



UNIVERZITET U NOVOM SADU

TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD



# **Optimizacija proizvodnje ksantana na sirovom glicerolu primenom lokalnog izolata *Xanthomonas* sp.**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:  
Doc. dr Zorana Trivunović

Kandidat:  
Mast. inž. Ida Zahović

Novi Sad, 2021. godine

## SADRŽAJ

SPISAK OZNAKA, SIMBOLA I SKRAĆENICA .....	III
SPISAK TABELA .....	V
SPISAK SLIKA .....	IX
1. UVOD .....	1
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	3
3. PREGLED LITERATURE .....	4
3.1. KSANTAN-MIKROBIOLOŠKI BIOPOLIMER.....	4
3.2. BIOTEHNOLOŠKA PROIZVODNJA KSANTANA.....	7
3.2.1. Proizvodni mikroorganizam.....	7
3.2.2. Kultivacioni medijumi.....	10
3.2.3. Procesni uslovi .....	11
3.2.4. Proizvodni postupak.....	13
3.3. SIROVI GLICEROL IZ PROIZVODNJE BIODIZELA KAO SIROVINA ZA BIOTEHNOLOŠKE PROCESSE .....	17
3.3.1. Karakterizacija sirovog glicerola .....	17
3.3.2. Stanje i perspektive generisanja sirovog glicerola .....	19
3.3.3. Valorizacija sirovog glicerola u biotehnoškim procesima .....	21
3.4. UNAPREĐENJE BIOTEHNOLOŠKOG POSTUPKA PROIZVODNJE KSANTANA ..	24
3.5. MODELOVANJE I OPTIMIZACIJA BIOTEHNOLOŠKIH PROCESA .....	26
3.5.1. Postupak odzivne površine.....	27
3.5.2. Metoda željene funkcije .....	30
4. MATERIJAL I METODE.....	32
4.1. PROIZVODNI SOJEVI .....	32
4.2. SASTAV KULTIVACIONIH MEDIJUMA .....	32
4.2.1. Kultivacioni medijumi za pripremu inokuluma .....	32
4.2.2. Kultivacioni medijumi za biosintezu ksantana.....	33
4.3. PRIPREMA INOKULUMA .....	34
4.4. USLOVI BIOSINTEZE .....	35
4.5. IZDVAJANJE PROIZVODA .....	37
4.6. ANALITIČKI POSTUPCI.....	37
4.6.1. Analiza sirovog glicerola .....	37
4.6.2. Analiza kultivacionog medijuma .....	38
4.6.3. Analiza biosintetisanog ksantana .....	40
4.7. STATISTIČKA ANALIZA .....	40

