1,16 – 4,51), metilenskih (1,40 – 2,40) i metil-grupa (0,95 – 1,17) (Lancelin i Beau, 1989; Sletta et al., 2005).



Slika 4.20.  $^1\text{H}$  NMR spektar nistatina u  $\text{DMSO-d}_6$

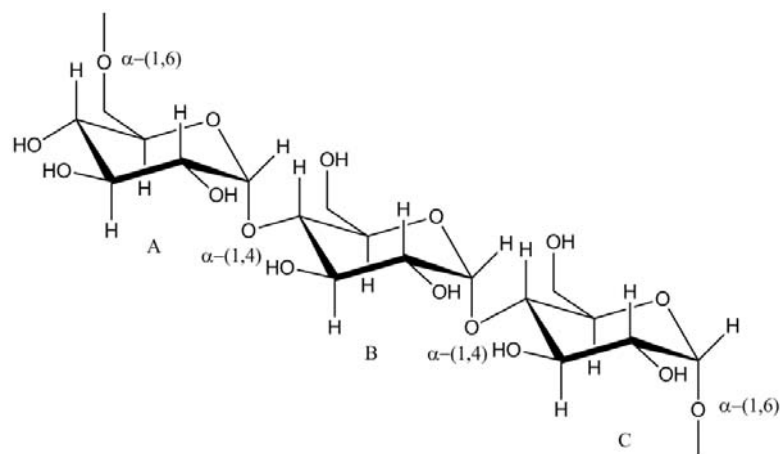
U  $^1\text{H}$  NMR spektru konjugata gumiarabike i nistatina (slika 4.21.) uočavaju se karakteristična hemijska pomeranja koja se odnose na protone nistatina i oksidovane

gumiarabike. Pored regiona preklapljenih signala, značajan je deo spektra koji potiče od polienskog segmenta antibiotika (5,43 – 6,39 ppm), kao i karakteristični signali ugljenohidratnih ostataka oksidovanog polisaharida (4,28 – 5,43 ppm).

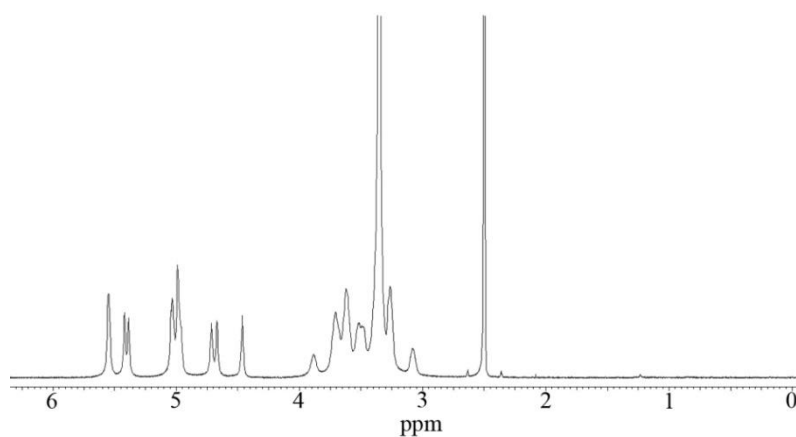


Slika 4.21.  $^1\text{H}$  NMR spektar konjugata 50% oksidovane gumiarabike i nistatina u  $\text{DMSO-d}_6$

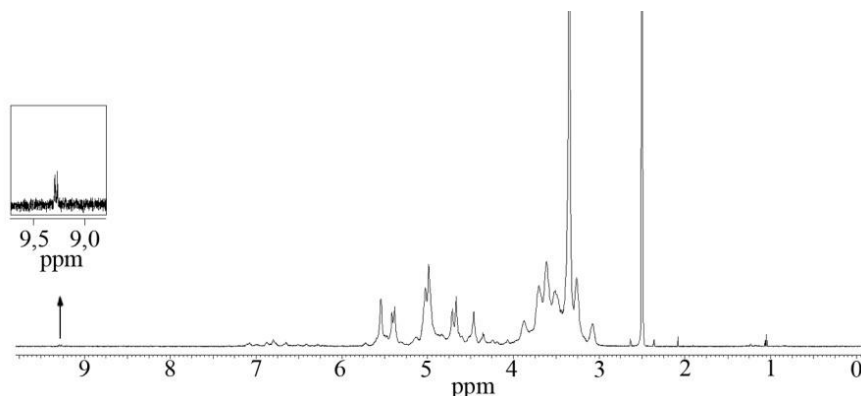
$^1\text{H}$  NMR spektar pululana u  $\text{DMSO-d}_6$  (slika 4.23.) sadrži H-1 signale na 5,00 ppm koji potiču od 4-supstituisanih  $\alpha$ -(1,6)-glukočnih ostataka prstena C (slika 4.22.), signale na 5,40 ppm koji potiču od anomernih protona iz  $\alpha$ -(1,4)-glukočnih ostataka koji su 4- i 6-supstituisani (prstenovi A i B maltotrioznih fragmenata) i signale u oblasti 3,52 – 3,91 ppm koji potiču od H2 – H6 protonskih signala (Jakovljević, 2001; Delben et al., 2006; Fiege et al., 2012). Slabi signali na 5,42 ppm, 5,36 ppm i 4,92 ppm potiču od  $\alpha$  i  $\beta$  anomernih protona terminalnog ostatka glukoze (Singh et al., 2009).



Slika 4.22. Struktura maltotrioznog fragmenta pululana

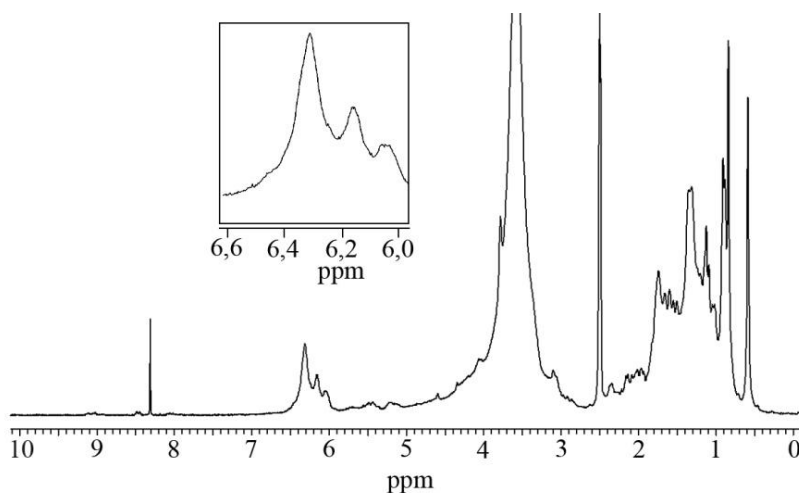
Slika 4.23.  $^1\text{H}$  NMR spektar pululana u  $\text{DMSO-d}_6$ 

Perjodatnom oksidacijom pululana dolazi do pojave novih pikova u  $^1\text{H}$  NMR spektru dobijenog derivata u oblasti 4,00 – 10,00 ppm (slika 4.24.) koji se mogu pripisati protonima iz različitih hemiacetalnih struktura (Maia et al., 2005). Takođe, uočavaju se i signali malog intenziteta na 9,25 ppm koji potiču od C-6 aldehidnih protona (Kato et al., 2003).



Slika 4.24.  $^1\text{H}$  NMR spektar parcijalno oksidovanog pululana u  $\text{DMSO-d}_6$

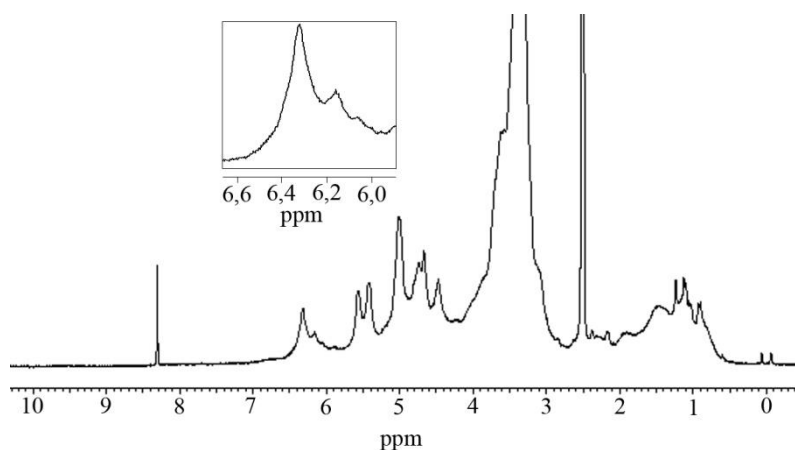
U  $^1\text{H}$  NMR spektru amfotericina B (slika 4.25.) uočavaju se hemijska pomeranja protona iz polienskog segmenta (5,40 – 6,50 ppm). Signali u oblasti 3,35 – 3,90 ppm potiču od poliolskog dela molekula, a pikovi na 5,23 ppm, 5,04 ppm, 2,85 ppm, 2,50 ppm i 1,75 od hemiketalnog prstena. Hemijska pomeranja protona mikozamina nalaze se u oblasti 3,93 – 4,95 ppm, kao i na 1,62 ppm i 5,38 ppm (Sowiński et al., 1992).



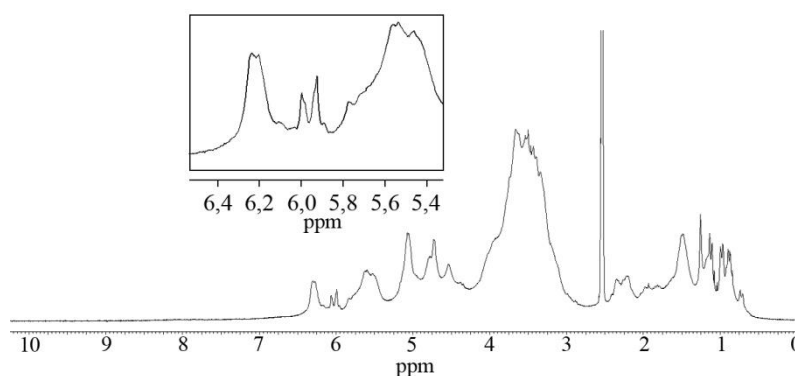
Slika 4.25.  $^1\text{H}$  NMR spektar amfotericina B u  $\text{DMSO-d}_6$

$^1\text{H}$  NMR spektri konjugata pululana i amfotericina B (slika 4.26.), kao i pululana i nistatina (slika 4.27.), sadrže hemijska pomeranja karakteristična za protone

polisaharida i antibiotika. U ovim spektrima jasno se uočavaju segmenti koji potiču od polienskog dela antibiotika (5,40 – 6,50 ppm, a posebno hemijska pomeranja u oblasti 6,00 – 6,50 ppm kod konjugata sa nistatinom), što ukazuje na to da su u molekulu konjugata polisaharidi i antibiotici kovalentno vezani.



Slika 4.26.  $^1\text{H}$  NMR spektar konjugata 50% oksidovanog pululana i amfotericina B u  $\text{DMSO-d}_6$



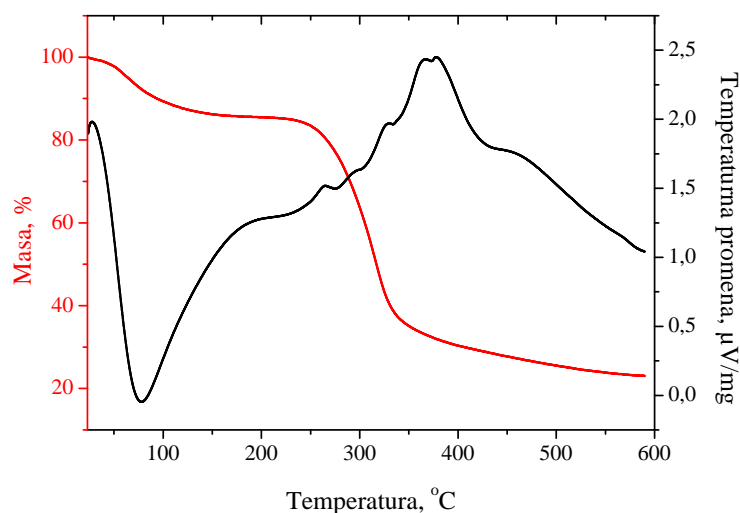
Slika 4.27.  $^1\text{H}$  NMR spektar konjugata 50% oksidovanog pululana i nistatina u  $\text{DMSO-d}_6$

## 4.7. Ispitivanje termalne stabilnosti konjugata gumiarabike i pululana sa nistatinom i amfotericinom B

Termalna stabilnost sintetisanih konjugata polisaharida gumiarabike i pululana sa polienskim antibioticima nistatinom i amfotericinom B, kao i stabilnost čistih antibiotika i polisaharida, određena je termogravimetrijski, izlaganjem uzoraka promeni temperature od sobne do 600 °C, u inertoj atmosferi azota.

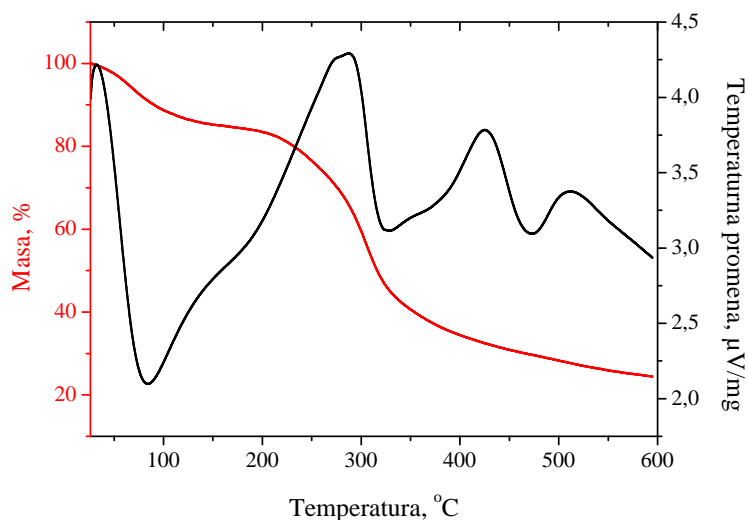
### 4.7.1. Ispitivanje termalne stabilnosti konjugata gumiarabike sa nistatinom

Termalna degradacija gumiarabike se dešava u dve faze (Zohuriaan i Shokrolahi, 2004). U prvoj fazi (zagrevanjem uzorka do 178 °C), u kojoj dolazi do gubitka adsorbovanih i vezanih vodoničnih vezama molekula vode, gubitak mase je bio 14%. Nagli gubitak mase počinje na 250 °C i završava se na oko 350 °C, kada dolazi do ukupnog gubitka mase od 65%. Zagrevanjem do 600 °C gubi se oko 74% polazne mase uzorka gumiarabike (slika 4.28.).



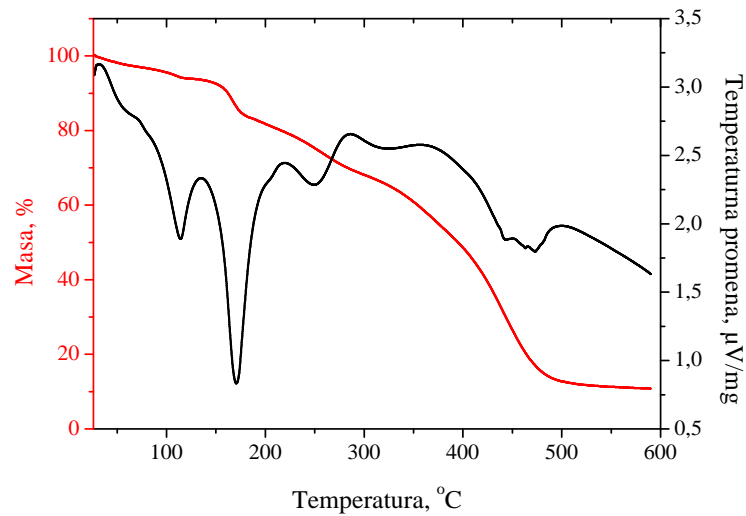
Slika 4.28. TGA i DTA krive termičke analize gumiarabike

Uzorak oksidovane gumiarabike počeo je da se raspada na nešto nižim temperaturama (slika 4.29.). Tokom prve faze (do 165 °C) gubitak mase je bio oko 15%, usled eliminacije molekula vode. U drugoj fazi (do 485 °C) došlo je do gubitka 56% mase usled razgradnje monomernih jedinica oksidovanog polimera. Može se uočiti da je oksidovani uzorak nešto nestabilniji u odnosu na čistu gumiarabiku, što je primećeno i u slučaju linearnih polisaharida (Maia et al., 2011). Ova pojava se može pripisati otvaranju prstenova monosaharidnih jedinica polisaharida tokom perjodatne oksidacije, što dovodi do veće fleksibilnosti polimera kod koga je omogućena slobodna rotacija  $\beta$ -glikozidnih veza.



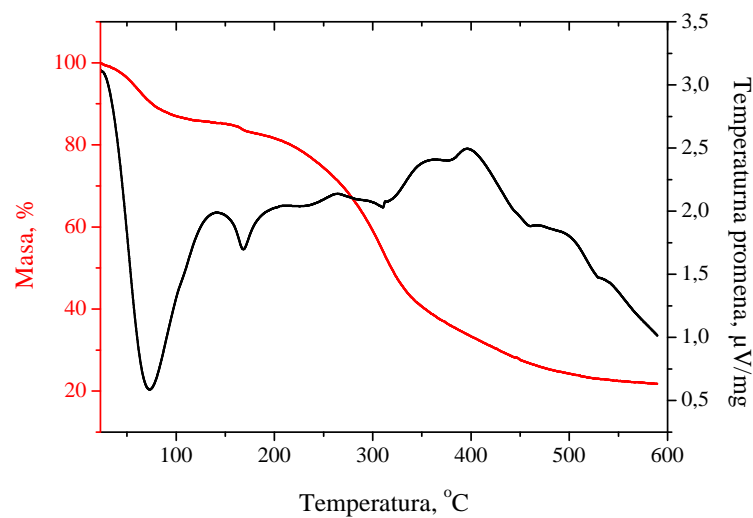
Slika 4.29. TGA i DTA krive termičke analize parcijalno oksidovane gumiarabike

Nistatin neznatno gubi masu (7%) zagrevanjem do temperature od 150 °C, od koje daljim zagrevanjem gubitak mase postaje značajno brži. U opsegu 150 °C do 350 °C ukupan gubitak mase bio je oko 40%, a do daljeg gubitka od 42% došlo je zagrevanjem do 470 °C. Ukupan gubitak mase na 600 °C bio je 89% (slika 4.30.), što se slaže sa literaturnim podacima za druge polienske antibiotike (Koontz i Marcy, 2003).



Slika 4.30. TGA i DTA krive termičke analize nistatina

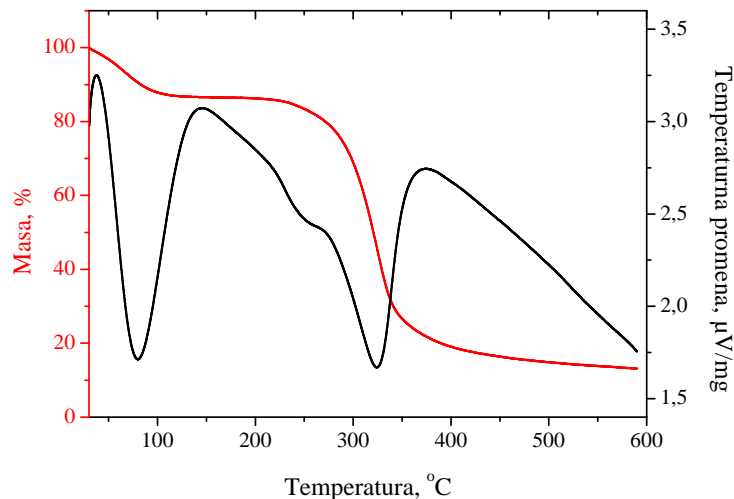
Konjugati polisaharida sa antibioticima pokazuju veću termalnu stabilnost i sporije se razgrađuju u odnosu na oksidovani polisaharid (slika 4.31.). Na osnovu ovih podataka se može zaključiti da se formiranjem imino i amino veza sa molekulima nistatina povećava stabilnost, što se može pripisati konformacionim promenama u nizovima parcijalno oksidovane gumiarabike koje se dešavaju kao posledica formiranja Schiff-ovih baza.

Slika 4.31. TGA i DTA krive termičke analize konjugata  
50% oksidovane gumiarabike i nistatina



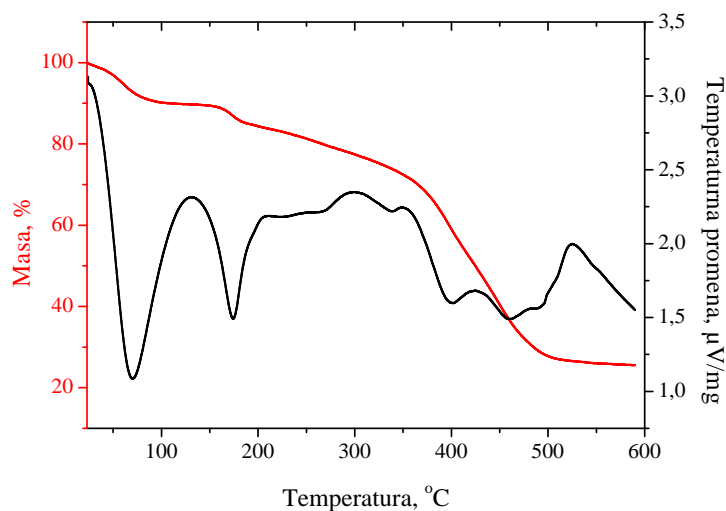
#### 4.7.2. Ispitivanje termalne stabilnosti konjugata pululana sa amfotericinom B

Pululan i oksidovani uzorci pululana pokazuju veoma slične sigmoidne krive sa četiri različite faze (slika 4.32.). Zagrevanjem od sobne temperature do 50 °C gubitak mase je bio zanemarljiv, oko 3%. U sledećoj fazi (do 120 °C) gubitak mase bio je 10% za pululan i 13% za oksidovani pululan, usled gubitka rezidualne vode. U temperaturnom opsegu između 120 °C i 260 °C za pululan, odnosno između 120 °C i 240 °C za parcijalno oksidovani pululan, nije bilo značajnih promena u masi. Nakon toga je usledio brz gubitak mase na temperaturama do 340 °C, kada je nastupila termalna i oksidativna degradacija polisaharida, raspadanje monomernih jedinica i eliminacija isparljivih proizvoda (Vieira et al., 2008). U poslednjoj fazi (do 600 °C) došlo je do malog gubitka mase usled formiranja gasovitih molekula ugljen-monoksida, ugljen-dioksida i vode (Wang et al., 2013). Ukupni gubitak mase po završetku temperaturnog režima bio je 77% za pululan, odnosno 87% za oksidovani pululan.



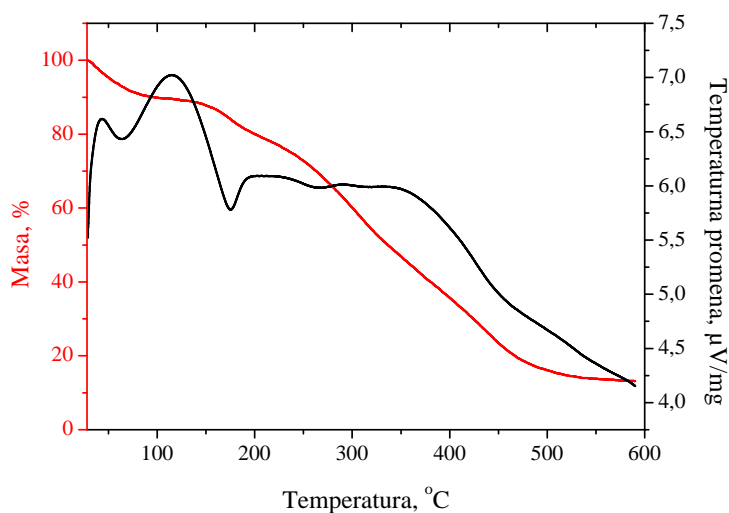
Slika 4.32. TGA i DTA krive termičke analize 30% oksidovanog pululana

Amfotericin B zagrevanjem do 220 °C gubi masu u dva koraka, 10% i 6%. Dalji gubitak mase od 32% dešava se zagrevanjem do temperature od oko 370 °C, kada počinje nagli gubitak mase, koji je maksimalan na oko 500 °C i iznosi oko 85% (slika 4.33.).



Slika 4.33. TGA i DTA krive termičke analize amfotericina B

Konjugati do 220 °C gube masu u dva koraka (slika 4.34.), 10% i 12%. Dalje se nastavlja nagli gubitak mase od oko 60%, i to u dva preklapljenja stupnja, sa gubicima mase po koracima od oko 40% i 20%. Toplotni efekti koji prate gubitak mase konjugata pululana sa amfotericinom B i čistog antibiotika su različiti, ali je zapaženo ponavljanje endotermnog efekta sa minimumom na oko 175 °C.

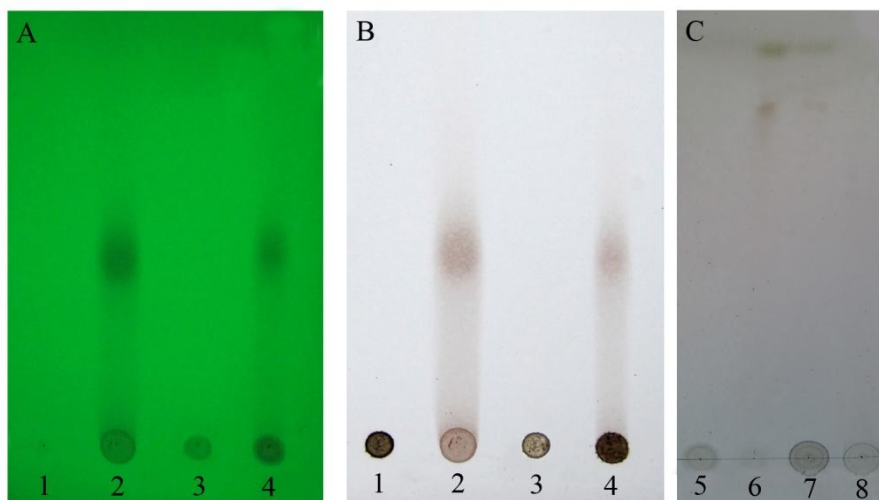
Slika 4.34. TGA i DTA krive termičke analize konjugata  
30% oksidovanog pululana sa amfotericinom B

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se termogravimetrijske krive nativnih i parcijalno oksidovanih polisaharida značajno razlikuju u odnosu na konjugate, posebno u centralnom regionu primenjenog temperaturnog opsega, od 150 °C do 450 °C, gde se krive značajno razlikuju u obliku. U slučaju konjugata ne primećuje se nagli gubitak mase, što ukazuje na to da je reakcijom kuplovanja amino grupa antibiotika i aldehidnih grupa oksidovanih polisaharida povećana stabilnost dobijenih proizvoda.

#### **4.8. Tankoslojna hromatografija konjugata gumiarabike i pululana sa nistatinom i amfotericinom B**

Da bi se potvrdilo kovalentno vezivanje između gumiarabike i nistatina, urađena je tankoslojna hromatografija na pločama od silikagela sa i bez UV indikatora, u sistemu razvijача hloroform:metanol:amonijak, 4:10:1 (v/v/v). Na dobijenim hromatogramima vizuelizovanim pod UV svetlom (slika 4.35. A) uočavaju se po jedna mrlja na startnoj liniji koja potiče od konjugata, bez tragova nevezanog antibiotika u zoni hromatografije. Hromatografijom smeše polisaharida i antibiotika došlo je do razdvajanja pojedinačnih komponentata, što se na hromatogramima uočava kao pojava dve mrlje – na startu i u zoni hromatografije sa istim  $R_f$  vrednostima kao za čiste antibiotike. Čisti polisaharidi se ne mogu videti na ovaj način, s obzirom na to da u svojoj strukturi ne sadrže hromofore koje apsorbuju u UV oblasti.

Prskanjem ploča 50% sumpornom kiselinom i zagrevanjem na 100 °C, na hromatogramima (slika 4.35. B i C) se na startnim linijama vide mrlje koje potiču od polisaharida. Na osnovu dobijenih rezultata je potvrđeno da hromatografijom konjugata ne dolazi do razdvajanja na pojedinačne komponente, što predstavlja dokaz kovalentnog vezivanja između polisaharida i antibiotika.



Slika 4.35. Hromatografija na tankom sloju silikagela: gumiarabika (1), Nys (2), konjugat gumiarabika – Nys (3), smeša gumiarabike i Nys, 2:1 (w/w) (4), pululan (5), AmB (6), smeša pululana i AmB, 2:1 (w/w) (7), konjugat pululan – AmB (8) na Silicagel 60 F<sub>254</sub> ploči sa ultraljubičastim indikatorom (A) i Silicagel 60 ploči (B, C)

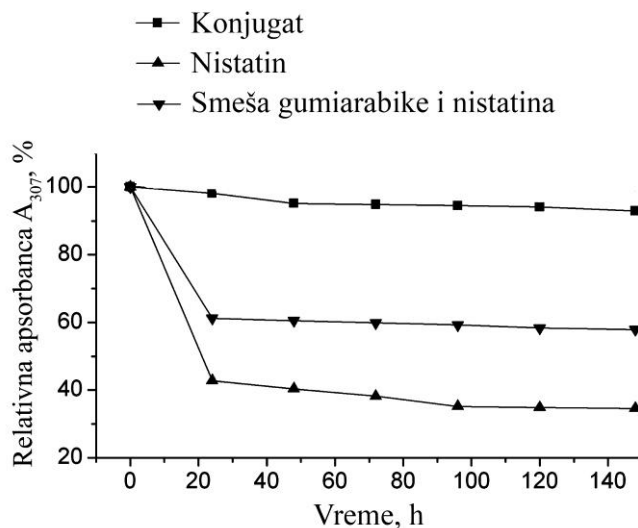
#### 4.9. Stabilnost konjugata gumiarabike i nistatina

Ispitana je stabilnost konjugata gumiarabike i nistatina u suvom (liofilizovanom) obliku i u rastvoru, u funkciji vremena i na različitim pH vrednostima. Svi rezultati su prikazani kao srednja vrednost najmanje dva ponovljena eksperimenta pod istim uslovima.

Tokom perioda od 6 meseci, liofilizovani uzorci konjugata su čuvani pod odgovarajućim uslovima (u staklenim epruvetama sa navojem, zaštićenim od svetla, na sobnoj temperaturi). Posle 7, 30, 90 i 180 dana merena je apsorbanca rastvora na 307 nm i poređena je sa  $A_{307}$  rastvora na početku eksperimenta. Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da u analiziranom periodu ne dolazi do degradacije konjugata u liofilizovanoj formi.

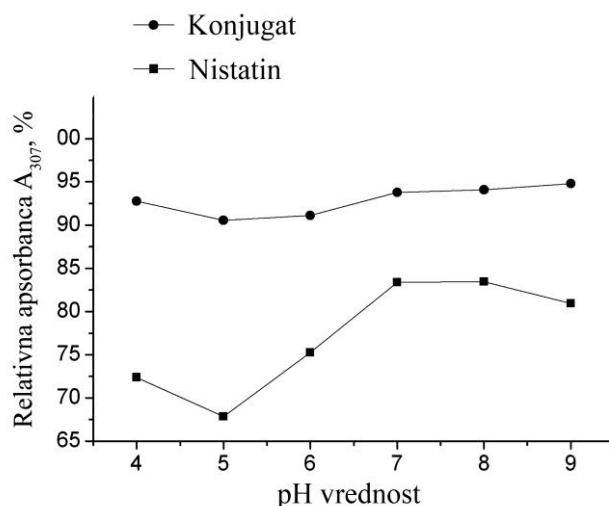
Nakon 7 dana ispitivanja stabilnosti rastvora konjugata u 0,1 M fosfatnom puferu, pH 7,4 (koncentracije 1,0 mg mL<sup>-1</sup>, na 25 °C, zaštićeni od svetlosti) zaključeno je da je

derivat gumiarabike stabilniji od čistog nistatina (slika 4.36.). Apsorbanca rastvora konjugata na 307 nm se manje i sporije smanjivala u funkciji vremena u poređenju sa nistatinom, kod koga je nagli pad apsorbance ukazivao na promene u strukturi molekula čija posledica može biti gubitak aktivnosti. Tokom ovog perioda, apsorbanca rastvora konjugata gumiarabike na 307 nm se smanjila za 10%, dok je apsorbanca nistatina opala za 65% od početne vrednosti na početku inkubacije. Smanjenje apsorbance smeše gumiarabike i nistatina (1:1, w/w) je bilo manje u odnosu na čist nistatin, što ukazuje na činjenicu da prisustvo polisaharida stabilizuje rastvor antibiotika, ali ne u dužem vremenskom periodu. Najveću stabilnost su pokazali konjugati gumiarabike i nistatina (slika 4.36.).



Slika 4.36. Stabilnost rastvora konjugata gumiarabike i nistatina, čistog antibiotika i smeše polisaharida i antibiotika u 0,1 M fosfatnom puferu, pH 7,4, u zavisnosti od vremena

Ispitivanje stabilnosti rastvora konjugata u puferima različitih pH vrednosti (pH 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0) pokazalo je da su konjugati znatno stabilniji od nistatina u kiselim sredinama, gde je struktura čistog antibiotika značajno narušena (slika 4.37.). U baznim uslovima konjugati su takođe stabilniji – smanjenje apsorbance konjugata na 307 nm je bilo 9% nakon 24-časovne inkubacije, a nistatina 32%.

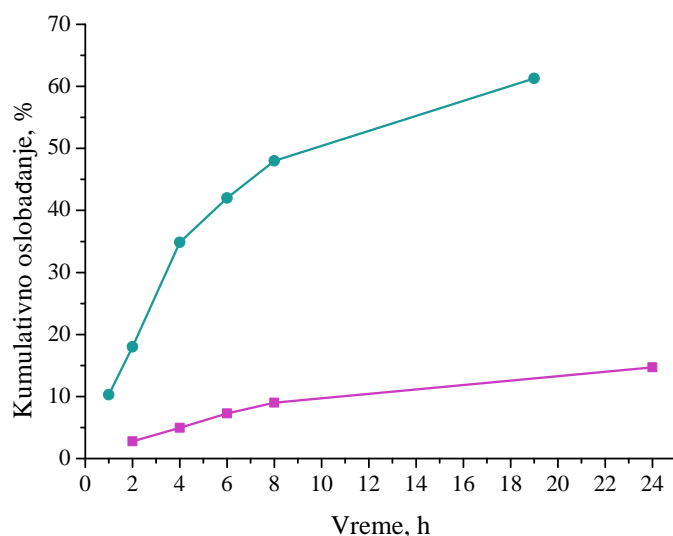


Slika 4.37. Poređenje stabilnosti rastvora konjugata i čistog antibiotika u puferima različitih pH vrednosti

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da reakcija kuplovanja nistatina za polisaharidne lance gumiarabike ima pozitivan efekat na povećanje stabilnosti vodenih rastvora ovog antibiotika u ispitivanim konjugatima.

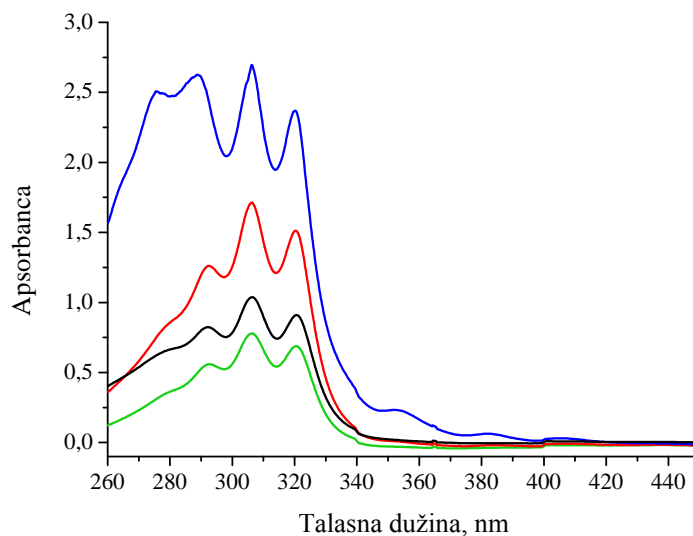
#### 4.10. Kontrolisano oslobađanje antibiotika iz konjugata pululana i nistatina

Kontrolisano oslobađanje antibiotika nistatina iz konjugata sa pululanom praćeno je na dve pH vrednosti: pH 7,4 (fiziološka pH vrednost) i pH 1,5 (pH vrednost želudačnog soka), UV-Vis spektroskopijom u oblasti 260 – 450 nm. Profili oslobađanja antibiotika prikazani su na slici 4.38.



Slika 4.38. Profili oslobađanja antibiotika iz konjugata pululana i nistatina na pH vrednostima 7,4 (ljubičasto) i 1,5 (zeleno)

Ovim eksperimentom je pokazano da brzina i stepen oslobađanja nistatina iz konjugata sa pululanom rastu sa smanjenjem pH vrednosti. Takođe, ustanovljeno je da je oslobađanje aktivne supstance katalizovano kiselinom, ali da se struktura antibiotika ne menja ni u uslovima niskih pH vrednosti u ispitivanom vremenskom periodu, što je potvrđeno UV-Vis spektroskopijom. Na slici 4.39. prikazani su spektri rastvora oslobođenog nistatina u kiseljoj sredini naspram koje je rađena dijaliza, u različitim vremenskim intervalima trajanja eksperimenta. Utvrđeno je da se apsorpcioni pikovi nalaze na istim talasnim dužinama kao kod polaznog rastvora konjugata, a zadržan je i karakterističan oblik UV-Vis apsorpcionog spektra nistatina, što predstavlja jasnu indicaciju da je struktura antibiotika očuvana u ovakvim eksperimentalnim uslovima. Pored toga, proverena je i antifungalna aktivnost oslobođenog nistatina i utvrđeno je da se nalazi u granicama očekivanih vrednosti.



Slika 4.39. UV-Vis spektri oslobođenog nistatina posle 1h (zeleno), 2h (crno), 4h (crveno) i 19h (plavo) kontrolisanog oslobađanja iz konjugata u kiseloj sredini (pH 1,5)

#### 4.11. Antifungalna aktivnost konjugata gumiarabike i pululana sa nistatinom i amfotericinom B

Antifungalna aktivnost sintetisanih polisaharidnih derivata ispitana je na test – mikroorganizmu *Candida albicans* ATCC 24433. Rezultati antibiogram testa prikazani su u tabeli 4.3.



Tabela 4.3. Antifungalna aktivnost sintetisanih konjugata

Uzorak	Minimalna inhibitorna koncentracija, $\mu\text{g mL}^{-1}$
18% Gumiarabika - amfotericin B	2,5
18% Gumiarabika - nistatin	5
50% Gumiarabika - amfotericin B	0,625
50% Gumiarabika - nistatin	1,25
10% Pululan - amfotericin B	2,5
10% Pululan - nistatin	>10
20% Pululan - amfotericin B	1,25
20% Pululan - nistatin	>10
50% Pululan - amfotericin B	0,625
50% Pululan - nistatin	1,25
Amfotericin B (Pfaller et al., 1995)	0,5
Nistatin (Tamokou et al., 2012)	1,0

Uopšteno, svi konjugati su pokazali nižu aktivnost (veće vrednosti MIK) u odnosu na čiste antibiotike, a konjugati sa nistatinom manju aktivnost od konjugata sa amfotericinom B. Ovaj rezultat se može objasniti činjenicom da je u sintetisanim derivatima značajno smanjen sadržaj antibiotika, jer brojne aldehidne grupe nisu reagovala sa amino grupama antibiotika zbog steričnih smetnji i formiranja kompleksa između polialdehidnih polimera u rastvoru.

Konjugati koji sadrže polisaharide većeg procenta oksidacije pokazuju veću antifungalnu aktivnost, što je i očekivano s obzirom na to da u svojoj strukturi imaju veći broj aldehidnih grupa dostupnih za reakcije sa amino grupama, samim tim i veći sadržaj antibiotika. UV apsorbanca konjugata na 307 nm za nistatin, odnosno 387 nm za amfotericin B je u pozitivnoj korelaciji sa vrednostima MIK, što može da se iskoristi kao parametar za procenu aktivnosti derivata.

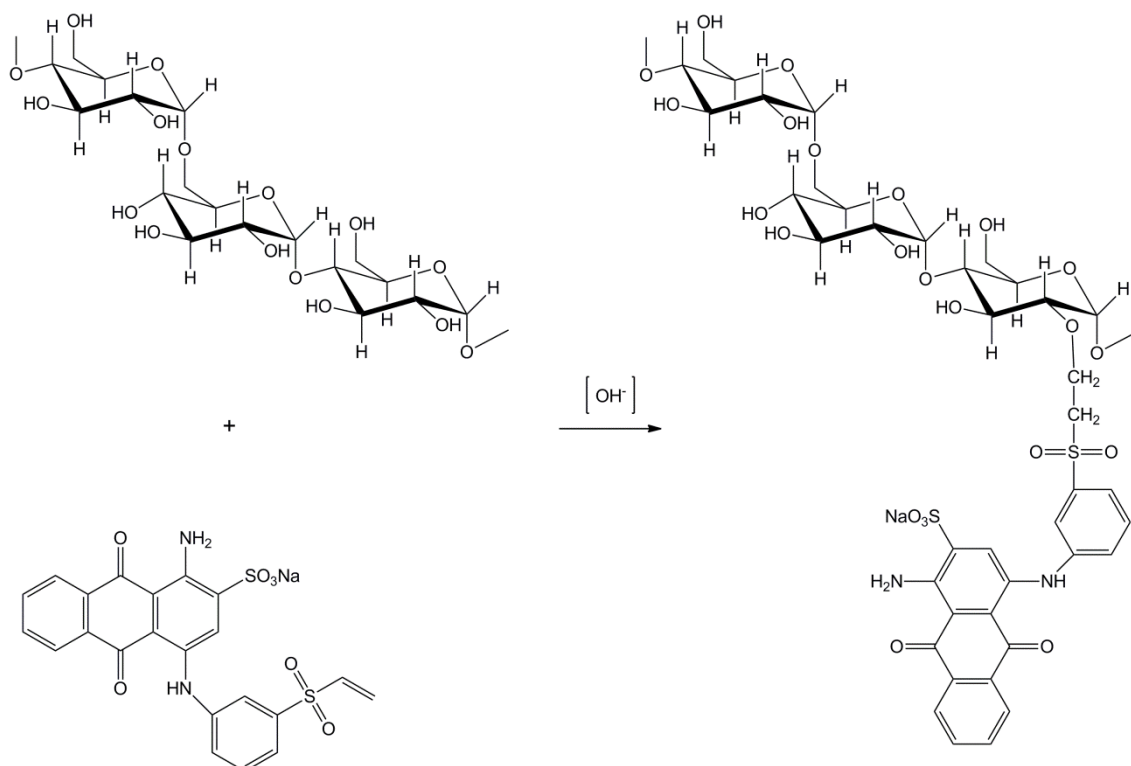
## **4.12. Sinteza konjugata pululana i levana sa antrahinonskom bojom Remazol Brilliant Blue R**

U ovom delu rada sintetisani su hromogeni derivati pululana i levana kuplovanjem ovih polisaharida sa antrahinonskom bojom Remazol Brilliant Blue R. Dobijeni proizvodi su okarakterisani instrumentalnim metodama strukturne analize (UV-Vis, FT-IR,  $^1\text{H}$  NMR spektroskopijom), termogravimetrijskom i diferencijalnom termičkom analizom (TG-DTA) i tankoslojnom hromatografijom. Ispitana je i stabilnost dobijenih derivata pululana u rastvorima različitih pH vrednosti i pod uslovima sterilizacije autoklaviranjem (121 °C, 30 minuta), što su parametri koji su neophodni za potencijalnu primenu ovih hromogenih polimera kao supstrata za selekciju mikroorganizama sa pululanaznom odnosno fruktanaznom aktivnošću.