4.8. MODELOVANJE I OPTIMIZACIJA .....	41
5. REZULTATI I DISKUSIJA .....	47
5.1. SKRINING MOGUĆNOSTI BIOSINTEZE KSANTANA PRIMENOM SOJEVA <i>Xanthomonas</i> spp. NA MEDIJUMIMA SA RAZLIČITIM IZVORIMA UGLJENIKA .....	47
5.1.1. Uticaj selekcije proizvodnog soja i izvora ugljenika na količinu ksantana.....	47
5.1.2. Uticaj selekcije proizvodnog soja i izvora ugljenika na kvalitet ksantana.....	59
5.1.3. Uticaj selekcije proizvodnog soja i vremena kultivacije na količinu ksantana.....	65
5.1.4. Uticaj selekcije proizvodnog soja i vremena kultivacije na kvalitet ksantana.....	75
5.2. KARAKTERIZACIJA SIROVOG GLICEROLA IZ PROIZVODNJE BIODIZELA U REPUBLICI SRBIJI .....	81
5.3. SKRINING MOGUĆNOSTI BIOSINTEZE KSANTANA PRIMENOM SOJEVA <i>Xanthomonas</i> spp. NA MEDIJUMU SA SIROVIM GLICEROLOM .....	84
5.3.1. Uticaj selekcije proizvodnog soja i vremena kultivacije na količinu ksantana u medijumu sa sirovim glicerolom.....	85
5.3.2. Uticaj selekcije proizvodnog soja i vremena kultivacije na kvalitet ksantana biosintetisanog na medijumu sa sirovim glicerolom.....	95
5.3.3. Odabir proizvodnog soja za biosintezu ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom .....	101
5.4. STANDARDIZACIJA PRIPREME INOKULUMA ZA BIOSINTEZU KSANTANA NA MEDIJUMU SA SIROVIM GLICEROLOM.....	106
5.4.1. Definisavanje odnosa glukoze i glicerola u medijumu za pripremu inokuluma.....	107
5.4.2. Definisavanje odnosa sastojaka sa azotom u medijumu za pripremu inokuluma.....	116
5.4.3. Definisavanje sadržaja sastojaka medijuma za pripremu inokuluma i koncentracije inokuluma u medijumu za biosintezu.....	125
5.4.4. Definisavanje vremena trajanja pripreme inokuluma .....	136
5.5. FORMULACIJA SASTAVA MEDIJUMA SA SIROVIM GLICEROLOM ZA BIOSINTEZU KSANTANA .....	144
5.5.1. Definisavanje sadržaja glicerola i izvora azota u medijumu za biosintezu ksantana....	145
5.5.2. Definisavanje sadržaja izvora fosfora u medijumu za biosintezu ksantana.....	168
5.6. ISPITIVANJE TOKA BIOSINTEZE KSANTANA NA MEDIJUMU SA SIROVIM GLICEROLOM U UVEĆANIM RAZMERAMA .....	175
6. ZAKLJUČCI.....	184
7. LITERATURA.....	187
8. PRILOZI.....	198
8.1. Prilog 1 .....	198
8.2. Prilog 2 .....	206

## SPISAK OZNAKA, SIMBOLA I SKRAĆENICA

$[\eta]$	unutrašnji viskozitet, (l/g)
Am, KUPUS, KELJ, KARFIOL, Xp 3-1, Xp 7-2, Mn 7-2 i 12-2	sojevi roda <i>Xanthomonas</i> izolovani sa inficiranih listova biljaka iz porodice kupusnjača
$b_0$	odsečak u regresionoj jednačini
$b_1, b_2, b_3$	linearni koeficijenti regresione jednačine
$b_{11}, b_{22}, b_{33}$	kvadratni koeficijenti regresione jednačine
$b_{12}, b_{13}, b_{23}$	koeficijenti interakcije regresione jednačine
D	brzina smicanja, (100 1/s)
DF	<i>Degree of Freedom</i> (engl.) – broj stepeni slobode
d/Di	odnos prečnika mešalice i prečnika suda bioreaktora, (1)
f	funkcija odziva
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (engl.) - Uprava za hranu i lekove
Glu:Gly	glukoza i sirovi glicerol dodati u odnosu 40:60
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i> (engl.) – tečna hromatografija pod visokim pritiskom
K	faktor konzistencije, (Pa·s <sup>n</sup> )
$K_N$	stepen konverzije ukupnog azota, (%)
$K_{Puk}$	stepen konverzije ukupnog fosfora, (%)
$K_{P/S}$	stepen konverzije izvora ugljenika u ksantan, (%)
$K_S$	stepen konverzije izvora ugljenika, (%)
$M_w$	srednja molekulska masa ksantana, (g/mol)
MS	<i>Mean Squares</i> (engl.) – suma srednjih kvadrata
n	indeks toka, (1)
$N_{as}$	rezidualni sadržaj asimilabilnog azota (mg/l)
$N_{uk}$	rezidualni sadržaj ukupnog azota, (mg/l)
$N_{uk0}$	početni sadržaj ukupnog azota, (mg/l)
$O_2$	sadržaj rastvorenog kiseonika, (%)