Konvencionalnim metodama, u baznim uslovima, reaktivne boje formiraju funkcionalne vinil-sulfonske ( $-\text{SO}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$ ) grupe, koje se dalje mogu kuplovati sa hidroksilnim grupama polisaharida (slika 4.40.). Ovaj metod se uobičajeno koristi za bojenje u tekstilnoj industriji (Lewis, 2009; Zaharia i Suteu, 2012).

Istovremeno sa reakcijom adicije odigrava se povratna reakcija hidrolize vinil-sulfonskih grupa u prisustvu molekula vode. Ova nepoželjna reakcija se može sprečiti dodavanjem soli u višku.

Kovalentan karakter hemijske veze koja se ostvaruje između molekula polisaharida i boje potvrđen je standardnim strukturnim instrumentalnim metodama, elementalnom organskom mikroanalizom i tankoslojnom hromatografijom.



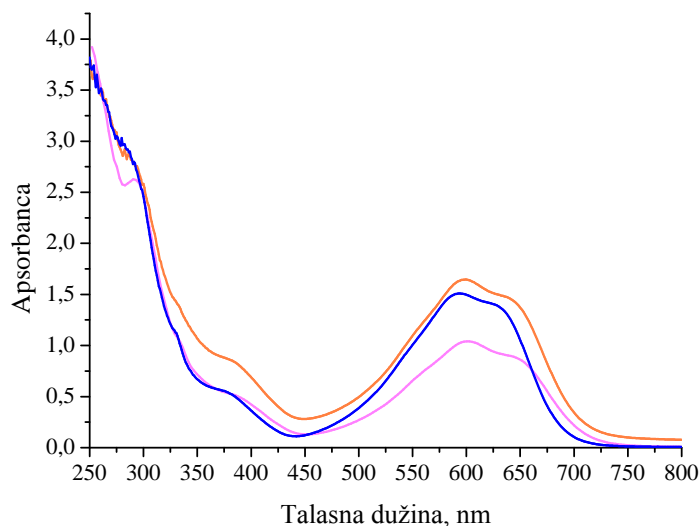
Slika 4.40. Sinteza obojenog derivata pululana kovalentnim vezivanjem sa antrahinonskom bojom Remazol Brilliant Blue R

#### 4.13. UV-Vis spektroskopska karakterizacija konjugata pululana i levana sa bojom Remazol Brilliant Blue R

Sintetisani hromogeni derivati pululana i levana okarakterisani su UV-Vis spektroskopijom. Dobijeni rezultati su poređeni sa spektrima čistih polisaharida i RBBR. Na osnovu spektralnih podataka određen je procenat kuplovanja boje u hromogenim konjugatima. Budući da je višak boje uklonjen iz reakcione smeše intenzivnom dijalizom, pretpostavlja se da apsorpcija konjugata u UV-Vis spektralnoj oblasti potiče isključivo od kovalentno vezanih molekula boje u sintetisanom derivatu, s obzirom na to da pululan i levan ne apsorbuju u ovoj oblasti spektra.

UV-Vis spektri vodenih rastvora sintetisanih konjugata ne razlikuju se od spektra rastvora same boje u demineralizovanoj vodi. RBBR u spektralnoj oblasti od 250 nm do

800 nm pokazuje karakterističnu apsorpcionu krivu sa maksimumom na 595 nm. Spektri konjugata imaju identičan oblik sa apsorpcionim maksimumom na istoj talasnoj dužini (slika 4.41.).



Slika 4.41. UV-Vis spektri: RBBR (narandžasto), konjugat pululan – RBBR (plavo) i konjugat levan – RBBR (ljubičasto)

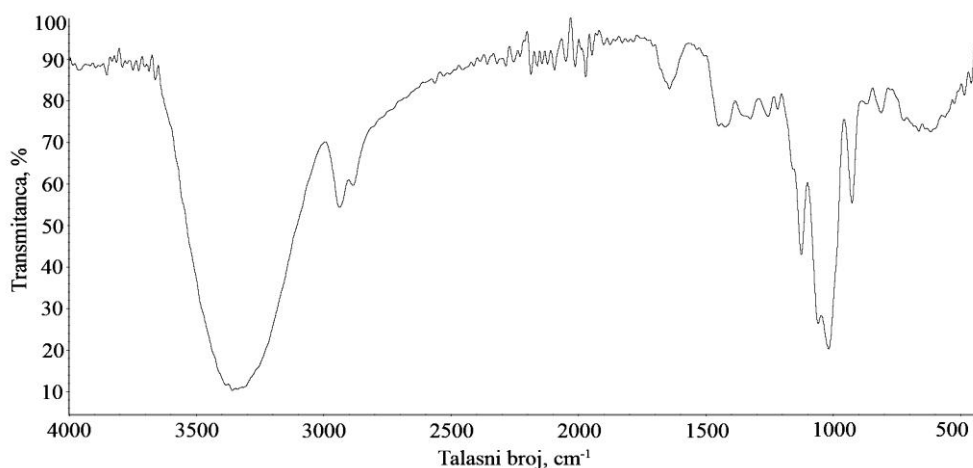
Na osnovu UV-Vis spektroskopskih podataka određen je sadržaj vezane boje u funkcionalizovanim polisaharidnim nizovima. Poređenjem apsorbanci na 595 nm ( $A_{max}$ ) rastvora čiste boje i konjugata određenih koncentracija utvrđeno je da konjugat pululana sadrži 5,21% boje, a konjugat levana 3,68%.

#### **4.14. FT-IR spektroskopska karakterizacija konjugata pululana i levana sa bojom Remazol Brilliant Blue R**

Dalja karakterizacija dobijenih konjugata urađena je pomoću FT-IR spektroskopije.

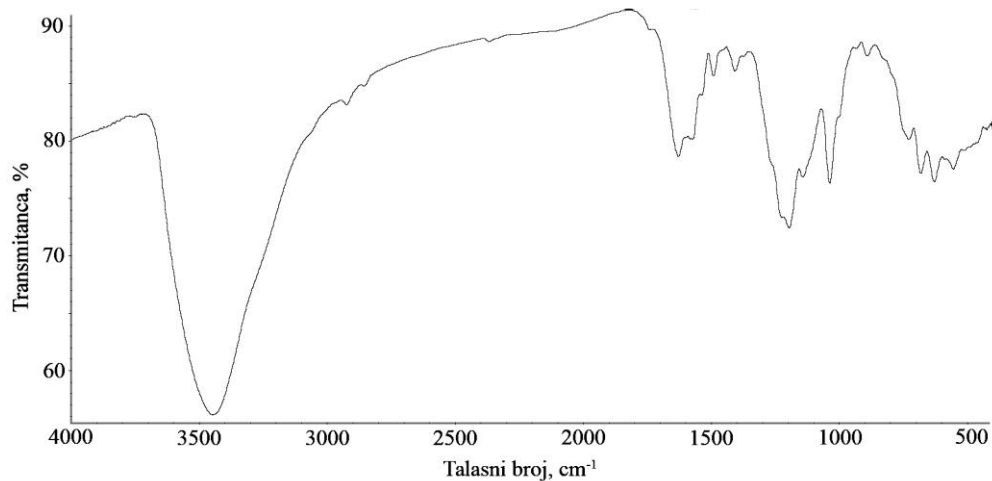
FT-IR spektar pululana je prikazan i diskutovan u poglavlju 4.5.2.

U FT-IR spektru levana (slika 4.42.) uočavaju se spektroskopske karakteristike neutralnih polisaharida. Intenzivna široka traka na  $3000 - 3500 \text{ cm}^{-1}$  i apsorpcija na  $2938 \text{ cm}^{-1}$  su pripisane vibracijama istezanja hidroksilnih i C-H grupa polisaharida, redom. Pik na  $1647 \text{ cm}^{-1}$  potiče od vezanih molekula vode. Trake u regionu  $1200 - 1500 \text{ cm}^{-1}$  potiču od deformacionih C-H vibracija, a apsorpcija u oblasti između  $1127 \text{ cm}^{-1}$  i  $1020 \text{ cm}^{-1}$  odgovara vibracijama istezanja C-O-H i C-O-C veza. Apsorpcione trake u anomernom regionu ( $950 - 700 \text{ cm}^{-1}$ ) na  $927 \text{ cm}^{-1}$  i  $813 \text{ cm}^{-1}$  su specifične za  $\beta$ -konfiguraciju glikozidnih veza (Liu et al., 2010; Jathore et al., 2012; Barone i Medynets, 2007).



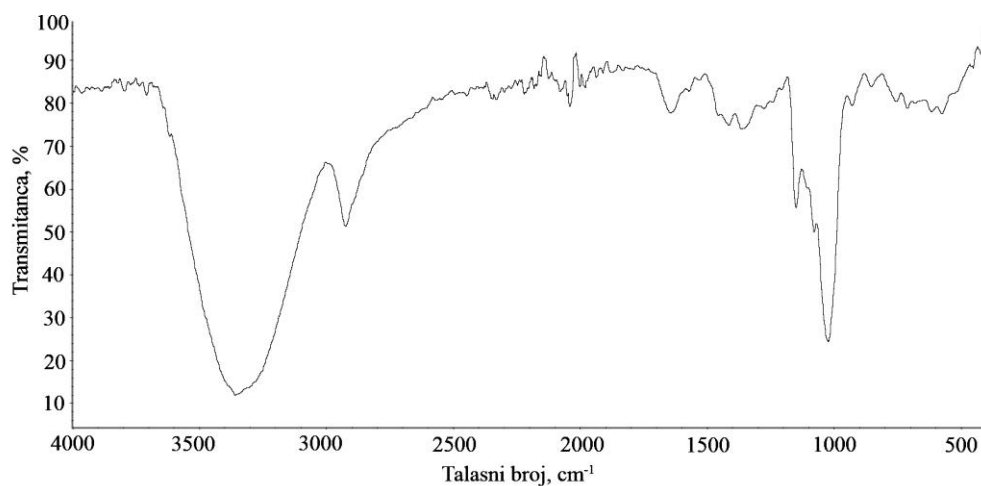
Slika 4.42. FT-IR spektar levana

U FT-IR spektru boje RBBR (slika 4.43.) mogu se uočiti karakteristične apsorpcione trake u regionu  $3600 - 3000 \text{ cm}^{-1}$  koje potiču od vibracija istezanja C-H veza u aromatičnim strukturama, N-H i  $\text{CH}_2$  grupama. Pikovi u oblasti  $2960 - 2850 \text{ cm}^{-1}$  potiču od simetričnih i asimetričnih vibracija istezanja C-H veza u  $\text{CH}_2$  grupama. Trake na talasnom broju  $1650 - 1560 \text{ cm}^{-1}$  potiču od savijanja N-H veza  $\text{NH}_2$  grupa i C=C veza aromata. Pikovi u oblasti  $1250 - 1140 \text{ cm}^{-1}$  i  $1070 - 1030 \text{ cm}^{-1}$  potiču od istezanja S=O veza  $\text{SO}_3$  grupa, a u oblasti  $1000 - 650 \text{ cm}^{-1}$  od =C-H funkcija aromata (Seferoğlu et al., 2008).

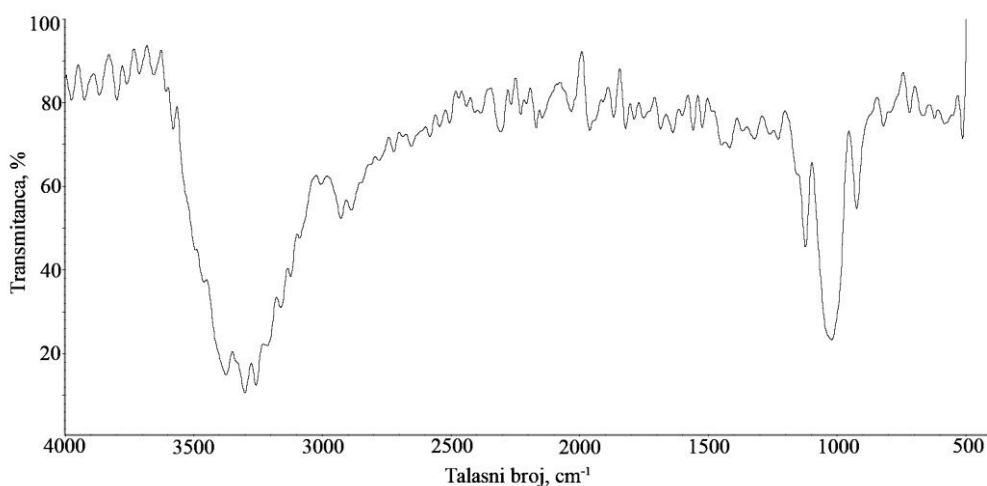


Slika 4.43. FT-IR spektar RBBR

FT-IR spektri derivata pululana i levana (slike 4.44. i 4.45.) sadrže trake apsorpcije koje su karakteristične za polisaharide, ali i one koje potiču od RBBR: pikove u oblasti 670 – 870  $\text{cm}^{-1}$  koji ukazuju na prisustvo aromatičnih struktura u konjugatima, traku na 1650  $\text{cm}^{-1}$  koja je tipična za antrahinonske prstenove i trake na 1037  $\text{cm}^{-1}$  i 1120  $\text{cm}^{-1}$  koje potiču od C-NH<sub>2</sub> vibracija.



Slika 4.44. FT-IR spektar konjugata pululana i RBBR



Slika 4.45. FT-IR spektar konjugata levana i RBBR

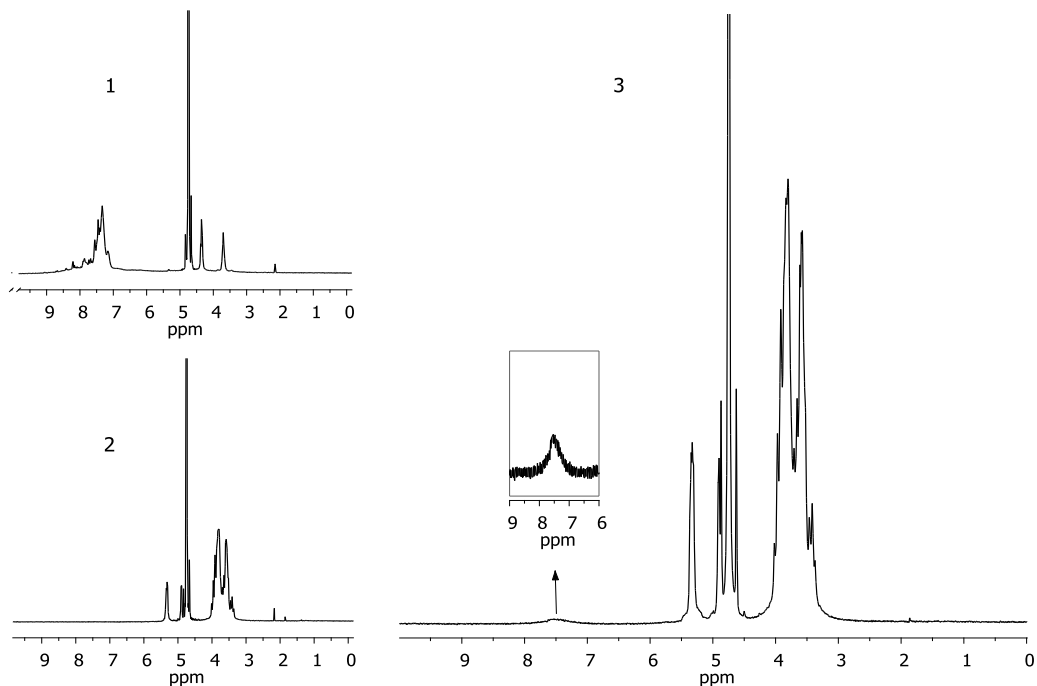
#### 4.15. $^1\text{H}$ NMR spektroskopija konjugata pululana i levana sa bojom Remazol Brilliant Blue R

$^1\text{H}$  NMR spektri obojenih derivata pululana i levana poređeni su sa spektrima čistih polisaharida i RBBR.

U  $^1\text{H}$  NMR spektru RBBR (slika 4.46.) uočavaju se karakteristični pikovi u oblasti 8,30 – 7,70 ppm koji potiču od: aromatičnih protona, četiri protona (H5 – H8) nesupstituisanog aromatičnog prstena antrahinona i jednog (H3) iz supstituisanog prstena. Protoni iz dve metilenske grupe koje se nalaze između  $\text{SO}_2$  i  $\text{OSO}_3$  grupa u bočnom lancu apsorbuju na 3,60 i 4,09 ppm, redom (Sanislav et al., 2013).

$^1\text{H}$  NMR spektar pululana (slika 4.46.) opisan je u poglavlju 4.6.

$^1\text{H}$  NMR spektar sintetisanog derivata (slika 4.46.) sadrži hemijska pomeranja karakteristična za protone pululana i RBBR. U spektru se uočava i slab pik na 7,5 ppm koji potiče od aromatičnog antrahinonskog regiona. Drugi pikovi karakteristični za RBBR su preklapljeni sa signalima protona pululana koji se nalaze na sličnim hemijskim pomeranjima.

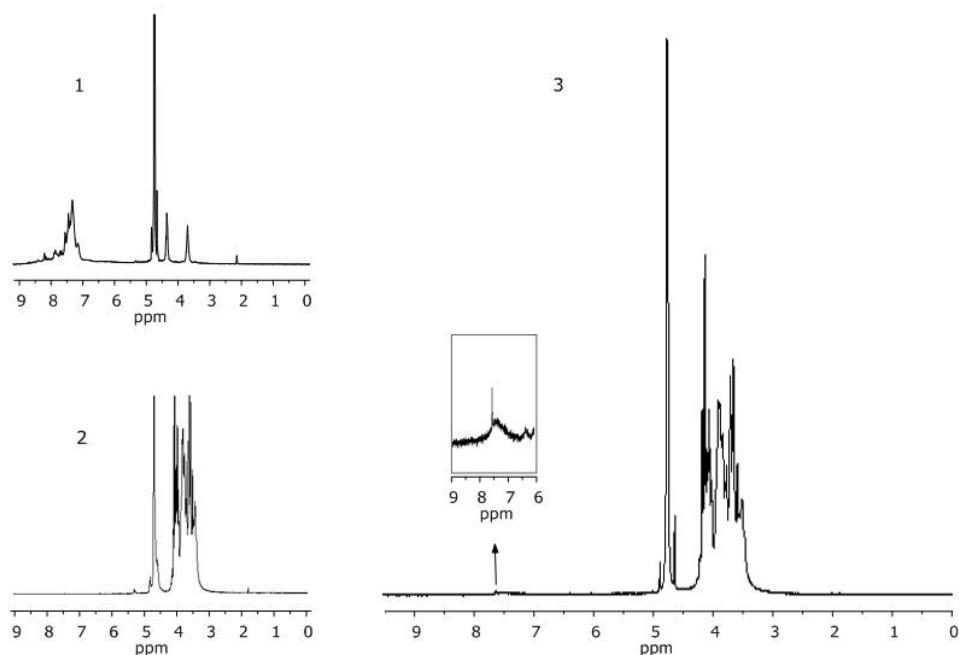


Slika 4.46.  $^1\text{H}$  NMR spektri: RBBR (1), pululan (2) i konjugat pululan – RBBR (3)

Nizak intenzitet pika koji potiče od antrahinonskog dela molekula RBBR može se objasniti malom količinom boje kovalentno vezane za pululan, verovatno usled otežanog pristupa relativno velikih molekula boje polisaharidnom lancu. U vodenim rastvorima, pululan ima konformaciju „nasumičnog navoja” (eng. random coil) čija je fleksibilnost omogućena prisustvom  $\alpha$ -(1,6)-glikozidnih veza (Adolph i Kulicke, 1997), budući da  $\alpha$ -(1,4)-maltotriozni fragmenti formiraju rigidne strukture (Liu et al., 2002). Tokom reakcije kuplovanja otežan je pristup voluminoznih molekula boje polisaharidnom lancu usled sternih smetnji, što je razlog za relativno mali procenat vezivanja RBBR za pululanski niz.

U  $^1\text{H}$  NMR spektru rastvora levana u  $\text{D}_2\text{O}$  (slika 4.47.) uočavaju se hemijska pomeranja sedam protona u regionu 3,4 – 4,2 ppm koji ukazuju na to da se ovaj polisaharid sastoji od (2,6)-povezanih fruktofuranosa: pikovi na 4,2 ppm, 4,1 ppm, 3,9 ppm, 3,8 ppm, 3,5 ppm potiču od H-3, H-4, H-5, H-6a i H-6b, redom. Hemijska pomeranja na 3,7 ppm i 3,75 ppm pripisana su H-1a i H-1b protonima. U anomernom regionu (5,3 – 4,3 ppm) nema pikova, što takođe ukazuje na  $\beta$ -(2,6)-glikozidno vezivanje monosaharidnih jedinica u ovom polisaharidu. (Esawi et al., 2013; Ahmed et al., 2014; Angeli et al., 2009).





Slika 4.47.  $^1\text{H}$  NMR spektri: RBBR (1), levan (2) i konjugat levan – RBBR (3)

U  $^1\text{H}$  NMR spektru sintetisanog derivata levana (slika 4.47.) uočavaju se hemijska pomeranja karakteristična za protone polisaharida i boje. Prisutan je slab pik na 7,5 ppm koji potiče od aromatičnog antrahinonskog regiona čiji intenzitet ukazuje na nizak stepen vezivanja ove boje. Razlog tome su najverovatnije sterne smetnje, odnosno otežan pristup relativno velikog molekula boje polimeru levana koji u vodenom rastvoru zauzima sfernu konformaciju i time dodatno otežava pristup unutrašnjosti ovog molekula (Manandhar et al., 2009).

#### 4.16. Elementalna organska mikroanaliza konjugata pululana i levana sa bojom Remazol Brilliant Blue R

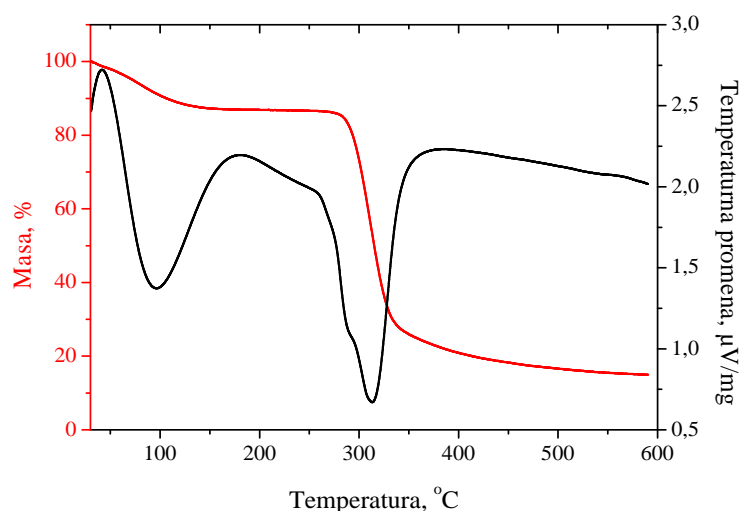
Uspešnost reakcije kuplovanja dokazana je i rezultatima elementalne organske mikroanalize, poređenjem rezultata za polisaharide i sintetisane konjugate. Kao što je i očekivano, čisti polisaharidi u svojoj strukturi sadrže samo ugljenik (pululan 44,20%, levan 40,16%) i vodonik (pululan 6,30%, levan 6,58%), bez prisustva azota i sumpora.

Dobijeni rezultati se slažu sa vrednostima preračunatim za glikane. Sadržaj azota (0,61% u konjugatima sa pululanom, odnosno 0,23% u konjugatima sa levanom) i sumpora (2,06% u derivatima pululana, odnosno 0,89% u derivatima levana) predstavlja dokaz prisustva boje u sintetisanim konjugatima.

#### 4.17. Termalna stabilnost konjugata pululana i boje Remazol Brilliant Blue R

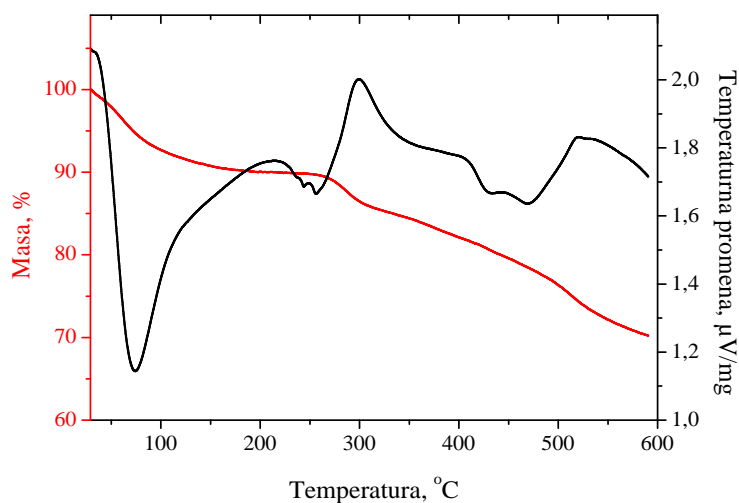
Termalna stabilnost pululana, RBBR i konjugata analizirana je termogravimetrijski, izlaganjem uzoraka promeni temperature od sobne do 600 °C, u inertnoj atmosferi azota.

Termogravimetrijska i diferencijalna termička analiza pululana objašnjena je u poglavlju 4.7.2. U ovim uslovima, uočen je gubitak mase pululana od 11,4% na temperaturama do 160 °C i 61,0% u opsegu 160 °C – 431 °C. Ukupan gubitak mase na 600 °C bio je 85% (slika 4.48.).



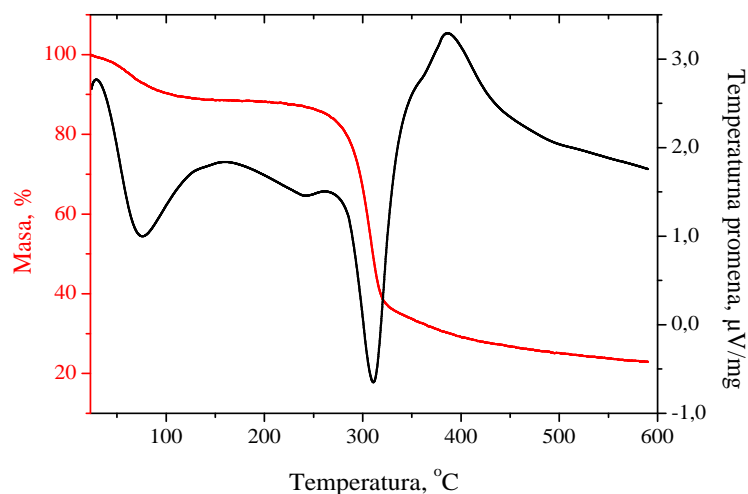
Slika 4.48. TGA i DTA krive termičke analize pululana

Gubitak mase RBBR odigrava se u pet koraka (slika 4.49.): od sobne temperature do 208 °C gubitak je bio 10% od početne mase uzorka, u drugoj fazi (do 334 °C) masa je smanjena za još 5%, zagrevanjem do 408 °C za dodatnih 3,2%, do 447 °C 2% i, u poslednjoj fazi (do 600 °C) gubitak mase je bio 9,5%. Ukupan gubitak mase u ovom temperaturnom režimu bio je 29,7%, što ukazuje na to da su antrahinonske strukture, uopšteno, termalno stabilne (Gordon i Gregory, 1983).



Slika 4.49. TGA i DTA krive termičke analize boje Remazol Brilliant Blue R

Konjugat pululana i RBBR pokazao je nešto veću termalnu stabilnost od čistog pululana (slika 4.50.). Razgradnja derivata započela je na višim temperaturama, pa je prva faza razgradnje, gde je gubitak mase bio 13,1%, završena na 183 °C. U drugoj fazi, na temperaturama do 439 °C, ukupan gubitak mase je bio 68,2% i do 600 °C vrednost je dostigla 77%.



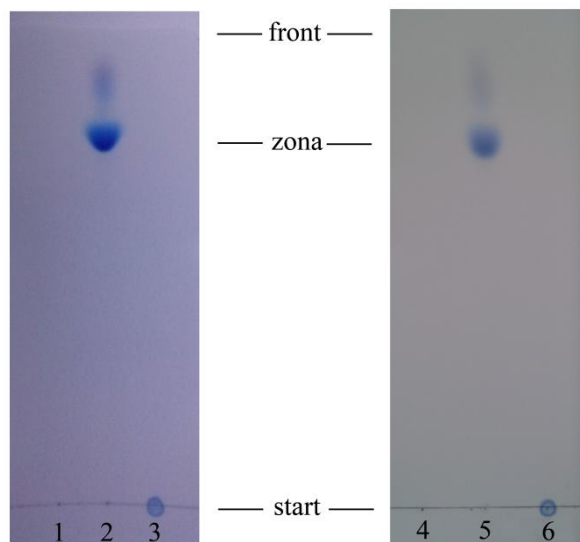
Slika 4.50. TGA i DTA krive termičke analize konjugata pululan – RBBR

Veća stabilnost obojenog polimera i manja brzina degradacije u odnosu na čist polisaharid može se pripisati kuplovanju sa termalno stabilnijom antrahinonskom bojom. Zbog niskog sadržaja vezane boje, stabilnost je neznatno povećana.

#### 4.18. Tankoslojna hromatografija konjugata pululana i boje Remazol Brilliant Blue R

Kao dodatna potvrda kovalentnog vezivanja molekula RBBR za pululan urađena je tankoslojna hromatografija na pločama od silikagela u sistemu razvijaača metanol:amilalkohol:voda, 5:5:2 (v/v/v). Na ploču su nanoseni rastvori pululana, RBBR i konjugata. Hromatogram je vizuelizovan direktno na dnevnoj svetlosti (slika 4.51.). Sintetisani derivat se video kao jedna plava mrlja na startnoj liniji, bez tragova nevezane boje u zoni hromatografije, što je dokaz da je celokupna količina RBBR hemijski vezana za pululan. RBBR, koji je bio standard za poređenje, putovao je sa sistemom razvijaača, dok čist pululan nije bio vidljiv na hromatogramu, budući da je, usled odsustva hromofornih grupa, bezbojan. Prskanjem hromatograma 10% sumpornom kiselinom i zagrevanjem ploče na 100 °C 10 minuta, uočene su dve mrlje na startnoj

liniji koje predstavljaju pululan i konjugat, kao i mrlja od RBBR u zoni hromatografije (hromatogram nije prikazan).



Slika 4.51. Hromatografija na tankom sloju silika gela: pululan (1), RBBR (2), konjugat pululan – RBBR (3), levan (4), RBBR (5) i konjugat levan – RBBR (6) na silikagelu u sistemu razvijaača metanol:amilalkohol:voda, 5:5:2 (v/v/v)

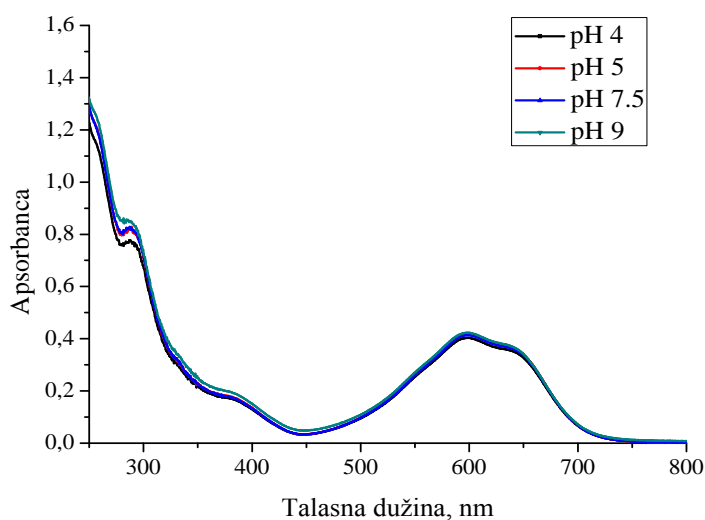
#### **4.19. Stabilnost konjugata pululana i levana sa bojom Remazol Brilliant Blue R**

Ispitana je stabilnost puferisanih vodenih rastvora hromogenih polimera na različitim pH vrednostima (pH 4,0; pH 5,0; pH 7,5 i pH 9,0; na sobnoj temperaturi) i u uslovima sterilizacije u autoklavu (30 minuta na 121 °C). Puferi u kojima su rastvoreni konjugati su optimalnih pH vrednosti za rast najvećeg broja mikroorganizama i ne utiču na njihov rast.

Rastvori konjugata u puferima različitih pH vrednosti koncentracije 0,1% (w/v) inkubirani su na sobnoj temperaturi 24 h, a zatim su rastvori čije su pH 7,5 sterilisani u

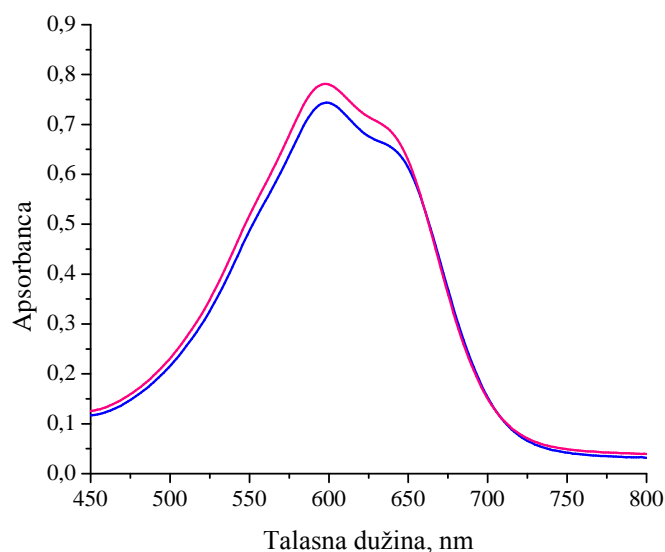
autoklavu. Za potvrdu stabilnosti u ovim uslovima, snimljeni su i međusobno upoređeni njihovi UV-Vis spektri.

Uočeno je da UV-Vis spektri ne pokazuju nikakve razlike u apsorpciji rastvora uzoraka u puferima različitih pH vrednosti (slika 4.52.), međusobno, kao i poređenjem sa vodenim rastvorom. Ovo ukazuje na to da su dobijeni derivati stabilni u širokom opsegu pH vrednosti i da mogu da se koriste u uslovima u kojima postoji specifičan zahtev za određenim puferom ili posebnim uslovima rasta mikroorganizama, budući da je osnovni cilj ove derivatizacije primena konjugata kao hromogenih supstrata u enzimskim testovima i obojenim hranljivim podlogama.



Slika 4.52. UV-Vis spektri rastvora konjugata pululan – RBBR na različitim pH vrednostima

Za primenu konjugata u ispitivanju mikroorganizama koji imaju pululanaznu aktivnost posebno je važna stabilnost u uslovima autoklaviranja, koja je neophodan preduslov za dobijanje hromogenih medijuma dodavanjem obojenog derivata u hranljivu podlogu odgovarajućeg sastava. UV-Vis spektroskopijom je pokazano da u ovim uslovima ne dolazi do destabilizacije derivata (slika 4.53.) i da se konjugat pululana i RBBR može koristiti za „screening” mikroorganizama na pululanaznu aktivnost.



Slika 4.53. UV-Vis spektri rastvora konjugata pululan – RBBR u uslovima pre (plavo) i posle (roze) autoklaviranja

#### **4.20. Ispitivanje pululanazne aktivnosti upotrebom konjugata pululana sa RBBR kao hromogenog supstrata**

Sintetisani derivat pululana sa RBBR je upotrebljen kao supstrat za komercijalni enzim pululanazu M1 (EC 3.2.1.41). U rastvore konjugata u natrijum-acetatnom puferu, pH 5,0 su dodate različite zapremine rastvora enzima. U uslovima opisanim u poglavlju 3.4.4., enzim je hidrolizovao supstrat i oslobađala se boja čiji je intenzitet meren spektrofotometrijski na talasnoj dužini 595 nm (slika 4.54.).

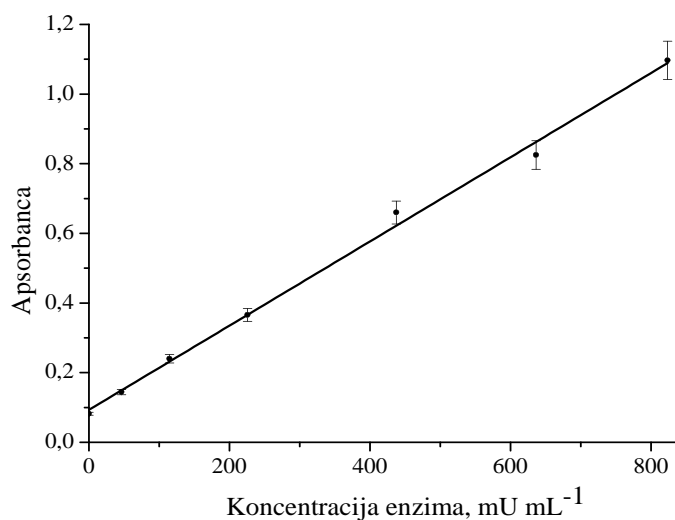


Slika 4.54. Fotografija enzimskog testa za ispitivanje pululanazne aktivnosti pomoću konjugata pululan – RBBR kao hromogenog supstrata

Na osnovu zavisnosti intenziteta oslobođene boje od koncentracije enzima konstruisana je standardna kriva enzimske aktivnosti (slika 4.55.). Jednačina dobijene prave je:

$$y = 0,09315 + 0,00121 \cdot x,$$

a vrednost koeficijenta determinacije ( $R^2$ ) je 0,9957.

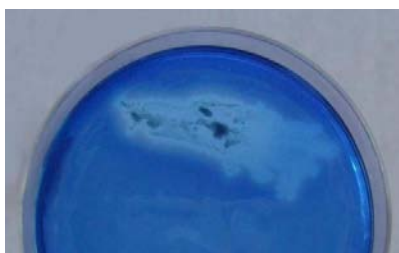


Slika 4.55. Standardna kriva hidrolize rastvora konjugata pululan – RBBR pomoću pululanaze M1

Na osnovu izloženih rezultata može se zaključiti da je sintetisani konjugat pogodan supstrat za ispitivanje enzimske aktivnosti, a dobijeni podaci mogu da se koriste za procenu enzimske aktivnosti u preparatima različitog stepena čistoće.



Sintetisani konjugat je upotrebljen kao supstrat za „screening” mikroorganizama na pululanaznu aktivnost, dodavanjem u hranljivi agar do finalne koncentracije od 0,1% (w/v). Obojena podloga je, nakon sterilizacije, razlivanja u Petri šolje i očvršćavanja, inokulisana mikroorganizmom *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Nakon inkubacije na 37 °C u trajanju od dva dana, na Petri šolji su uočene svetle zone oko bakterijskih kolonija (slika 4.56.).



Slika 4.56. Detekcija pululazne aktivnosti pri rastu mikroorganizma na agarnoj podlozi uz dodatak pululan – RBBR konjugata

Na ovaj način je dokazano da je sintetisani obojeni derivat pululana pogodan za pripremu obojenih hranljivih mikrobioloških podloga, s obzirom na to da zadovoljava uslove sterilizacije i omogućava direktnu vizuelizaciju mikroorganizama koji imaju pululanaznu aktivnost.

## **5. Zaključci**

---

Na osnovu dobijenih i diskutovanih rezultata u ovoj doktorskoj disertaciji, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Biljni polisaharid gumiarabika i mikrobnii polisaharid pululan oksidovani su natrijum-perjodatnim reagensom u kontrolisanim uslovima. Ovom oksidativnom transformacijom generisane su reaktivne aldehidne grupe u nizovima ovih glikana, u različitom stepenu, u zavisnosti od reakcionih uslova.
2. Oksidacija gumiarabike je rađena u vremenskom intervalu od 6 časova na sobnoj temperaturi, sa različitim koncentracijama natrijum-perjodata u vodenom rastvoru. Dobijeni su polialdehidni derivati kod kojih je procenat oksidacije iznosio 18% i 50%, što je utvrđeno na osnovu rezultata jodometrijske titracije. Oksidacija pululana je rađena u toku 2 i 4 sata na sobnoj temperaturi. Variranjem koncentracije oksidacionog sredstva i polisaharida dobijeni su 10%, 20% i 50% oksidovani derivati pululana, što je utvrđeno jodometrijskom titracijom i određivanjem sadržaja aldehidnih grupa hidrosilamin-hidrohloridnom metodom.
3. Sintetisani su konjugati perjodatno-oksidovanih polisaharida u reakciji sa polienskim antibioticima (nistatinom i amfotericinom B), kuplovanjem primarne amino grupe antibiotika i aldehidne grupe parcijalno oksidovanih polisaharida.
4. Rezultati karakterizacije konjugata pomoću standardnih instrumentalnih metoda strukturne analize (UV-Vis, FT-IR i  $^1\text{H}$  NMR spektroskopijom), kao i tankoslojnom hromatografijom, su ukazali da su molekuli antibiotika kovalentno vezani za polisaharidne nizove. Strukturnom karakterizacijom nastalih konjugata dokazana je retencija strukture antibiotika koja je neophodan preduslov za njihovu aktivnost. Takođe, na osnovu rezultata TGA-DTA analiza zaključeno je da je reakcijom kuplovanja povećana stabilnost dobijenih proizvoda u temperaturnom opsegu od sobne temperature do 600 °C.
5. Eksperimentom kontrolisanog oslobađanja antibiotika nistatina iz konjugata sa pululanom na dve pH vrednosti (pH 7,4 i pH 1,5) pokazano je da brzina i stepen oslobađanja rastu sa povećanjem kiselosti. Takođe, ustanovljeno je da je oslobađanje aktivne supstance katalizovano kiselinom, ali da se struktura nistatina

ne menja ni u uslovima niskih pH vrednosti u ispitivanom vremenskom periodu, što je potvrđeno UV-Vis spektroskopijom.