OFAT	<i>One-Factor-At-a-Time</i> (engl.) - metoda ispitivanja uticaja pojedinačnih parametara
P	sadržaj biosintetisanog ksantana, (g/l)
PAP LIST 1, PAP LIST 2, PAP LIST 3, PAP LIST 4 i PAP LIST 5	sojevi roda <i>Xanthomonas</i> izolovani sa listova paprika sa karakterističnim simptomima bakterioze
pH	mera aktivnosti vodonikovih jona u rastvoru, (1)
P <sub>uk</sub>	rezidualni sadržaj ukupnog fosfora, (mg/l)
P <sub>uk0</sub>	početni sadržaj ukupnog fosfora, (mg/l)
R <sup>2</sup>	koeficijent determinacije
RSM	<i>Response Surface Methodology</i> (eng.) – metodologija odzivne površine
S	rezidualni sadržaj izvora ugljenika, (g/l)
S <sub>0</sub>	početni sadržaj izvora ugljenika, (g/l)
SS	<i>Sum of Squares</i> (engl.) – suma kvadrata
t	vreme trajanja bioprocasa, (h)
t <sub>I</sub>	vreme trajanja prve faze pripreme inokuluma, (h)
t <sub>II</sub>	vreme trajanja druge faze pripreme inokuluma, (h)
TDS	<i>Total Dissolved Solids</i> (engl.) - sadržaj ukupnih rastvorenih soli, (mg/l)
X <sub>1</sub> , X <sub>2</sub> , X <sub>3</sub>	ispitivani faktori
Y	modelovani odziv
YMA	<i>Yeast Maltose Agar</i> (engl.) – agarizovan hranljivi medijum za kultivaciju bakterija roda <i>Xanthomonas</i> na bazi ekstrakta kvasca i maltoze
YMB	<i>Yeast Maltose Broth</i> (engl.) – tečni hranljivi medijum za kultivaciju bakterija roda <i>Xanthomonas</i> na bazi ekstrakta kvasca i maltoze
z	konstanta reoloških merenja, (3,08 dyn/cm <sup>2</sup> ·Skt)
α	otklon kazaljke reološkog viskozimetra, (Skt)
ε	statistička greška
η <sub>a</sub>	prividni viskozitet, (mPa·s)
η <sub>a1%</sub>	prividni viskozitet 1% (w/v) rastvora ksantana u 0,1 M NaCl, (mPa·s)
τ	napon smicanja, (Pa)