6. Funkcionalizacija polisaharida pululana i gumiarabike sa polienskim antibioticima pokazala se kao pogodan metod za sintezu formulacija nistatina i amfotericina B koje imaju poboljšanu rastvorljivost u vodi u odnosu na polazne antibiotike.
7. Stabilnost konjugata gumiarabike i nistatina u liofilizovanom obliku ispitivana je u toku vremenskog perioda od šest meseci. Uočeno je da ne dolazi do degradacije konjugata u tom periodu, kao i da je vodeni rastvor derivata gumiarabike stabilniji od čistog nistatina nakon sedmodnevne inkubacije na sobnoj temperaturi. Takođe, utvrđeno je da reakcija kuplovanja ima pozitivan efekat na povećanje stabilnosti vodenih rastvora nistatina u oblasti pH vrednosti 4,0 – 9,0; to je posebno izraženo u kiselim sredinama.
8. Ispitivanjem antifungalne aktivnosti sintetisanih polisaharidnih derivata na soj *Candida albicans* ATCC 24433 utvrđeno je da svi konjugati imaju očuvanu aktivnost.
9. Reakcijom kuplovanja polisaharida pululana i levana sa antrahinonskom bojom Remazol Brilliant Blue R dobijeni su stabilni hromogeni derivati polisaharida koji su okarakterisani spektroskopskim metodama (UV-Vis, FT-IR i NMR spektroskopijom), kao i elementalnom organskom mikroanalizom i tankoslojnom hromatografijom.
10. Ispitivanjem stabilnosti sintetisanih hromogenih derivata simultanom TGA-DTA analizom utvrđeno je da se kuplovanjem za termalno stabilniju antrahinonsku boju povećava stabilnost konjugata u poređenju sa čistim polisaharidom.
11. Utvrđeno je da su konjugati pululana sa bojom RBBR stabilni u širokom opsegu pH vrednosti (pH 4,0 – 9,0) i da mogu da se koriste u uslovima u kojima postoji specifičan zahtev za određenim puferom ili posebnim uslovima rasta mikroorganizma. Takođe, pokazano je da u uslovima sterilizacije u autoklavu ne dolazi do destabilizacije derivata i da sintetisani konjugat može da se koristi za „screening” mikroorganizama na pululanaznu aktivnost.

12. Testom na Petri šolji, kao i testom sa komercijalnim enzimom pululanazom pokazano je da sintetisani konjugat pululana i boje RBBR može da se koristi kao hromogeni supstrat za direktnu detekciju pululanazne aktivnosti na agarnoj podlozi, kao i u rastvoru.

## **6. Literatura**

---

1. Abib, C. F., Ntoupka, M., Peltier, R., Harmand, J. M., Thaler, P., (2013). Ethephon: a tool to boost gum arabic production from *Acacia senegal* and to enhance gummosis processes, *Agroforest. Syst.*, 87, 427–438.
2. Adiotomre, J., Easiwood, M. A., Edwards, C. A., Brydon, W. G., (1990). Dietary fiber: in vitro methods that anticipate nutrition and metabolic activity in humans, *Am. J. Clin. Nutr.*, 52, 128–134.
3. Adolphi, U., Kulicke, W. M., (1997). Coil dimensions and conformation of macromolecules in aqueous media from flow field-flow fractionation/multi-angle laser light scattering illustrated by studies on pullulan, *Polymer*, 38(7), 1513–1519.
4. Ahmed, K. B. A., Kalla, D., Uppuluri, K. B., Anbazhagan, V., (2014). Green synthesis of silver and gold nanoparticles employing levan, biopolymer from *Acetobacter xylinum* NCIM 2526, as a reducing agent and capping agent, *Carbohydr. Polym.*, 112, 539–545.
5. Ali, B. H., Ziada, A., Blunden, G., (2009). Biological effects of gum arabic: A review of some recent research, *Food Chem. Toxicol.*, 47, 1–8.
6. Alonso-Sande, M., Teijeiro-Osorio, D., Remuán-López, C., Alonso, M. J., (2009). Glucomannan, a promising polysaccharide for biopharmaceutical purposes, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 72, 453–462.
7. Álvarez, M. S., Moscoso, F., Rodríguez, A., Sanromán, M. A., Deive, F. J., (2013). Novel physico-biological treatment for the remediation of textile dyes-containing industrial effluents, *Biores. Technol.*, 146, 689–695.
8. Anderson, C., Tatchell, K., (2001). Hyperactive glycogen synthase mutants of *Saccharomyces cerevisiae* suppress the *glc7-1* protein phosphatase mutant, *J. Bacteriol.*, 183(3), 821–829.
9. Angeli, R., da Paz, N. V. N., Maciel, J. C., Araújo, F. F. B., Paiva, P. M. G. Calazans, G. M. T., Valente, A. P., Almeida, F. C. L., Coelho, L. C. B., Carvalho

- Jr., L. B., Silva, M. C., Correia, M. T., (2009). Ferromagnetic levan composite: An affinity matrix to purify lectin, *J. Biomed. Biotechnol.*, 1–6.
10. Anjaneyulu, Y., Chary, N. S., D. Raj, S. S., (2005). Decolourization of industrial effluents – available methods and emerging technologies – a review, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, 4, 245–273.
  11. Aparicio, J. F., Caffrey, P., Gil, J. A., Zotchev, S. B., (2003). Polyene antibiotic biosynthesis gene clusters, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61, 179–188.
  12. Arakawa, Y., Wacharotayankun, R., Nagatsuka, T., Ito, H., Kato, N., Ohta, M., (1995). Genomic organization of the *Klebsiella pneumoniae cps* region responsible for Serotype K2 capsular polysaccharide synthesis in the virulent strain Chedid, *J. Bacteriol.*, 177(7), 1788–1796.
  13. Arvidson, S. A., Rinehart, B. T., Gadala-Maria, F., (2006). Concentration regimes of solutions of levan polysaccharide from *Bacillus sp.*, *Carbohydr. Polym.*, 65, 144–149.
  14. Bae, H., Ahari, A. F., Shin, H., Nichol, J. W., Hutson, C. B., Masaeli, M., Kim, S. H., Aubin, H., Yamanlar, S., Khademhosseini, A., (2011). Cell-laden microengineered pullulan methacrylate hydrogels promote cell proliferation and 3D cluster formation, *Soft. Matter.*, 7(5), 1903–1911.
  15. Bae, I. Y., Oh, I. K., Lee, S., Yoo, S. H., Lee, H. G., (2008). Rheological characterization of levan polysaccharides from *Microbacterium laevaniformans*, *Int. J. Biol. Macromol.*, 42(1), 10–13.
  16. Baginski, M., Resat, H., McCammon, J. A., (1997). Molecular properties of amphotericin B membrane channel: A molecular dynamics simulation, *Mol. Pharmacol.*, 52, 560–570.
  17. Balasubramaniam, A. K., Nagarajan, K. V., Paramasamy, G., (2001). Optimization of media for  $\beta$ -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation, *Process Biochem.*, 36, 1241–1247.



18. Baran, M., Mazerski, J., (2015). Comparative molecular modelling of biologically active sterols, *J. Mol. Struct.*, 1085, 173–177.
19. Barone, J. R., Medynets, M., (2007). Thermally processed levan polymers, *Carbohydr. Polym.*, 69, 554–561.
20. Barwicz, J., Gruszecki, W. I., Gruda, I., (1993). Spontaneous organization of amphotericin B in aqueous medium, *J. Colloid Interface Sci.*, 158, 71–76.
21. Bates, D. W., Su, L., Yu, D. T., Chertow, G. M., Seger, D. L., Gomes, D. R. J., Platt, R., (2001). Correlates of acute renal failure in patients receiving parenteral amphotericin B, *Kidney Int.*, 60, 1452–1459.
22. Becker, K., Pühler, F. A., Ielpi, L., (1998). Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50, 145–152.
23. Bekers, M., Linde, R., Upite, D., Kaminska, E., Viesturs, U., (2001) Sugar beet juice fermentation by *Zymomonas mobilis* attached to stainless steel wire spheres, *Acta Biotechnol.*, 21(1), 89–96.
24. Bekersky, I., Fielding, R. M., Buell D., Lawrence, I., (1999). Lipid-based amphotericin B formulations: from animals to man, *Plasma Sources Sci. Technol.*, *PSST*, 2(6), 230–236.
25. Belghith, K. S., Dahech, I., Belghith, H., Mejdoub, H., (2012). Microbial production of levansucrase for synthesis of fructooligosaccharides and Levan, *Int. J. Biol. Macromol.*, 50, 451–458.
26. Bender, H., Lehmann, J., Wallenfels, K., (1959). Pullulan, an extracellular glucan from *Pullularia pullulans*, *Biochim. Biophys. Acta*, 36, 309–316.
27. Bérdy, J., (1974). Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure, *Adv. Appl. Microbiol.*, 18, 309–406.
28. Bérdy, J., (2005). Bioactive Microbial Metabolites, *J. Antibiot.*, 58(1), 1–26.

29. Bernard, M., Latgé, J.-P., (2001). *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis, *Med. Mycol.*, 39, 9–17.
30. Bernier, B., (1958). The production of polysaccharides by fungi active in the decomposition of wood and forest litter, *Can. J. Microbiol.*, 4(3), 195-204.
31. Bøjstrup, M., Christensen, C. E., Windahl, M. S., Henriksen, A., Hindsgaul, O., (2014). A chromogenic assay for limit dextrinase and pullulanase activity, *Anal. Biochem.*, 449, 45–51.
32. Bonafonte, M. A., Solano, C., Sesma, B., Alvarez, M., Montuenga, L., Garcia-Ros, D., Gamazo, C., (2000). The relationship between glycogen synthesis, biofilm formation and virulence in *Salmonella enteritidis*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 191, 31–36.
33. Boridy, S., Takahashi, H., Akiyoshi, K., Maysinger, D., (2009). The binding of pullulan modified cholesteryl nanogels to A $\beta$  oligomers and their suppression of cytotoxicity, *Biomaterials*, 30, 5583–5591.
34. Borowski, J. Zielinski, T. Ziminski, L. Falkowski, P. Kolodziejczyk, J. Golik, E. Jereczek, (1970). Chemical studies with amphotericin B III. The complete structure of the antibiotic, *Tetrahedron Lett.*, 45, 3909–3914.
35. Borsari, R. R. J., Celligoi, M. A. P. C., Buzato, J. B., da Silva, R. S. S. F., (2006). Influence of carbon source and the fermentation process on levan production by *Zymomonas mobilis* analyzed by the surface response method, *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 26(3), 604–609.
36. Boswell, G. W., Bekersky, I. Buell, D., Hiles, R., Walsh, T. J., (1998). Toxicological profile and pharmacokinetics of a unilamellar liposomal vesicle formulation of amphotericin B in rats, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42(2), 263–268.
37. Bourassa, L., Camilli, A., (2009). Glycogen contributes to the environmental persistence and transmission of *Vibrio cholerae*, *Mol. Microbiol.*, 72(1), 124–138.

38. Bowman, S. M., Free, S. J., (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall, *BioEssays*, 28, 799–808.
39. Bowman, S. M., Piwowar, A., Dabbous, M. A., Vierula, J., Free, S. J., (2006). Mutational analysis of the glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor pathway demonstrates that GPI-anchored proteins are required for cell wall biogenesis and normal hyphal growth in *Neurospora crassa*, *Eukaryot. Cell*, 5(3), 587–600.
40. Brautaset, T., Sekurova, O. N., Sletta, H., Ellingsen, T. E., Strøm, A. R., Valla, S., Zotchev, S. B., (2000). Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway, *Chem. Biol.*, 7, 395–403.
41. Brown, J. A., Catley, B. J. (1992). Monitoring polysaccharide synthesis in *Candida albicans*, *Carbohydr. Res.*, 227, 195–202.
42. Bruneel, D., Schacht, E., (1993). Chemical modification of pullulan: 1. Periodate oxidation, *Polymer*, 34(12), 2628–2632.
43. Buléon, P. C., Planchot, V., Ball, S., (1998). Starch granules: structure and biosynthesis, *Int. J. Biol. Macromol.*, 23, 85–112.
44. Caffall, K. H., Mohnen, D., (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides, *Carbohydr. Res.*, 344, 1879–1900.
45. Caffrey, P., Lynch, S., Flood, E., Finnan, S., Oliynyk, M., (2001). Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes, *Chem. Biol.*, 8, 713–723.
46. Carpita, N. C., Gibeaut, D. M., (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth, *Plant J.*, 3(1), 1–30.
47. Carrillo-Muñoz J., Quindós, G., Tur, C., Ruesga, M. T., Miranda, Y., del Valle, O., Cossum, P. A., Wallace, T. L., (1999). In-vitro antifungal activity of liposomal nystatin in comparison with nystatin, amphotericin B cholesteryl sulphate, liposomal amphotericin B, amphotericin B lipid complex, amphotericin B

- desoxycholate, fluconazole and itraconazole, *J. Antimicrob. Chemother.*, 44, 397–401.
48. Catley, B. J., Ramsay, A., Servis, C., (1986). Observations on the structure of the fungal extracellular polysaccharide, pullulan, *Carbohydr. Res.*, 153(1), 79–86.
49. Chamrathy, S. P., Pinal, R., (2008). Plasticizer concentration and the performance of a diffusion-controlled polymeric drug delivery system, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 331, 25–30.
50. Chandrasekar, P. H., (2008). Amphotericin B lipid complex: treatment of invasive fungal infections in patients refractory to or intolerant of amphotericin B deoxycholate, *Ther. Clin. Risk Manag.*, 4(6), 1285–1294.
51. Chandrasekar, P., (2011). Management of invasive fungal infections: a role for polyenes, *J. Antimicrob. Chemother.*, 66, 457–465.
52. Chen, N. Y., Hsu, T. H., Lin, F. Y., Lai, H. H., Wu, J. Y., (2006). Effects on cytokine-stimulating activities of EPS from *Tremella mesenterica* with various carbon sources, *Food Chem.*, 99, 92–97.
53. Cheng, K. C., Demirci, A., Catchmark, J. M., (2011). Pullulan: biosynthesis, production, and applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 92, 29–44.
54. Cherbut, C., Michel, C., Raison, V., Kravtchenko, T., Severine, M., (2003). *Acacia* gum is a bifidogenic dietary fibre with high digestive tolerance in healthy humans, *Microb. Ecol. Health D.*, 15, 43–50.
55. Chi, Z., Pyle, D., Wen, Z., Frear, C., Chen, S., (2007). A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation, *Process Biochem.*, 42, 1537–1545.
56. Chi, Z., Wang, F., Chi, Z., Yue, L., Liu, G., Zhang, T., (2009). Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 82, 793–804.

57. Chi, Z., Zhao, S., (2003). Optimization of medium and new cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast strain, *Enzyme Microb. Technol.*, 33, 206–211.
58. Choudhury, R., Bhattacharyya, M. S., Prasad, G. S., (2012). Application of response surface methodology to understand the interaction of media components during pullulan production by *Aureobasidium pullulans* RBF-4A3, *Biocat. Agric. Biotechnol.*, 1(3), 232–237.
59. Chung, B. H., Kim, W. K., Song, K. B., Kim, C. H., Rhee, S. K., (1997). Novel polyethylene glycol/levan aqueous two-phase system for protein partitioning, *Biotechnol. Tech.*, 11(5), 327–329.
60. Cornely, O. A., (2008). *Aspergillus* to *Zygomycetes*: Causes, Risk Factors, Prevention, and Treatment of Invasive Fungal Infections, *Infection*, 36(4), 296–313.
61. Cozzolino, C. A., Cerri, G., Brundu, A., Farris, S., (2014). Microfibrillated cellulose (MFC): pullulan bionanocomposite films, *Cellulose*, 21, 4323–4335.
62. Cui, S. W., Phillips, G. O., Blackwell, B., Nikiforuk, J., (2007). Characterisation and properties of *Acacia senegal* (L.) Willd. var. *senegal* with enhanced properties (*Acacia (sen) SUPERGUM™*): Part 4. Spectroscopic characterisation of *Acacia senegal* var. *senegal* and *Acacia (sen) SUPERGUM™ arabic*, *Food Hydrocoll.*, 21, 347–352.
63. Cumpstey, I., (2013). Chemical Modification of Polysaccharides, *ISRN Org. Chem.*, 1–27.
64. Dahech, I., Fakhfakh, J., Damak, M., Belghith, H., Mejdoub, H., Belghith, K. S., (2013). Structural determination and NMR characterization of a bacterial exopolysaccharide, *Int. J. Biol. Macromolec.*, 59, 417–422.
65. Dal Bello, F., Walter, J., Hertel C., Hammes, W. P., (2001). *In vitro* study of prebiotic properties of levan-type exopolysaccharides from *Lactobacilli* and non-

- digestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis, *System. Appl. Microbiol.*, 24, 232–237.
66. de Bary, H. A., (1866). Entwicklungsgang der Pilze. Pleomorphie. Generationswechsel. In: Morphologie und physiologie der *Pilze, Flechten* und *Myxomyceten*, Leipzig, 182-184.
  67. de Boer, A. S., Priest, F., Diderichsen, B., (1994). On the industrial use of *Bacillus licheniformis*: a review, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40(5), 595–598.
  68. de Oliveira, M. R., da Silva, R. S. S. F., Buzato, J. B., Celligoi, M. A. P. C., (2007). Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources, *Biochem. Eng. J.*, 37(2), 177–183.
  69. de Paula, V. C., Pinheiro, I. O., Lopes, C. E., Calazans, G., (2008). Microwave-assisted hydrolysis of *Zymomonas mobilis* levan envisaging oligofructan production, *Biores. Technol.*, 99(7), 2466–2470.
  70. de Sousa, C. L. A., Campos, M. I., Druzian, J. I., de Oliveira, A. M., de Oliveira Junior, E. N., (2014) Biosynthesis of xanthan gum from fermenting shrimp shell: yield and apparent viscosity, *Int. J. Polym. Sci.*, 1–8.
  71. Defaye, J.; Wong, E., (1986). Structural studies of gum arabic, the exudate polysaccharide from *Acacia senegal*, *Carbohydr. Res.*, 150(1), 221–231.
  72. Deive, F. J., Domínguez, A., Barrio, T., Moscoso, F., Morán, P., Longo, M. A., Sanromán, M. A., (2010). Decolorization of dye Reactive Black 5 by newly isolated thermophilic microorganisms from geothermal sites in Galicia (Spain), *J. Hazard. Mater.*, 182, 735–742.
  73. Delben, F., Forabosco, A., Guerrini, M., Liut, G., Torri, G., (2006). Pullulans produced by strains of *Cryphonectria parasitica*—II. Nuclear magnetic resonance evidence, *Carbohydr. Polym.*, 63, 545–554.

74. Dhital, S., Shrestha, A. K., Hasjim, J., Gidley, M. J., (2011). Physicochemical and structural properties of maize and potato starches as a function of granule size, *J. Agric. Food Chem.*, 59, 10151–10161.
75. Diaz, A. N. Absorption and emission spectroscopy and photochemistry of 1,10-anthraquinone derivatives: A review, (1990). *J. Photochem. Photobiol.*, 53, 141–167.
76. Dickinson, E., (2003). Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems, *Food Hydrocoll.*, 17, 25–39.
77. Domafi-Pytka, M., Bardowski, J., (2004). Pullulan degrading enzymes of bacterial origin, *Crit. Rev. Microbiol.*, 30, 107–121.
78. Domb, A. J., Linden, C., Polacheck, I., Benita, S., (1996). Nystatin-dextran conjugates: synthesis and characterization, *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.*, 34, 1229–1236.
79. Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C., Schorr-Galindo, S., (2012). Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction, *Carbohydr. Polym.*, 87, 951–962.
80. Dramsi, S., Magnet, S., Davison, S., Arthur, M., (2008). Covalent attachment of proteins to peptidoglycan, *FEMS Microbiol. Rev.*, 32, 307–320.
81. Drobchenko, S. N., Isaeva-Ivanova, L. S., Kleiner, A. R., Lomakin, A. V., Kolker, A. R., Noskin, V. A., (1993). An investigation of the structure of, periodate-oxidised dextran, *Carbohydr. Res.*, 241, 189–199.
82. Duan, X., Chi, Z., Wang, L., Wang, X., (2008). Influence of different sugars on pullulan production and activities of  $\alpha$ -phosphoglucose mutase, UDPG-pyrophosphorylase and glucosyltransferase involved in pullulan synthesis in *Aureobasidium pullulans* Y68, *Carbohydr. Polym.*, 73, 587–593.
83. Dufresne, A., (2014). Crystalline starch based nanoparticles, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 19, 397–408.