## SPISAK TABELA

Tabela 3.1. Primena ksantana u različitim granama industrije (Becker i sar., 1998; Palaniraj i Jayaraman, 2011) .....	6
Tabela 3.2. Karakteristike čistog i sirovog glicerola (Kaur i sar., 2020) .....	18
Tabela 3.3. Primeri primene sirovog glicerola u biotehnološkoj proizvodnji.....	23
Tabela 3.4. Uspešnost biosinteze ksantana na medijumima sa čistim i/ili sirovim glicerolom u definisanim eksperimentalnim uslovima primenom različitih sojeva roda <i>Xanthomonas</i> .....	25
Tabela 4.1. Prikaz eksperimentalnih planova po fazama istraživanja.....	41
Tabela 4.2. Dizajn smeše i varirane vrednosti sadržaja glukoze i glicerola u medijumu za pripremu inokuluma .....	42
Tabela 4.3. Dizajn smeše i varirane vrednosti sadržaja sastojaka sa azotom u medijumu za pripremu inokuluma .....	43
Tabela 4.4. Boks–Benkenov eksperimentalni plan i varirane vrednosti sadržaja sastojaka medijuma za pripremu inokuluma i koncentracije inokuluma u medijumu za biosintezu.....	44
Tabela 4.5. Faktorijalni dizajn i varirane vrednosti vremena trajanja pripreme inokuluma .....	44
Tabela 4.6. Boks–Benkenov eksperimentalni plan i varirane vrednosti sadržaja nutrijenata u medijumu za biosintezu.....	46
Tabela 5.1. Reološke karakteristike medijuma za biosintezu sa različitim izvorima ugljenika po završetku kultivacije sojeva <i>Xanthomonas</i> spp. ....	48
Tabela 5.2. Dvofaktorijalna analiza varijanse uticaja različitih proizvodnih sojeva i izvora ugljenika na sadržaj ksantana u medijumima za biosintezu.....	51
Tabela 5.3. Dankanov test višestrukih poređenja: sadržaj ksantana u medijumima za biosintezu sa različitim izvorima ugljenika po završetku kultivacije sojeva <i>Xanthomonas</i> spp. ....	56
Tabela 5.4. Konverzija izvora ugljenika u ksantan u medijumima za biosintezu sa različitim izvorima ugljenika po završetku kultivacije sojeva <i>Xanthomonas</i> spp.....	58
Tabela 5.5. Dvofaktorijalna analiza varijanse uticaja različitih proizvodnih sojeva i .....	59
Tabela 5.6. Dankanov test višestrukih poređenja: molekulska masa ksantana koje na medijumima sa različitim izvorima ugljenika biosintetišu sojevi <i>Xanthomonas</i> spp.....	64
Tabela 5.7. Reološke karakteristike medijuma za biosintezu sa komercijalnim glicerolom po završetku kultivacije sojeva <i>Xanthomonas</i> spp. u trajanju od 168 h i 240 h.....	66
Tabela 5.8. Dvofaktorijalna analiza varijanse uticaja različitih proizvodnih sojeva i vremena trajanja kultivacije na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa .....	68
Tabela 5.9. Dankanov test višestrukih poređenja: sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa komercijalnim glicerolom po završetku kultivacije sojeva <i>Xanthomonas</i> spp. u trajanju od 168 h i 240 h.....	73
Tabela 5.10. Konverzija izvora ugljenika u ksantan u medijumu za biosintezu sa komercijalnim glicerolom po završetku kultivacije sojeva <i>Xanthomonas</i> spp. u trajanju od .....	74
Tabela 5.11. Dvofaktorijalna analiza varijanse uticaja različitih proizvodnih sojeva i vremena trajanja kultivacije na molekulska masu ksantana biosintetisanih na medijumu sa .....	76
Tabela 5.12. Dankanov test višestrukih poređenja: molekulska masa ksantana koje na medijumu sa komercijalnim glicerolom biosintetišu sojevi <i>Xanthomonas</i> spp. za vreme trajanja kultivacije od 168 h i 240 h.....	80