84. Dunne, W. M. Jr., (2002). Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately?, *Clin. Microbiol. Rev.*, 15(2), 155–166.
85. Dutcher, J. D., Gold, W., Pagano, J. F., Vandeputte, J., (1959). Amphotericin B, its production, and its salts, Patented Oct. 13, Serial No. 478,014.
86. Ehrenfreund-Kleinman, T., Azzam, T., Falk, R., Polacheck, I., Golenser, J., Domb, A. J., (2002). Synthesis and characterization of novel water soluble amphotericin B–arabinogalactan conjugates, *Biomaterials*, 23, 1327–1335.
87. Elgart, A., Farber, S., Domb, A. J., Polacheck, I., Hoffman, A., (2010). Polysaccharide pharmacokinetics: amphotericin B arabinogalactan conjugates. A drug delivery system or a new pharmaceutical entity?, *Biomacromolecules*, 11, 1972–1977.
88. Ellis, D., (2002). Amphotericin B: spectrum and resistance, *J. Antimicrob. Chemother.*, 49, 7–10.
89. Epolito, W., Lee, Y., Bottomley, L., Pavlostathis, S. (2005). Characterization of the textile anthraquinone dye Reactive blue 4, *Dyes Pigments*, 67, 35–46.
90. Esawy, M. A., Amer, H., Gamal-Eldeen, A. M., El Enshasy, H. A., Helmy, W. A., Abo-Zeid, M. A. M., Malek, R., Ahmed, E. F., Awad, G. E. A., (2013). Scaling up, characterization of levan and its inhibitory role in carcinogenesis initiation stage, *Carbohydr. Polym.*, 95, 578– 587.
91. Eydallin, G., Viale, A. M. Moran-Zorzano, M. T., Munoz, F. J., Montero, M., Baroja-Fernandez E., Pozueta-Romero, J., (2007). Genome-wide screening of genes affecting glycogen metabolism in Escherichia coli K-12, *FEBS Letters*, 581, 2947–2953.
92. Falk, R., Domb, A. J., Polacheck, I., (1999). A novel injectable water-soluble amphotericin B arabinogalactan conjugate, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43(8), 1975–1981
93. FAO (1995). Gums, resins and latexes of plant origin. (Non-woodforest products 6). FAO, Rome



94. FAO (1999). Gum arabic. (Food and nutrition paper 52, addendum7). FAO, Rome
95. Fernandes, S. C. M., Sadocco, P., Causio, J., Silvestre, A. J. D., Mondragon, I., Freire, C. S. R., (2014). Antimicrobial pullulan derivative prepared by grafting with 3-aminopropyltrimethoxysilane: Characterization and ability to form transparent films, *Food Hydrocoll.*, 35, 247–252.
96. Fiege, K., Lünsdorf, H., Atarijabarzadeh, S., Mischnick, P., (2012). Cyanoethylation of the glucans dextran and pullulan: Substitution pattern and formation of nanostructures and entrapment of magnetic nanoparticles, *Beilstein J. Org. Chem.*, 8, 551–566.
97. Fjærvik, E., Zotchev, S. B., (2005). Biosynthesis of the polyene macrolide antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67, 436–443.
98. Fleischmann, C., Lievenbrück, M., Ritter, H., (2015). Polymers and dyes: Developments and applications, *Polymers*, 7, 717–746.
99. Flindt, S. A., Phillips, G. O., Williams, P. A., (2005). Studies on acacia exudate gums. Part V. Structural features of *Acacia seyal*, *Food Hydrocoll.*, 19, 687–701.
100. Fontenot, E. J., Lee, Y. H., Matthews, R. D., Zhu, G., Pavlostathis, S. G., (2003). Reductive decolorization of a textile reactive dye bath under methanogenic conditions, *App. Biochem. Biotechnol.*, 109, 207–225.
101. Forabosco, A., Bruno, G., Sparapano, L., Liut, G., Marino, D., Delben, F., (2006). Pullulans produced by strains of *Cryphonectria parasitica* - I. Production and characterization of the exopolysaccharides, *Carbohydr. Polym.*, 63, 535–544.
102. Forss, J., Welander, U., (2011). Biodegradation of azo and anthraquinone dyes in continuous systems, *Int. Biodeterior. Biodegradation*, 65, 227–237.
103. Franken, J., Brandt, B. A., Tai, S. L., Bauer, F. F., (2013). Biosynthesis of levan, a bacterial extracellular polysaccharide, in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *PloS One*, 8(10), e77499.

104. Fraser, C. G., Jennings, H. J., (1971). A glucan from *Tremella mesenterica* NRRL-Y6158, *Can. J. Chem.*, 49, 1804–1807.
105. Freshour, G., Bonin, C. P., Reiter, W. D., Albersheim, P., Darvill, A. G., Hahn, M. G., (2003). Distribution of fucose-containing xyloglucans in cell walls of the *murI* mutant of *Arabidopsis*, *Plant Physiol.*, 131, 1602–1612.
106. G. Dryhurst, Periodate oxidation of diol and other functional groups, Pergamon Press, London, 1966, 116.
107. Gagoś, M., Arczewska, M., (2010). Spectroscopic studies of molecular organization of antibiotic amphotericin B in monolayers and dipalmitoylphosphatidylcholine lipid multibilayers, *Biochim. Biophys. Acta*, 1798, 2124–2130.
108. Ganis, P., Avitabile, G., Mechlinski, W., Schaffner, C. P., (1971). Polyene macrolide antibiotic amphotericin B. Crystal structure of the N-iodoacetyl derivative, *J. Am. Chem. Soc.*, 93(18), 4560–4564.
109. García-Ochoa, F., Santos, V. E., Casas, J. A., Gómez, E., (2000). Xanthan gum: production, recovery, and properties, *Biotechnol. Adv.*, 18, 549–579.
110. Garegg, P., Roberts, E., (1998). Levan derivatives, their preparation, composition and applications including medical and food applications. World Intellectual Property Organization Patent Application No. WO, 98, 03184. Publication number WO1998003184 A1.
111. Ghaly, A. E., Arab, F., Mahmoud, N. S., Higgins, J., (2007). Production of levan by *Bacillus licheniformis* for use as a soil sealant in earthen manure storage structures, *Am. J. Biotechnol. Biochem.*, 3(2), 47–54.
112. Gojgic-Cvijovic, G. D., Milic, J. S., Solevic, T. M., Beskoski, V. P., Ilic, M. V., Djokic, L. S., Narancic, T. M., Vrvic, M. M., (2012). Biodegradation of petroleum sludge and petroleum polluted soil by a bacterial consortium: a laboratory study, *Biodegradation*, 23, 1–14.

113. Gordon, P. F., Gregory, P., (1983). In: Organic chemistry in colour. Berlin, Springer-Verlag.
114. Gounga, M. E., Xu, S. Y., Wang, Z., Yang, W. G., (2008). Effect of whey protein isolate–Pullulan edible coatings on the quality and shelf life of freshly roasted and freeze-dried chinese chestnut, *J. Food Sci.*, 73(4), 155–161.
115. Gref, R., Lück, M., Quellec, P., Marchand, M., Dellacherie, E., Harnisch, S., Blunk, T., Müller, R. H., (2000). ‘Stealth’ corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption, *Colloids Surf., B: Biointerfaces*, 18, 301–313.
116. Grün, C. H., Hochstenbach, F., Humbel, B. M., Verkleij, A. J., Sietsma, J. H., Klis, F. M., Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F. G., (2005). The structure of cell wall  $\alpha$ -glucan from fission yeast, *Glycobiology*, 15(3), 245–257.
117. Gunn, E., Gabbianelli, A., Crooks, R., Shanmuganandamurthy, K., (2009). Derivatized polysaccharide polymer. Google Patents. United States Patent. Patent NO.: US 7,528,100 B2.
118. Gupta, S., Das, P., Singh, S., Akhtar, M., Meena, D., Mandal, S., (2011). Microbial levan, an ideal prebiotic and immunonutrient in aquaculture, *World Aquacult.*, 42(1), 61–66.
119. Hąc-Wydro, K., Dynarowicz-Lątka, P., (2006). Interaction between nystatin and natural membrane lipids in Langmuir monolayers—The role of a phospholipid in the mechanism of polyenes mode of action, *Biophys. Chem.*, 123, 154–161.
120. Hamilton-Miller, J. M. T., (1973). Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics, *Bacteriol. Rev.*, 37(2), 166–196.
121. Han, Y. W., (1990). Microbial levan, *Adv. Appl. Microbiol.*, 35, 171-194.
122. Hartl, L., Gastebois, A., Aïmanianda, V., Latgé, J. P., (2011). Characterization of the GPI-anchored endo  $\beta$ -1,3-glucanase Eng2 of *Aspergillus fumigatus*, *Fungal Genet. Biol.*, 48, 185–191.

123. Hay, I. D., Rehman, Z. U., Ghafoor, A., Rehm, B. H. A., (2010). Bacterial biosynthesis of alginates, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 85, 752–759.
124. Heeres, F. F. Spoelma, H. A. van Doren, K. F. Gotlieb, I. P. Bleeker, R. M. Kellogg, (2000). Synthesis and reduction of 2-nitroalkyl polysaccharide ethers, *Carbohydr. Polym.*, 42, 33–43.
125. Henrissat, B., Deleury, E., Coutinho, P. M., (2002). Glycogen metabolism loss: a common marker of parasitic behaviour in bacteria?, *Trends Genet.*, 18(9), 437–440.
126. Hii, S. L., Tan, J. S., Ling, T. C., Ariff, A. B., (2012). Pullulanase: role in starch hydrolysis and potential industrial applications, *Enzyme Res.*, 1–14.
127. <http://secure.megazyme.com/Azo-Xylan-Birchwood-Powder> (23.7.2015.)
128. [http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?interface=All&term=rbb%20glucan&N=0&focus=product&lang=de&region=DE&cm\\_re=Did%20You%20Mean-\\_rbb%20glucan-\\_RBBR%20glican](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?interface=All&term=rbb%20glucan&N=0&focus=product&lang=de&region=DE&cm_re=Did%20You%20Mean-_rbb%20glucan-_RBBR%20glican) (23.7.2015.)
129. Hu, Y., Walker, S., (2002). Remarkable structural similarities between diverse glycosyltransferases, *Chem. Biol.*, 9, 1287–1296.
130. Idris, O. H. M., Williams, P. A., Phillips, G. O., (1998). Characterisation of gum from *Acacia senegal* trees of different age and location using multidetection gel permeation chromatography, *Food Hydrocoll.*, 12, 379–388.
131. Inthanavong, L., Tian, F., Khodadadi, M., Karboune, S., (2013). Properties of *Geobacillus stearothermophilus* levansucrase as potential biocatalyst for the synthesis of levan and fructooligosaccharides, *Biotechnol. Prog.*, 29(6), 1405–1415.
132. Ishak, M. F., Painter, T. J., (1978). Kinetic evidence for hemiacetal formation during the oxidation of dextran in aqueous periodate, *Carbohydr. Res.*, 64, 189–197.

133. Jakovljević, D., (2001). Struktura i selektivne hemijske transformacije pululana dobijenog mikrobiološkom sintezom pomoću soja *Aureobasidium pullulans* CH-1, Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, 42–43.
134. Jakovljević, D., Vrvić, M. M., Radulović, M., Hranisavljević-Jakovljević, M., (2001). Fine structural analysis of the fungal polysaccharide pullulan elaborated by *Aureobasidium pullulans*, CH-1 strain, *J. Serb. Chem. Soc.*, 66(6), 377–383.
135. Jang, K. H., Song, K. B., Park, B. S., Kim, C. H., Chung, B. H., Choue, R. W., Lee, K. S., Lee, C., Chun, U. H., Rhee, S. K., (2001). Levan production by use of the recombinant levansucrase immobilized on titanium-activated magnetite, *Process Biochem.*, 37, 339–343.
136. Jani, G. K., Shah, D. P., Prajapati, V. D., Jain, V. C., (2009). Gums and mucilages: versatile excipients for pharmaceutical formulations, *Asian J. Pharm. Sci.*, 4(5), 308–322.
137. Jarvis, M. C., Briggs, S. P. H., Knox, J. P., (2003). Intercellular adhesion and cell separation in plants, *Plant Cell Environ.*, 26, 977–989.
138. Jathore, N. R., Bule, M. V., Tilay, A. V., Annapure, U. S., (2012). Microbial levan from *Pseudomonas fluorescens*: Characterization and medium optimization for enhanced production, *Food Sci. Biotechnol.*, 21(4), 1045–1053.
139. Jiang, L., (2010). Optimization of fermentation conditions for pullulan production by *Aureobasidium pullulans* using response surface methodology, *Carbohydr. Polym.*, 79, 414–417.
140. Jiang, L., Wu, S., Kim, J. M., (2011). Effect of different nitrogen sources on activities of UDPG-pyrophosphorylase involved in pullulan synthesis and pullulan production by *Aureobasidium pullulans*, *Carbohydr. Polym.*, 86, 1085–1088.
141. Johnson, M. G., Kiyokawa, H., Tani, S., Koyama, J., Morris-Natschke, S. L., Mauger, A., Bowers-Daines, M. M., Lange, B. C., Lee, K. H., (1997). Antitumor agents—CLXVII. Synthesis and structure-activity correlations of the cytotoxic

- anthraquinone 1,4-bis-(2,3-epoxypropylamino)-9,10-anthracenedione, and of related compounds, *Bioorgan. Med. Chem.*, 5, 1469–1479.
142. Jones, S. A., Jorgensen, M., Chowdhury, F. Z., Rodgers, R., Hartline, J., Leatham, M. P., Struve, C., Krogfelt, K. A., Cohen, P. S., Conway, T., (2008). Glycogen and maltose utilization by *Escherichia coli* O157:H7 in the mouse intestine, *Infect. Immun.*, 76(6), 2531–2540.
143. Joseleau, J. P., Ullmann, G., (1990). Biochemical evidence for the site of formation of gum arabic in *Acacia senegal*, *Phytochemistry*, 29(11), 3401–3405.
144. Ju, X. M., Wang, D. H., Zhang, G. C., Cao, D., Wei, G. Y., (2015). Efficient pullulan production by bioconversion using *Aureobasidium pullulans* as the whole-cell catalyst, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99, 211–220.
145. Kačuráková, M., Wilson, R. H., (2001). Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates, *Carbohydr. Polym.*, 44, 291–303.
146. Kamble, V. A., Jagdale, D. M., Kadam, V. J., (2010). Nanosuspension a novel drug delivery system, *Int. J. Pharm. Biol. Sci.*, 1(4), 352–360.
147. Kandemir, N., Yemenicioglu, A., Mecitoglu, Ç., Elmaci, Z. S., Arslanoglu, A., Göksungur, Y., Baysal, T., (2005). Production of antimicrobial films by incorporation of partially purified lysozyme into biodegradable films of crude exopolysaccharides obtained from *Aureobasidium pullulans* fermentation, *Food Technol. Biotechnol.*, 43(4), 343–350.
148. Kapteyn, J. C., Ende, H. V. D., Klis, F. M., (1999). The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall, *Biochim. Biophys.*, 1426, 373–383.
149. Kato, Y., Matsuo, R., Isogai, A., (2003). Oxidation process of water-soluble starch in TEMPO-mediated system, *Carbohydr. Polym.*, 51, 69–75.
150. Kayser, O., Olbrich, C., Croft, S. L., Kiderlen, A. F., (2003). Formulation and biopharmaceutical issues in the development of drug delivery systems for antiparasitic drugs, *Parasitol. Res.*, 90, 63–70.

151. Keith, J., Wiley, B., Ball, D., Arcidiacono, S., Zorfass, D., Mayer, J., Kaplan, D., (1991). Continuous culture system for production of biopolymer levan using *Erwinia herbicola*, *Biotechnol. Bioeng.*, 38, 557–560.
152. Kekez, B. D., Gojgic-Cvijovic, G. D., Jakovljevic, D. M., Stefanovic Kojic, J. R., Markovic, M. D., Beskoski, V. P., Vrvic, M. M., (2015). High levan production by *Bacillus licheniformis* NS032 using ammonium chloride as the sole nitrogen source, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 175, 3068–3083.
153. Khanzadi, M., Jafari, S. M., Mirzaei, H., Chegini, F. K., Maghsoudlou, Y., Dehnad, D., (2015). Physical and mechanical properties in biodegradable films of whey protein concentrate–pullulan by application of beeswax, *Carbohydr. Polym.*, 118, 24–29.
154. Kikuchi, H., Sakurai, H., Nagura, T., Aritsuka, T., Tomita, F., Yokota, A., (2010). One-pot conversion of levan prepared from *Serratia levanicum* NN to difructoseanhydride IV by *Arthrobacter nicotinovorans* levan fructotransferase, *J. Biosci. Bioeng.*, 109(3), 240–243.
155. Kim, H. Y., Park, S. S., Lim, S. T., (2015). Preparation, characterization and utilization of starch nanoparticles, *Colloids Surf., B*, 126, 607–620.
156. Kim, M. G., Seo, J. W., Song, K. B., Kim, C. H., Chung B. H., Rhee, S. K., (1998). Levan and fructosyl derivatives formation by a recombinant levansucrase from *Rahnella aquatilis*, *Biotechnol. Lett.*, 20(4), 333–336.
157. Kim, U. J., Kuga, S., Wada, M., Okano, T., Kondo, T., (2000). Periodate oxidation of crystalline cellulose, *Biomacromolecules*, 1, 488–492.
158. Kimoto, T., Shibuya, T., Shiobara, S., (1997). Safety studies of a novel starch, pullulan: Chronic toxicity in rats and bacterial mutagenicity, *Food Chem. Toxicol.*, 35, 323–329.
159. Klis, F. M., De Groot, P., Hellingwerf, K., (2001). Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*, *Med. Mycol.*, 39, 1–8.

160. Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K., Brul, S., (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiol. Rev.*, 26, 239–256.
161. Koontz, J. L., Marcy, J. E., (2003). Formation of natamycin:cyclodextrin inclusion complexes and their characterization, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 7106–7110.
162. Korakli, M., Pavlovic, M., Gänzle, M. G., Vogel, R. F., (2003). Exopolysaccharide and kestose production by *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(4), 2073–2079.
163. Küçükaşık, F., Kazak, H., Güney, D., Finore, I., Poli, A., Yenigün, O., Nicolaus B., Öner E. T., (2011). Molasses as fermentation substrate for levan production by *Halomonas sp.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 89(6), 1729–1740.
164. Kumar, D., Saini, N., Pandit, V., Ali, S., (2012). An insight to pullulan: a biopolymer In pharmaceutical approaches, *Int. J. Basic Appl. Sci.*, 1(3), 202–219.
165. Lancelin, J. M., Beau, J. M., (1989). Complete stereostructure of nystatin A1: A proton NMR study, *Tetrahedron Lett.*, 30(34), 4521–4524.
166. Larabi, M., Gulik, A., Dedieu, J. P., Legrand, P., Barratt, G., Cheron, M., (2004). New lipid formulation of amphotericin B: spectral and microscopic analysis, *Biochim. Biophys. Acta*, 1664, 172–181.
167. Latgé, J. P., (2007). The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell, *Mol. Microbiol.*, 66(2), 279–290.
168. Leathers, T. D., (2003). Biotechnological production and applications of pullulan, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 62, 468–473.
169. Lee, K. Y., Mooney, D. J., (2012). Alginate: properties and biomedical applications, *Prog. Polym. Sci.*, 37(1), 106–126.
170. Lee, Y. H., Pavlostathis, S. G., (2004). Decolorization and toxicity of reactive anthraquinone textile dyes under methanogenic conditions, *Water Res.*, 38, 1838–1852.



171. Lemke, A., Kiderlen, F., Kayser, O., (2005). Amphotericin B, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 68, 151–162.
172. Lerouxel, O., Cavalier, D. M., Liepman, A. H., Keegstra, K., (2006). Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides — a complex process, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 9, 621–630.
173. Lewis, D. M., (2009). Colour and Textile Chemistry - a Lucky Career Choice. In Proceedings of the International Conference of American Association of Textile Chemists and Colorists, 1–31.
174. Lewis, E. N., Kalasinsky, V. F., Levin I. W., (1988). Quantitative determination of impurities in polyene antibiotics: Fourier transform Raman spectra of nystatin, amphotericin A, and amphotericin B, *Anal. Chem.*, 60, 2306–2309.
175. Li, H., Schenk, A., Srivastava, A., Zhurina D., Ullrich, M. S., (2006). Thermo-responsive expression and differential secretion of the extracellular enzyme levansucrase in the plant pathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 265, 178–185.
176. Li, H., Yang, J., Hu, X., Liang, J., Fan, Y., Zhang, X., (2011). Superabsorbent polysaccharide hydrogels based on pullulan derivate as antibacterial release wound dressing, *J. Biomed. Mater. Res. A*, 98(1), 31–39.
177. Lim, S., Lee, K. Y., Lee, Y. B., Song, K. B., (2001). Immobilization of levan fructotransferase for the production of difructose anhydride from levan, *Biotechnol. Lett.*, 23(16), 1335–1339.
178. Linde, D., Rodríguez-Colinas, B., Estévez, M., Poveda, A., Plou, F. J., Fernández Lobato, M., (2012). Analysis of neo fructooligosaccharides production mediated by the extracellular  $\beta$ -fructofuranosidase from *Xanthophyllomyces dendrorhous*, *Biores. Technol.*, 109(0), 123–130.
179. Ling, N. X.-Y., Pettolino, F., Liao, M.-L., Bacic, A., (2009). Preparation of a new chromogenic substrate to assay for  $\beta$ -galactanases that hydrolyse type II arabino-3,6-galactans, *Carbohydr. Res.*, 344, 1941–1946.

180. Linke, H. A. B., Mechlinski, W., Schaffner, C. P., (1974). Production of amphotericin B-<sup>14</sup>C by *Streptomyces nodosus* fermentation, and preparation of the amphotericin B-<sup>14</sup>C-methyl-ester, *J. Antibiot.*, 27(3), 155–160.
181. Liu, C., Lu, J., Lu, L., Liu, Y., Wang, F., Xiao, M., (2010a). Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1, *Biores. Technol.*, 101, 5528–5533.
182. Liu, J. H.-Y., Brameld, K. A., Brant D. A., Goddard W. A., (2002). Conformational analysis of aqueous pullulan oligomers: an effective computational approach, *Polymer*, 43, 509–516.
183. Liu, J., Luo, J., Ye, H., Sun, Y., Lu, Z., Zeng, X., (2009). Production, characterization and antioxidant activities in vitro of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3, *Carbohydr. Polym.*, 78, 275–281.
184. Liu, J., Luo, J., Ye, H., Sun, Y., Lu, Z., Zeng, X., (2010b). Medium optimization and structural characterization of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3, *Carbohydr. Polym.*, 79, 206–213.
185. Liu, J., Luo, J., Ye, H., Zeng, X., (2012). Preparation, antioxidant and antitumor activities in vitro of different derivatives of levan from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3, *Food Chem. Toxicol.*, 50, 767–772.
186. López-Franco, Y. L., Córdova-Moreno, R. E., Goycoolea, F. M., Valdez, M. A., Juárez-Onofre, J., Lizardi-Mendoza, J., (2012). Classification and physicochemical characterization of mesquite gum (*Prosopis spp.*), *Food Hydrocoll.*, 26, 159–166.
187. Ma, F., Bell, A. E., Davis, F. J., Chai, Y., (2015). Effects of high hydrostatic pressure and chemical reduction on the emulsification properties of gum arabic, *Food Chem.*, 173, 569–576.

188. Ma, Z.-C., Fu, W.-J., Liu, G.-L., Wang, Z.-P., Chi, Z.-M., (2014). High-level pullulan production by *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenium* P16 isolated from mangrove system, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98, 4865–4873.
189. Macedo, M. G., Lacroix, C., Gardner, N. J., Champagne, C. P., (2002). Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate, *Int. Dairy J.*, 12, 419–426.
190. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., Clark, D. P., (2012). In: Brock Biology of Microorganisms, Pearson Education, Inc., Glenview, Illinois.
191. Maia, J., Carvalho, R. A., Coelho, J. F. J., Simões, P. N., Gi, M. H., (2011). Insight on the periodate oxidation of dextran and its structural vicissitudes, *Polymer*, 52, 258–265.
192. Maia, J., Ferreira, L., Carvalho, R., Ramos, M. A., Gil, M. H., (2005). Synthesis and characterization of new injectable and degradable dextran-based hydrogels, *Polymer*, 46, 9604–9614.
193. Manandhar, S., Vidhate, S., D'Souza, N., (2009). Water soluble levan polysaccharide biopolymer electrospun fibers, *Carbohydr. Polym.*, 78, 794–798.
194. Mariya Divya, J., Sugumaran, K. R., (2015). Fermentation parameters and condition affecting levan production and its applications, *J. Chem. Pharm. Res.*, 7(2), 861–865.
195. Marroquí, S., Zorreguieta, A., Santamaria, C., Temprano, F., Soberon, M., Megias, M., Downie, J. A., (2001). Enhanced symbiotic performance by *Rhizobium tropici* glycogen synthase mutants, *J. Bacteriol.*, 183(3), 854–864.
196. Mathew, B. P., Nath, M., (2009). Recent approaches to antifungal therapy for invasive mycoses, *Chem. Med. Chem.*, 4, 310–323.
197. Mathlouthi, M., Koenig, J. L., (1987). Vibrational spectra of carbohydrates. In: Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Eds: Tipson, R. S., Horton, D. Academic Press, Inc., Orlando, Florida, 44, 7–89.

198. May, T., Mackie, R. I., Fahey, G. C., Cremin, J. C., Garleb, K. A., (1994). Effect of fiber source on short – chain fatty acid production and on the growth and toxin production by *Clostridium difficile*, *Scand. J. Gastroenterol.*, 19, 916–922.
199. McCleary, B. V., Mangan, D., McKie, V., Cornaggia, C., Ivory, R., Rooney, E., (2014). Colourimetric and fluorometric substrates for measurement of pullulanase activity, *Carbohydr. Res.*, 393, 60–69.
200. McCleary, B. V., Shameer, I., (1987). Assay of malt  $\beta$ -glucanase using azo-barley glucan: An improved precipitant, *J. Inst. Brew.*, 93, 87–90.
201. McGarvey, G. J., Mathys, J. A., Wilson, K. J., (1996). Synthesis of amphotericin B. A convergent strategy to the polyol segment of the heptaene macrolide antibiotics, *J. Org. Chem.*, 61, 5704–5705.
202. McIntosh, M., Stone, B. A., Stanisich, V., (2005). Curdlan and other bacterial (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucans, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 68, 163–173.
203. McMeechan, A., Lovell, M. A. Cogan, T. A., Marston, K. L., Humphrey, T. J., Barrow, P. A., (2005). Glycogen production by different *Salmonella enterica* serotypes: contribution of functional glgC to virulence, intestinal colonization and environmental survival, *Microbiology*, 151, 3969–3977.
204. McNeil, B., Kristiansen, B., (1990). Temperature effects on polysaccharide formation by *Aureobasidium pullulans* in stirred tanks, *Enzyme Microb. Technol.*, 12, 521–526.
205. Michel, C., Kravtchenko, T. P., David, A., Gueneau, S., Kozłowski, F., Cherbut, C., (1998). *In vitro* prebiotic effects of *Acacia gums* onto the human intestinal microbiota depends on both botanical origin and environmental pH, *Anaerobe*, 4, 257–266.
206. Milhaud, J., Ponsinet, V., Takashi, M., Michels, B., (2002). Interactions of the drug amphotericin B with phospholipid membranes containing or not ergosterol: new insight into the role of ergosterol, *Biochim. Biophys. Acta*, 1558(2), 95–108.

207. Mirjalili, M., Nazarpour, K., Karimi, L., (2011). Eco-friendly dyeing of wool using natural dye from weld as co-partner with synthetic dye, *J. Clean. Prod.*, 19, 1045–1051.
208. Miyamoto, K., Kotake, T., Boncela, A. J., Saniewski, M., Ueda, J., (2015). Hormonal regulation of gummosis and composition of gums from bulbs of hyacinth (*Hyacinthus orientalis*), *J. Plant Physiol.*, 174, 1–4.
209. Mohr, J., Johnson, M., Cooper, T., Lewis, J. S., Ostrosky-Zeichner, L., (2008). Current Options in Antifungal Pharmacotherapy, *Pharmacotherapy*, 28(5), 614–645.
210. Molinari, M. L., Boiardi, J. L., (2013). Levans production by *Gluconacetobacter dia-zotrophicus*, *Electron. J. Biotechnol.*, 16(3).
211. Montero, M., Eydallin, G., Viale, A. M., Almagro, G., Munoz, F. J., Rahimpour, M., Sesma, M. T., Baroja-Fernandez, E., Pozueta-Romero, J., (2009). *Escherichia coli* glycogen metabolism is controlled by the PhoP-PhoQ regulatory system at submillimolar environmental  $Mg^{2+}$  concentrations, and is highly interconnected with a wide variety of cellular processes, *Biochem. J.*, 424, 129–141.
212. Moosavi-Nasab, M., Layegh, B., Aminlari, L., Hashemi, M. B., (2010). Microbial production of levan using date syrup and investigation of its properties, *World Acad. Sci. Eng. Technol.*, 44, 1248–1254.
213. Morales-Arrieta, S., Rodríguez, M. E., Segovia, L., López-Munguía, A., Olvera-Carranza, C., (2006). Identification and functional characterization of levS, a gene encoding for a levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F, *Gene*, 376, 59–67.
214. Moribe, K., Maruyama, K., (2002). Pharmaceutical design of the liposomal antimicrobial agents for infectious disease, *Curr. Pharm. Des.*, 8, 441–454.
215. Moribe, K., Maruyama, K., Iwatsuru, M., (2000). Spectroscopic investigation of the molecular state of nystatin encapsulated in liposomes, *Int. J. Pharm.*, 201, 37–49.

216. Mula, S., Ray, A. K., Banerjee, M., Chaudhuri, T., Dasgupta, K., Chattopadhyay, S., (2008). Design and development of a new pyrromethene dye with improved photostability and lasing efficiency: Theoretical rationalization of photophysical and photochemical properties, *J. Org. Chem.*, 73, 2146–2154.
217. Na, K., Lee, T. B., Park, K.-H., Shin, E.-K., Lee, Y.-B., Choi, H.-K., (2003). Self-assembled nanoparticles of hydrophobically-modified polysaccharide bearing vitamin H as a targeted anti-cancer drug delivery system, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 18, 165–173.
218. Nedal, A., Sletta, H., Brautaset, T., Borgos, S. E. F., Sekurova, O. N., Ellingsen, T. E., Zotchev, S. B., (2007). Analysis of the mycosamine biosynthesis and attachment genes in the nystatin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces noursei* ATCC 11455, *App. Environ. Microbiol.*, 73(22), 7400–7407.
219. Neuhaus, F. C., Baddiley, J., (2003). A continuum of anionic charge: Structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in Gram-positive bacteria, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67(4), 686–723.
220. Nguyen, Q. D., Rezessy-Szabo, J. M., Bhat, M. K., Hoschke, A., (2005). Purification and some properties of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* IMI303386, *Process Biochem.*, 40, 2461–2466.
221. Nicoletti, S., Seifert, K., Gilbert, I. H., (2009). N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide–amphotericin B (HPMA–AmB) copolymer conjugates as antileishmanial agents, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 33, 441–448.
222. Nie, S.-P., Wang, C., Cui, S. W., Wang, Q., Xie, M.-Y., Phillips, G. O., (2013a). A further amendment to the classical core structure of gum arabic (*Acacia senegal*), *Food Hydrocolloids*, 31, 42–48.
223. Nie, S.-P., Wang, C., Cui, S. W., Wang, Q., Xie, M.-Y., Phillips, G. O., (2013b). The core carbohydrate structure of *Acacia seyal* var. *seyal* (Gum arabic), *Food Hydrocoll.*, 32, 221–227.

224. Nishi, K. K., Antony, M., Mohanan, P. V., Anilkumar, T. V., Loiseau, P. M., Jayakrishnan, A., (2007). Amphotericin B-gum arabic conjugates: synthesis, toxicity, bioavailability, and activities against *Leishmania* and fungi, *Pharm. Res.*, 24(5), 971–980.
225. Nishi, K. K., Jayakrishnan, A., (2004). Preparation and *in vitro* evaluation of primaquine-conjugated gum arabic microspheres, *Biomacromolecules*, 5, 1489–1495.
226. Nishikawa, T., Akiyoshi, K., Sunamoto, J., (1994). Supramolecular assembly between nanoparticles of hydrophobized polysaccharide and soluble protein complexation between the self-aggregate of cholesterol-bearing pullulan and  $\alpha$ -chymotrypsin, *Macromolecules*, 27, 7654–7659.
227. Offner, F., Krcmery, V., Boogaerts, M., Doyen, C., Engelhard, D., Ribaud, P., Cordonnier, C., de Pauw, B., Durrant, S., Marie, J.-P., Moreau, P., Guiot, H., Samonis, G., Sylvester, R., Herbrecht, R., (2004). Liposomal nystatin in patients with invasive aspergillosis refractory to or intolerant of amphotericin B, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48(12), 4808–4812.
228. Oliva, E. M., Cirelli, A. F., De Lederkremer, R. M., (1986). Characterization of a pullulan in *Cyttaria darwinii*, *Carbohydr. Res.*, 158, 262–267.
229. Olmo, S., Gotti, R., Naldi, M., Andrisano, V., Calonghi, N., Parolin, C., Masotti, L., Cavrini, V., (2008). Analysis of human histone H4 by capillary electrophoresis in a pullulan-coated capillary, LC-ESI-MS and MALDI-TOF-MS, *Anal. Bioanal. Chem.*, 390, 1881–1888.
230. O'Neill, M. A., Ishii, T., Albersheim, P., Darvill, A. G., (2004). Rhamnogalacturonan II: Structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 109–139.
231. Orr, D., Zheng, W., Campbell, B. S., McDougall, B. M., Seviour, R. J., (2009). Culture conditions affect the chemical composition of the exopolysaccharide synthesized by the fungus *Aureobasidium pullulans*, *J. App. Microbiol.*, 107, 691–698.

232. Otero, A., Vincenzini, M., (2003). Extracellular polysaccharide synthesis by *Nostoc* strains as affected by N source and light intensity, *J. Biotechnol.*, 102, 143–152.
233. Ozimek, L. K., Euverink, G. J. W., van der Maarel, M. J. E. C., Dijkhuizen, L., (2005). Mutational analysis of the role of calcium ions in the *Lactobacillus reuteri* strain 121 fructosyltransferase (levansucrase and inulosucrase) enzymes, *FEBS Lett.*, 579, 1124–1128.
234. Ozturk, S., Aslim, B., Suludere, Z., (2009). Evaluation of chromium (VI) removal behaviour by two isolates of *Synechocystis* sp. in terms of exopolysaccharide (EPS) production and monomer composition, *Biores. Technol.*, 100, 5588–5593.
235. Palackal, N., Brennan, Y., Callen, W. N., Dupree, P., Frey, G., Goubet, F., Hazlewood, G. P., Healey, S., Kang, Y. E., Kretz, K. A., Lee, E., Tan, X., Tomlinson, G. L., Verruto, J., Wong, V. W. K., Mathur, E. J., Short, J. M., Robertson, D. E., Steer, B. A., (2004). An evolutionary route to xylanase process fitness, *Protein Sci.*, 13, 494–503.
236. Palmieri, G., Cennamo, G., Sannia, G., (2005). Remazol Brilliant Blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system, *Enzyme Microb. Technol.*, 36, 17–24.
237. Pan, H., Jiang, B., Chen, J., Jin, Z., (2014). Assessment of the physical, mechanical, and moisture-retention properties of pullulan-based ternary co-blended films, *Carbohydr. Polym.*, 112, 94–101.
238. Pan, Y.-J., Fang, H.-C., Yang, H.-C., Lin, T.-L., Hsieh, P.-F., Tsai, F.-C., Keynan, Y., Wang, J.-T., (2008). Capsular polysaccharide synthesis regions in *Klebsiella pneumoniae* serotype K57 and a new capsular serotype, *J. Clin. Microbiol.*, 46(7), 2231–2240.
239. Parrado, J., Rodriguez-Morgado, B., Tejada, M., Hernandez, T., Garcia, C., (2014). Proteomic analysis of enzyme production by *Bacillus licheniformis* using different feather wastes as the sole fermentation media, *Enzyme Microb. Technol.*, 57, 1–7.



240. Patindol, J. A., Siebenmorgen, T. J., Wang, Y.-J., (2015). Impact of environmental factors on rice starch structure: A review, *Starch/Stärke*, 67, 42–54.
241. Pfaller, M. A., Bale, M., Buschelman, B., Lancaster, M., Espinel-Ingroff, A., Rex, J. H., Rinaldi, M. G., Cooper, C. R., McGinnis, M. R., (1995). Quality control guidelines for national committee for clinical laboratory standards recommended broth macrodilution testing of amphotericin B, Fluconazole, and Flucytosine, *J. Clin. Microbiol.*, 33(5), 1104–1107.
242. Pfaller, M. A., Pappas, P. G., Wingard, J. R., (2006). Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends, *Clin. Infect. Dis.*, 43, S3–14.
243. Pham, T. H., Webb, J. S., Rehm, B. H. A., (2004). The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation, *Microbiology*, 150, 3405–3413.
244. Phillips, A. O., Phillips, G. O., (2011). Biofunctional behaviour and health benefits of a specific gum arabic, *Food Hydrocoll.*, 25, 165–169.
245. Phillips, G. O., Ogasawara, T., Ushida, K., (2008). The regulatory and scientific approach to defining gum arabic (*Acacia senegal* and *Acacia seyal*) as a dietary fibre, *Food Hydrocoll.*, 22, 24–35.
246. Poli, A., Kazak, H., Gürleyendag, B., Tommonaro, G., Pieretti, G., Öner, E. T., Nicolaus B., (2009). High level synthesis of levan by a novel *Halomonas species* growing on undefined media, *Carbohydr. Polym.*, 78(4), 651–657.
247. Prajapati, V. D., Jani, G. K., Khanda, S. M., (2013b). Pullulan: An exopolysaccharide and its various applications, *Carbohydr. Polym.*, 95, 540–549.
248. Prajapati, V. D., Jani, G. K., Moradiya, N. G., Randeria, N. P., (2013a). Pharmaceutical applications of various natural gums, mucilages and their modified forms, *Carbohydr. Polym.*, 92, 1685–1699.
249. Radulovic, M. Đ., Cvetkovic, O. G., Nikolic, S. D., Đordevic, D. S., Jakovljevic, D. M., Vrvic, M. M., (2008). Simultaneous production of pullulan and

- biosorption of metals by *Aureobasidium pullulans* strain CH-1 on peat hydrolysate, *Biores. Technol.*, 99, 6673–6677.
250. Raetz, C. R. H., Whitfield, C., (2002). Lipopolysaccharide endotoxins, *Annu. Rev. Biochem.*, 71, 635–700.
251. Raphaelides, S. N., Georgiadis, N., (2006). Effect of fatty acids on the rheological behaviour of maize starch dispersions during heating, *Carbohydr. Polym.*, 65, 81–92.
252. Ravella, S. R., Quinones, T. S., Retter, A., Heiermann, M., Amon, T., Hobbs, P. J., (2010). Extracellular polysaccharide (EPS) production by a novel strain of yeast-like fungus *Aureobasidium pullulans*, *Carbohydr. Polym.*, 82, 728–732.
253. Ravi, P. R., Vats, R., Balija, J., Adapa, S. P. N., Aditya, N., (2014). Modified pullulan nanoparticles for oral delivery of lopinavir: Formulation and pharmacokinetic evaluation, *Carbohydr. Polym.*, 110, 320–328.
254. Rehm, B. H. A., (2010). Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications, applied and industrial microbiology, *Nature Rev. Microbiol.*, 8, 578–592.
255. Rehm, B. H. A., Valla, S., (1997). Bacterial alginates: biosynthesis and applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48, 281–288.
256. Reis, R. A., Tischer, C. A., Gorrin, P. A. J., Iacomini, M., (2002). A new pullulan and a branched (1→3)-, (1→6)-linked  $\beta$ -glucan from the lichenised ascomycete *Teloschistes flavicans*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 210(1), 1–5.
257. Remminghorst, U., Rehm, B. H. A., (2006). Bacterial alginates: from biosynthesis to applications, *Biotechnol. Lett.*, 28, 1701–1712.
258. Ren, J., Cui, Y., Zhang, F., Cui, H., Ni, X., Chen, F., Li, L., Xia, H., (2014). Enhancement of nystatin production by redirecting precursor fluxes after disruption of the tetramycin gene from *Streptomyces ahygroscopicus*, *Microbiol. Res.*, 169, 602–608.

259. Rey, M. W, Ramaiya, P., Nelson, B. A., Brody-Karpin, S. D., Zaretsky, E. J., Tang, M., de Leon, A. L., Xiang, H., Gusti, V., Clausen, I. G., Olsen, P. B., Rasmussen, M. D., Andersen, J. T., Jørgensen, P. L., Larsen, T. S., Sorokin, A., Bolotin, A., Lapidus, A., Galleron, N., Ehrlich, S. D., Berka, R. M., (2004). Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species, *Genome Biol.*, 5, R77.
260. Rinnert, H., Maigret, B., (1981). Conformational analysis of amphotericin B I. Isolated molecule, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 101(3), 853–860.
261. Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., Nigam, P., (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative, *Biores. Technol.*, 77, 247–255.
262. Ronen, M., Guterman, H., Shabtai, Y., (2002). Monitoring and control of pullulan production using vision sensor, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 51, 243–249.
263. Ruijsenaars, H. J., Hartmans S., (2001). Plate screening methods for the detection of polysaccharase – producing microorganisms, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55, 143–149.
264. Ryder, C., Byrd, M., Wozniak, D. J., (2007). Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development, *Curr. Opin. Microbiol.*, 10(6), 644–648.
265. Sabra, R., Branch, R. A., (1991). Mechanisms of amphotericin B-induced decrease in glomerular filtration rate in rats, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 35(12), 2509–2514.
266. Sambou, T., Dinadayala, P., Stadthagen, G., Barilone, N., Bordat, Y., Constant, P., Levillain, F., Neyrolles, O., Gicquel, B., Lemassu, A., Daffé, M., Jackson, M., (2008). Capsular glucan and intracellular glycogen of *Mycobacterium tuberculosis*: Biosynthesis and impact on the persistence in mice, *Mol. Microbiol.*, 70(3), 762–774.