Tabela 5.13. Parametri kvaliteta sirovog glicerola.....	82
Tabela 5.14. Reološke karakteristike medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije sojeva <i>Xanthomonas</i> spp. u trajanju od 168 h i 240 h.....	86
Tabela 5.15. Dvofaktorijalna analiza varijanse uticaja različitih proizvodnih sojeva i vremena trajanja kultivacije na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom.....	88
Tabela 5.16. Dankanov test višestrukih poređenja: sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije sojeva <i>Xanthomonas</i> spp. u trajanju od 168 h i 240 h .....	92
Tabela 5.17. Konverzija izvora ugljenika u ksantan u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije sojeva <i>Xanthomonas</i> spp. u trajanju od 168 h i 240 h .....	94
Tabela 5.18. Dvofaktorijalna analiza varijanse uticaja različitih proizvodnih sojeva i vremena trajanja kultivacije na molekulsku masu ksantana biosintetisanih na medijumu sa .....	95
Tabela 5.19. Dankanov test višestrukih poređenja: molekulska masa ksantana koje na medijumu sa sirovim glicerolom biosintetišu sojevi <i>Xanthomonas</i> spp. za vreme trajanja kultivacije od ..	100
Tabela 5.20. Reološke karakteristike medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije odabranih sojeva <i>Xanthomonas</i> spp. ....	102
Tabela 5.21. Pokazatelji uspešnosti biosinteze ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom primenom odabranih sojeva <i>Xanthomonas</i> spp.....	103
Tabela 5.22. Reološke karakteristike medijuma za biosintezu po završetku kultivacije soja.....	109
Tabela 5.23. Uticaj različitog odnosa glukoze i glicerola u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu po završetku kultivacije .....	110
Tabela 5.24. Analiza varijanse modelovanog odziva: sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima sa različitim odnosima glukoze i glicerola.....	111
Tabela 5.25. Optimalne vrednosti variranih parametara i predviđeni odziv: odnos glukoze i glicerola u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma .....	115
Tabela 5.26. Reološke karakteristike medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima sa različitim odnosima sastojaka sa azotom .....	118
Tabela 5.27. Uticaj različitog odnosa sastojaka sa azotom u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4.....	119
Tabela 5.28. Analiza varijanse modelovanog odziva: sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima sa .....	120
Tabela 5.29. Optimalne vrednosti variranih parametara i predviđeni odziv: odnos sastojaka sa azotom u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma.....	123
Tabela 5.30. Reološke karakteristike medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima sa različitim sadržajem sastojaka i dodatog u različitim koncentracijama .....	126
Tabela 5.31. Uticaj različitog sadržaja sastojaka medijuma za drugu fazu pripreme inokuluma i koncentracije inokuluma u medijumu sa sirovim glicerolom na pokazatelje uspešnosti biosinteze ksantana primenom soja PAP LIST 4 .....	127
Tabela 5.32. Analiza varijanse modelovanog odziva: sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima sa različitim sadržajem sastojaka i dodatog u različitim koncentracijama .....	130

Tabela 5.33. Optimalne vrednosti variranih parametara i predviđeni odziv: sadržaj sastojaka medijuma za drugu fazu pripreme inokuluma i koncentracija inokuluma u medijumu za biosintezu .....	134
Tabela 5.34. Reološke karakteristike medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumu za pripremu inokuluma optimizovane formulacije u različitom trajanju .....	137
Tabela 5.35. Uticaj vremena trajanja pripreme inokuluma na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumu za pripremu inokuluma optimizovane formulacije.....	139
Tabela 5.36. Analiza varijanse modelovanog odziva: sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumu za pripremu inokuluma optimizovane formulacije u različitom trajanju.....	140
Tabela 5.37. Optimalne vrednosti variranih parametara i predviđeni odziv: definisanje vremena trajanja pripreme inokuluma .....	143
Tabela 5.38. Reološke karakteristike medijuma za biosintezu na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota po završetku kultivacije.....	146
Tabela 5.39. Uticaj različitog početnog sadržaja glicerola i izvora azota u medijumu na bazi sirovog glicerola na pokazatelje uspešnosti biosinteze ksantana primenom soja PAP LIST 4 ..	148
Tabela 5.40. Analiza varijanse modelovanih odziva za biosintezu kantana na medijumima sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota primenom soja PAP LIST 4 .....	150
Tabela 5.41. Optimalne vrednosti variranih parametara i predviđeni odzivi: sadržaj glicerola i izvora azota u medijumu za biosintezu .....	164
Tabela 5.42. Reološke karakteristike medijuma za biosintezu na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem izvora fosfora po završetku kultivacije soja PAP LIST 4.....	169
Tabela 5.43. Jednofaktorijalna analiza varijanse uticaja različitog početnog sadržaja $K_2HPO_4$ u medijumu na bazi sirovog glicerola na pokazatelje uspešnosti biosinteze ksantana primenom .	170
Tabela 5.44. Dankanov test višestrukih poređenja: pokazatelji uspešnosti biosinteze ksantana primenom soja PAP LIST 4 na medijumima na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem $K_2HPO_4$ .....	173
Tabela 5.45. Pokazatelji uspešnosti biosinteze ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom primenom soja PAP LIST 4 u laboratorijski bioreaktorima .....	180
Tabela 8.1. Vrednost pH medijuma sa različitim izvorima ugljenika po završetku kultivacije sojeva <i>Xanthomonas</i> spp. ....	198
Tabela 8.2. Sadržaj TDS u medijumima sa različitim izvorima ugljenika po završetku kultivacije sojeva <i>Xanthomonas</i> spp. ....	198
Tabela 8.3. Jednofaktorijalna analiza varijanse uticaja odabranih sojeva <i>Xanthomonas</i> spp. na sadržaj ksantana u medijumu sa komercijalnim glicerolom .....	199
Tabela 8.4. Dankanov test višestrukih poređenja: sadržaj ksantana u medijumima sa komercijalnim glicerolom po završetku kultivacije odabranih sojeva <i>Xanthomonas</i> spp. ....	199
Tabela 8.5. Vrednost pH medijuma sa komercijalnim glicerolom po završetku kultivacije sojeva <i>Xanthomonas</i> spp. u trajanju od 168 h i 240 h .....	199
Tabela 8.6. Sadržaj TDS u medijumima sa komercijalnim glicerolom po završetku kultivacije sojeva <i>Xanthomonas</i> spp. u trajanju od 168 h i 240 h.....	200



Tabela 8.7. Vrednost pH medijuma sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije sojeva <i>Xanthomonas</i> spp. u trajanju od 168 h i 240 h.....	200
Tabela 8.8. Sadržaj TDS u medijumima sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije sojeva <i>Xanthomonas</i> spp. u trajanju od 168 h i 240 h.....	201
Tabela 8.9. Vrednost pH i sadržaj TDS u medijumima sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije odabranih sojeva <i>Xanthomonas</i> spp. ....	201
Tabela 8.10. Jednofaktorijalna analiza varijanse uticaja odabranih sojeva <i>Xanthomonas</i> spp. na pokazatelje uspešnosti biosinteze ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom.....	202
Tabela 8.11. Vrednost pH i sadržaj TDS u medijumu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima sa različitim odnosima izvora ugljenika.....	202
Tabela 8.12. Vrednost pH i sadržaj TDS u medijumu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima sa različitim odnosima izvora azota .....	203
Tabela 8.13. Vrednost pH i sadržaj TDS u medijumu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima sa različitim početnim sadržajem nutrijenata i dodatog u različitim koncentracijama.....	203
Tabela 8.14. Vrednost pH i sadržaj TDS u medijumu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumu optimizovane formulacije u različitom trajanju .....	204
Tabela 8.15. Vrednost pH i sadržaj TDS u medijumima na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota po završetku kultivacije soja PAP LIST 4.....	204
Tabela 8.16. Vrednost pH i sadržaj TDS u medijumima na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem izvora fosfora po završetku kultivacije soja PAP LIST 4.....	204
Tabela 8.17. Reološke karakteristike medijuma sa sirovim glicerolom tokom kultivacije soja PAP LIST 4 u laboratorijskom bioreaktoru ukupne zapremine 3 l.....	205
Tabela 8.18. Reološke karakteristike medijuma sa sirovim glicerolom tokom kultivacije soja PAP LIST 4 u laboratorijskom bioreaktoru ukupne zapremine 14 l.....	205