267. San Juan, A., Bala, M., Hlawaty, H., Portes, P., Vranck, R., Feldman, L. J., Letourneur, D., (2009). Development of a functionalized polymer for stent coating in the arterial delivery of small interfering RNA, *Biomacromolecules*, 10, 3074–3080.
268. Sanislav, A., Dumitru, F., Stănescu, M. D., (2013). Investigation of two textile anthraquinone dyes purity, *UPB Sci. Bull. B*, 75(4), 91–100.
269. Santangelo, R., Paderu, P., Delmas, G., Chen, Z.-W., Mannino, R., Zarif, L., Perlin, D. S., (2000). Efficacy of oral cochleate-amphotericin B in a mouse model of systemic candidiasis, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44(9), 2356–2360.
270. Sarwat, F., Qader, S. A. U., Aman, A., Ahmed, N., (2008). Production & characterization of a unique dextran from an indigenous *Leuconostoc mesenteroides* CMG713, *Int. J. Biol. Sci.*, 4(6), 379–386.
271. Sawaya, P., Briggs, J. P., Schnermann, J., (1995). Amphotericin B nephrotoxicity: the adverse consequences of altered membrane properties, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 6, 154–164.
272. Sawaya, P., Weihprecht, H., Campbell, W. R., Lorenz, J. N., Webb, R. C., Briggs, J. P., Schnermann, J., (1991). Direct vasoconstriction as a possible cause for amphotericin B-induced nephrotoxicity in rats, *J. Clin. Invest.*, 87, 2097–2107.
273. Schirmer, M., Höchstötter, A., Jekle, M., Arendt, E., Becker, T., (2013). Physicochemical and morphological characterization of different starches with variable amylose/amylopectin ratio, *Food Hydrocoll.*, 32, 52–63.
274. Schwarz, W. M., (1999). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. II Drug incorporation and physicochemical characterization, *J. Microencapsulation*, 16(2), 205–213.
275. Sedlak, M., Buchta, V., Kubicova, L., Šimunek, P., Holčapek, M., Kašparova, P., (2001). Synthesis and characterisation of a new amphotericin B–methoxypoly(ethylene glycol) conjugate, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11, 2833–2835.

276. Seferoğlu, Z., Ertan, N., Hökelek, T., Şahin, E., (2008). The synthesis, spectroscopic properties and crystal structure of novel, bis-hetarylazo disperse dyes, *Dyes Pigments*, 77, 614–625.
277. Seo, H. P., Son, C. W., Chung, C. H., Jung, D., Kim, S. K., Gross, R. A., Kaplan, D. L., Lee, J. W., (2004). Production of high molecular weight pullulan by *Aureobasidium pullulans* HP-2001 with soybean pomace as a nitrogen source, *Biores. Technol.*, 95, 292–299.
278. Sezer, A. D., Kazak, H., Öner, E. T., Akbuga, J., (2011). Levan-based nanocarrier system for peptide and protein drug delivery: Optimization and influence of experimental parameters on the nanoparticle characteristics, *Carbohydr. Polym.*, 84, 358–363.
279. Shih, L., Chen, L.-D., Wang, T.-C., Wu, J.-Y., Liaw, K.-S., (2010). Tandem production of levan and ethanol by microbial fermentation, *Green Chem.*, 12(7), 1242–1247.
280. Shingel, K. I., (2002). Determination of structural peculiarities of dextran, pullulan and  $\gamma$ -irradiated pullulan by Fourier-transform IR spectroscopy, *Carbohydr. Res.*, 337, 1445–1451.
281. Shingel, K. I., (2004). Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan, *Carbohydr. Res.*, 339, 447–460.
282. Shingel, K. I., Petrov, P. T., (2002). Behavior of  $\gamma$ -ray-irradiated pullulan in aqueous solutions of cationic (cetyltrimethylammonium hydroxide) and anionic (sodium dodecyl sulfate) surfactants, *Colloid Polym. Sci.*, 280, 176–182.
283. Siddig, N. E., Osman, M. E., Al-Assaf, S., Phillips, G. O., Williams, P. A., (2005). Studies on acacia exudate gums, part IV. Distribution of molecular components in *Acacia seyal* in relation to *Acacia senegal*, *Food Hydrocoll.*, 19, 679–686.

284. Silbir, S., Dagbagli, S., Yegin, S., Baysal, T., Goksungur, Y., (2014). Levan production by *Zymomonas mobilis* in batch and continuous fermentation systems, *Carbohydr. Polym.*, 99(0), 454–461.
285. Silljé, H. H. W., Paalman, J. W. G., Ter Schure, E. G., Olsthoorn, S. Q. B., Verkleij, A. J., Boonstra, J., Verrips, C. T., (1999). Function of trehalose and glycogen in cell cycle progression and cell viability in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Bacteriol.*, 181(2), 396–400.
286. Sima, F., Mutlu, E. C., Eroglu, M. S., Sima, L. E., Serban, N., Ristoscu, C., Petrescu, S. M., Oner, E. T., Mihailescu, I. N., (2011). Levan nanostructured thin films by MAPLE assembling, *Biomacromolecules*, 12, 2251–2256.
287. Simon, L., Caye-Vaugie, C., Bouchonneau, M., (1993). Relation between pullulan production, morphological state and growth conditions in *Aureobasidium pullulans*: new observations, *J. Gen. Microbiol.*, 139, 979–985.
288. Sims, I. M., Frese, S. A., Walter, J., Loach, D., Wilson, M., Appleyard, K., Eason, J., Livingston, M., Baird, M., Cook, G., Tannock, G.W., (2011). Structure and functions of exopolysaccharide produced by gut commensal *Lactobacillus reuteri* 100-23, *ISME J.*, 5(7), 1115–1124.
289. Sims, I. M., Furneaux, R. H., (2003). Structure of the exudate gum from *Meryta sinclairii*, *Carbohydr. Polym.*, 52, 423–431.
290. Singh, N., Singh, J., Kaur, L., Sodhi, N. S., Gill, B. S., (2003). Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources, *Food Chem.*, 81, 219–231.
291. Singh, R. S., Kaur, N., Kennedy, J. F., (2015). Pullulan and pullulan derivatives as promising biomolecules for drug and gene targeting, *Carbohydr. Polym.*, 123, 190–207.
292. Singh, R. S., Saini, G. K., Kennedy, J. F., (2008). Pullulan: Microbial sources, production and applications, *Carbohydr. Polym.*, 73, 515–531.

293. Singh, R. S., Saini, G. K., Kennedy, J. F., (2009). Downstream processing and characterization of pullulan from a novel colour variant strain of *Aureobasidium pullulans* FB-1, *Carbohydr. Polym.*, 78, 89–94.
294. Singh, R. S., Saini, G. K., Kennedy, J. F., (2010a). Covalent immobilization and thermodynamic characterization of pullulanase for the hydrolysis of pullulan in batch system, *Carbohydr. Polym.*, 81, 252–259.
295. Singh, R. S., Saini, G. K., Kennedy, J. F., (2010b). Maltotriose syrup preparation from pullulan using pullulanase, *Carbohydr. Polym.*, 80, 401–407.
296. Singh, R. S., Saini, G. K., Kennedy, J. F., (2011). Continuous hydrolysis of pullulan using covalently immobilized pullulanase in a packed bed reactor, *Carbohydr. Polym.*, 83, 672–675.
297. Sletta, H., Borgos, S. E. F., Bruheim, P., Sekurova, O. N., Grasdalen, H., Aune, R., Ellingsen, T. E., Zotchev, S. B., (2005). Nystatin biosynthesis and transport: *nysH* and *nysG* genes encoding a putative ABC transporter system in *Streptomyces noursei* ATCC 11455 are required for efficient conversion of 10-deoxynystatin to nystatin, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49(11), 4576–4583.
298. Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredez, A., Persson, S., Raab, T., Vorwerk, S., Youngs, H., (2004). Toward a systems approach to understanding plant cell walls, *Science*, 306, 2206–2211.
299. Sowinski, P., Pawlak, J., Borowski, E., (1992). <sup>1</sup>H NMR model studies of amphotericin B: comparison of X-Ray and NMR stereochemical data, *Magn. Reson. Chem.*, 30, 275–279.
300. Specht, C. A., Liu, Y., Robbins, P. W., Bulawa, C. E., Iartchouk, N., Winter, K. R., Riggle, P. J., Rhodes, J. C., Dodge, C. L., Culp, D. W., Borgia, P. T., (1996). The *chsD* and *chsE* genes of *Aspergillus nidulans* and their roles in chitin synthesis, *Fungal Genet. Biol.*, 20, 153–167.

301. Srikanth, R., Reddy, C. H. S. S., Siddartha, S. G., Ramaiah, M. J., Uppuluri, K. B., (2015). Review on production, characterization and applications of microbial levan, *Carbohydr. Polym.*, 120, 102–114.
302. Stefanović, J., Jakovljevic, D., Gojgic-Cvijovic, G., Lazic, M., Vrvic, M., (2013). Synthesis, characterization, and antifungal activity of nystatin – gum Arabic conjugates, *J. Appl. Polym. Sci.*, 127(6), 4736–4743.
303. Steigedal, M., Sletta, H., Moreno, S., Mærk, M., Christensen, B. E., Bjerkan, T., Ellingsen, T. E., Espin, G., Ertesvåg, H., Valla, S., (2008). The *Azotobacter vinelandii* AlgE mannuronan C-5-epimerase family is essential for the *in vivo* control of alginate monomer composition and for functional cyst formation, *Environ. Microbiol.*, 10(7), 1760–1770.
304. Stevens, D. A., (1994). Overview of amphotericin B colloidal dispersion (Amphocil), *J. Infect.*, 28(1), 45–49.
305. Stoodley, R., Wasan, K. M., Bizzotto, D., (2007). Fluorescence of amphotericin B-deoxycholate (Fungizone) monomers and aggregates and the effect of heat-treatment, *Langmuir*, 23, 8718–8725.
306. Suginoshita, Y., Tabata, Y., Matsumura, T., Toda, Y., Nabeshima, M., Moriyasu, F., Ikada, Y., Chiba, T., (2002). Liver targeting of human interferon- $\beta$  with pullulan based on metal coordination, *J. Control. Release*, 83, 75–88.
307. Survase, S. A., Saudagar, P. S., Singhal, R. S., (2006). Production of scleroglucan from *Sclerotium rolfsii* MTCC 2156, *Biores. Technol.*, 97, 989–993.
308. Suteu, D., Zaharia, C., Malutan, T., (2011). Biosorbents based on lignin used in biosorption processes from wastewater treatment: A review. In: *Lignin: Properties and Applications in Biotechnology and Bioenergy*, Ed: Ryan J. Paterson. Nova Science Publishers, New York, USA, 279–305.
309. Tamokou, J. D., Mpetga, D. J. S., Lunga, P. K., Tene, M., Tane, P., Kuate, J. R., (2012). Antioxidant and antimicrobial activities of ethyl acetate extract, fractions



- and compounds from stem bark of *Albizia adianthifolia* (Mimosoideae), *BMC Complement. Altern. Med.*, 12(99), 1–10.
310. Tan, L., Qiu, F., Lamport, D. T. A., Kieliszewski, M. J., (2004). Structure of a hydroxyproline (Hyp)-arabinogalactan polysaccharide from repetitive Ala-Hyp expressed in transgenic *Nicotiana tabacum*, *J. Biol. Chem.*, 279(13), 13156–13165.
311. Tan, L., Showalter, A. M., Egelund, J., Hernandez-Sanchez, A., Doblin, M. S., Bacic, A., (2012). Arabinogalactan – proteins and the research challenges for these enigmatic plant cell surface proteoglycans, *Front. Plant Sci.*, 3, 1–10.
312. Ten, L. N., Im, W.-T., Kim, M.-K., Kang, M. S., Lee, S.-T., (2004). Development of a plate technique for screening of polysaccharide-degrading microorganisms by using a mixture of insoluble chromogenic substrates, *J. Microbiol. Methods*, 56, 375–382.
313. Tevyashova, A. N., Olsufyeva, E. N., Preobrazhenskaya, M. N., Klyosov, A. A., Zomer, E., Platt, D., (2007). New conjugates of antitumor antibiotic doxorubicin with water-soluble galactomannan: synthesis and biological activity, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 33(1), 139–145.
314. Thompson, D. B., (2000). On the non-random nature of amylopectin branching, *Carbohydr. Polym.*, 43, 223–239.
315. Umezawa, H. (1978). In: Index of Antibiotics from Actinomycetes, Vol. 2, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan, 474.
316. Vamadevan, V., Bertoft, E., (2015). Structure-function relationships of starch components, *Starch/Stärke*, 67, 55–68.
317. van Hijum, S. A. F. T., Szalowska, E., van der Maarel, M. J. E. C., Dijkhuizen, L., (2004). Biochemical and molecular characterization of a levansucrase from *Lactobacillus reuteri*, *Microbiology*, 150, 621–630.
318. Velázquez-Hernández, M. L., Baizabal-Aguirre, V. M., Bravo-Patino, A., Cajero-Juarez, M., Chavez-Moctezuma, M. P., Valdez-Alarcon, J. J., (2009). Microbial

- fructosyltransferases and the role of fructans, *J. Appl. Microbiol.*, 106, 1763–1778.
319. Verbeken, D., Dierck, S., Dewettinck, K., (2003). Exudate gums: occurrence, production, and applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 63, 10–21.
320. Vieira, E. F. S., Cestari, A. R., Airoldi, C., Loh, W., (2008). Polysaccharide - based hydrogels: preparation, characterization, and drug interaction behaviour, *Biomacromolecules*, 9, 1195–1199.
321. Vijayendra, S. V. N., Bansal, D., Prasad, M. S., Nand, K., (2001). Jaggery: A novel substrate for pullulan production by *Aureobasidium pullulans* CFR-77, *Process Biochem.*, 37, 359–364.
322. Vincken, J.-P., Schols, H. A., Oomen, R. J. F. J., McCann, M. C., Ulvskov, P., Voragen, A. G. J., Visser, R. G. F., (2003). If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture, *Plant Physiol.*, 132(4), 1781–1789.
323. Vollmer, W., Blanot, D., de Pedro, M. A., (2008). Peptidoglycan structure and architecture, *FEMS Microbiol. Rev.*, 32, 149–167.
324. Vorwerk, S., Somerville, S., Somerville, C., (2004). The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance, *Trends Plant Sci.*, 9(4), 203–209.
325. Walsh, T. J., Finberg, R. W., Arndt, C., Hiemenz, J., Schwartz, C., Bodensteiner, D., Pappas, P., Seibel, N., Greenberg, R. N., Dummer, S., Schuster, M., Holcenberg, J. S., (1999). Liposomal amphotericin B for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia, *N. Engl. J. Med.*, 11, 764–771.
326. Wang, Q., Burchard, W., Cui, S. W., Huang, X., Phillips, G. O., (2008). Solution properties of conventional gum arabic and a matured gum arabic (*Acacia* (sen) SUPER GUM), *Biomacromolecules*, 9, 1163–1169.

327. Wang, X.-D., Rakshit, S. K., (2000). Iso-oligosaccharide production by multiple forms of transferase enzymes from *Aspergillus foetidus*, *Process Biochem.*, 35, 771–775.
328. Wang, Y., Chang, Y., Yu, L., Zhang, C., Xu, X., Xue, Y., Li, Z., Xue, C., (2013). Crystalline structure and thermal property characterization of chitin from Antarctic krill (*Euphausia superba*), *Carbohydr. Polym.*, 92, 90–97.
329. Waterschoot, J., Gomand, S. V., Fierens, E., Delcour, J. A., (2015). Production, structure, physicochemical and functional properties of maize, cassava, wheat, potato and rice starches, *Starch/Stärke*, 67, 14–29.
330. Watve, M. G., Tickoo, R., Jog, M. M., Bhole, B. D., (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*?, *Arch. Microbiol.*, 176, 386–390.
331. Williams, P. A., Phillips, G. O., Stephen, A. M., Churms, S. C., (2006). Gums and Mucilages. In: Food Polysaccharides and Their Applications, Eds: Stephen, A. M., Phillips, G. O., Williams, P. A. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, 455–497.
332. Wilson, W. A., Roach, P. J., Montero, M., Baroja-Fernandez, E., Munoz, F. J., Eydallin, G., Viale, A. M., Pozueta-Romero, J., (2010). Regulation of glycogen metabolism in yeast and bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.*, 34, 952–985.
333. Wu, J., Zhan, X., Liu, H., Zheng, Z., (2008). Enhanced production of curdlan by *Alcaligenes faecalis* by selective feeding with ammonia water during the cell growth phase of fermentation, *Chin. J. Biotech.*, 24(6), 1035–1039.
334. Xu, D., Côté, J.-C., (2003). Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S–23S ITS nucleotide sequences, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 695–704.
335. Yang, J.-S., Xie, Y.-J. He, W., (2011). Research progress on chemical modification of alginate: A review, *Carbohydr. Polym.*, 84, 33–39.

336. Yegorenkova, I. V., Tregubova, K. V., Matora, L. Y., Burygin, G. L., Ignatov, V. V., (2011). Biofilm formation by *Paenibacillus polymyxa* strains differing in the production and rheological properties of their exopolysaccharides, *Curr. Microbiol.*, 62, 1554–1559.
337. Yu, R. J., Bishop, C. T., (1967). Novel oxidations of methyl glucopyranosides by periodic acid in dimethyl sulfoxide, *Can. J. Chem.*, 45, 2195–2203.
338. Yu, X., Wang, Y., Wei, G., Dong, Y., (2012). Media optimization for elevated molecular weight and mass production of pigment-free pullulan, *Carbohydr. Polym.*, 89, 928–934.
339. Yurlova, N. A., de Hoog, G. S., (1997). A new variety of *Aureobasidium pullulans* characterized by exopolysaccharide structure, nutritional physiology and molecular features, *Antonie van Leeuwenhoek*, 72, 141–147.
340. Zaharia, C., Suteu, D., (2012). Textile organic dyes - characteristics, polluting effects and separation/elimination procedures from industrial effluents - A critical overview. In: *Organic Pollutants Ten Years After the Stockholm Convention - Environmental and Analytical Update*, Eds: Puzyn, T., Mostrag – Szlichtyng A. InTech Publishers, 55-87.
341. Zalar, P., Gostinčar, C., de Hoog, G. S., Uršič, V., Sudhadham, M., Gunde-Cimerman, N., (2008). Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties, *Stud. Mycol.*, 61, 21–38.
342. Zarif, L., Graybill, J. R., Perlin, D., Najvar, L., Bocanegra, R., Mannino, R. J., (2000). Antifungal activity of amphotericin B cochleates against *Candida albicans* infection in a mouse model, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44(6), 1463–1469.
343. Zhang, H., Li, F., Yi, J., Gu, C., Fan, L., Qiao, Y., Tao, Y., Cheng, C., Wu, H., (2011). Folate-decorated maleilated pullulan-doxorubicin conjugate for active tumor-targeted drug delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 42, 517–526.

344. Zhang, T., Li, R., Qian, H., Mu, W., Miao, M., Jiang, B., (2014). Biosynthesis of levan by levansucrase from *Bacillus methylotrophicus* SK 21.002, *Carbohydr. Polym.*, 101, 975–981.
345. Zhao, H., Heindel N. D., (1991). Determination of degree of substitution of formyl groups in polyaldehyde dextran by the hydroxylamine hydrochloride method, *Pharm. Res.*, 8(3), 400–402.
346. Zohuriaan, M. J., Shokrolahi, F., (2004). Thermal studies on natural and modified gums, *Polym. Test.*, 23, 575–579.

## **BIOGRAFIJA AUTORA**

Jovana R. Stefanović Kojić je rođena 25.6.1984. godine u Čačku. Diplomirala je na katedri za Biohemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu 2009. godine sa prosečnom ocenom 9,12. Diplomski rad na temu „Sinteza i antifungalna aktivnost konjugata gumiarabike i pululana sa polienskim antibioticima” radila je pod rukovodstvom profesora dr Miroslava M. Vrvića u laboratoriji za Biotehnologiju i mikrobiološku hemiju. Doktorske studije na studijskom programu Doktor biohemijskih nauka na Hemijskom fakultetu u Beogradu upisala je 2009. godine.

U Centru za hemiju Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju u Beogradu zaposlena je od 2009. godine. Na Hemijskom fakultetu u Beogradu bila je angažovana za izvođenje vežbi iz predmeta Mikrobiologija, Mikrobiološka hemija i osnovi biotehnologije, Biotehnološka i industrijska biohemija i Biotehnologije u životnoj sredini.

Oblast interesovanja i naučno – istraživačkog rada su polisaharidi mikroorganizama.

Autor i koautor je jednog naučnog rada objavljenog u istaknutom međunarodnom časopisu (M22), jednog u međunarodnom časopisu (M23), jednog predavanja po pozivu i 19 saopštenja na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu štampanih u celini i izvodu.

## Изјава о ауторству

Потписана \_\_\_\_\_ Јована Стефановић Којић \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ ДБ18/2009 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Синтеза, структурна карактеризација и биолошка активност  
функционализованих деривата полисахарида гумиарабике, пулулана и левана”

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_ 10.11.2015. \_\_\_\_\_

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јована Стефановић Којић

Број индекса ДБ18/2009

Студијски програм Доктор биохемијских наука

Наслов рада

„Синтеза, структурна карактеризација и биолошка активност  
функционализованих деривата полисахарида гумиарабике, пулулана и левана”

Ментор проф. др Мирослав М. Врвић

Потписани \_\_\_\_\_

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 10.11.2015.

\_\_\_\_\_



## Изјава о коришћењу

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

„Синтеза, структурна карактеризација и биолошка активност  
функционализованих деривата полисахарида гумиарабике, пулупана и левана”

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

① Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**

У Београду, 10.11.2015.

1. Ауторство - Дозвољавање 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. Дозвољавање 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 прераде. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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 прераде. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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.