## SPISAK SLIKA

Slika 3.1. Struktura molekula ksantana (Quinten i sar., 2011).....	5
Slika 3.2. Bakterija roda <i>Xanthomonas</i> : a) mikroskopski izgled ćelije (Janse i sar., 2001); b) rast kolonija na agarizovanom medijumu u Petri ploči (Ranjani i sar., 2018);.....	8
Slika 3.3. Šematski prikaz biotehnološkog postupka proizvodnje ksantana (De Monaco Lopes i sar., 2015).....	14
Slika 3.4. Mapa privrednih subjekata na teritoriji Republike Srbije registrovanih za proizvodnju biodizela .....	19
Slika 3.5. Trodimenzionalni prikaz matematičkog modela generisanog primenom postupka odzivne površine koji opisuje uticaj dva parametra na posmatrani odziv, $y=f(x_1, x_2)$ (Montgomery, 2013). .....	28
Slika 4.1. Laboratorisjki bioreaktor BIOSTAT A-Plus ukupne zapremine 3 l.....	36
Slika 4.2. Laboratorijski bioreaktor CH-8708 ukupne zapremine 14 l .....	36
Slika 5.1. Uticaj selekcije proizvodnog soja na sadržaj ksantana (P) u medijumima za biosintezu sa različitim izvorima ugljenika: izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača .....	53
Slika 5.2. Uticaj selekcije proizvodnog soja na sadržaj ksantana (P) u medijumima za biosintezu sa različitim izvorima ugljenika: izolati sa listova paprika .....	54
Slika 5.3. Uticaj selekcije izvora ugljenika na sadržaj ksantana (P) u medijumu za biosintezu: izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača .....	54
Slika 5.4. Uticaj selekcije izvora ugljenika na sadržaj ksantana (P) u medijumu za biosintezu: izolati sa listova paprika.....	55
Slika 5.5. Uticaj selekcije proizvodnog soja na molekulsku masu ksantana ( $M_w$ ) biosintetisanih na medijumima sa različitim izvorima ugljenika: izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača .....	60
Slika 5.6. Uticaj selekcije proizvodnog soja na molekulsku masu ksantana ( $M_w$ ) biosintetisanih na medijumima sa različitim izvorima ugljenika: izolati sa listova paprika.....	61
Slika 5.7. Uticaj selekcije izvora ugljenika u medijumu za biosintezu na molekulsku masu ksantana ( $M_w$ ): izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača.....	62
Slika 5.8. Uticaj selekcije izvora ugljenika na molekulsku masu ksantana ( $M_w$ ): izolati sa listova paprika.....	63
Slika 5.9. Uticaj selekcije proizvodnog soja na sadržaj ksantana (P) u medijumu za biosintezu sa komercijalnim glicerolom za različito vreme trajanja kultivacije: izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača .....	70
Slika 5.10. Uticaj selekcije proizvodnog soja na sadržaj ksantana (P) u medijumu za biosintezu sa komercijalnim glicerolom za različito vreme trajanja kultivacije: izolati sa listova paprika ...	70
Slika 5.11. Uticaj vremena trajanja kultivacije na sadržaj ksantana (P) u medijumu za biosintezu sa komercijalnim glicerolom: izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača .....	71
Slika 5.12. Uticaj vremena trajanja kultivacije na sadržaj ksantana (P) u medijumu za biosintezu sa komercijalnim glicerolom: izolati sa listova paprika.....	72
Slika 5.13. Uticaj selekcije proizvodnog soja na molekulsku masu ksantana ( $M_w$ ) biosintetisanih na medijumu sa komercijalnim glicerolom za različito vreme trajanja kultivacije: izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača .....	77

Slika 5.14. Uticaj selekcije proizvodnog soja na molekulsku masu ksantana ( $M_w$ ) biosintetisanih na medijumu sa komercijalnim glicerolom za različito vreme trajanja kultivacije: izolati sa listova paprika .....	78
Slika 5.15. Uticaj vremena trajanja kultivacije na molekulsku masu ksantana ( $M_w$ ) biosintetisanih na medijumu sa komercijalnim glicerolom: izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača .....	78
Slika 5.16. Uticaj vremena trajanja kultivacije na molekulsku masu ksantana ( $M_w$ ) biosintetisanih na medijumu sa komercijalnim glicerolom: izolati sa listova paprika .....	79
Slika 5.17. Uticaj selekcije proizvodnog soja na sadržaj ksantana (P) u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom za različito vreme trajanja kultivacije: izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača .....	89
Slika 5.18. Uticaj selekcije proizvodnog soja na sadržaj ksantana (P) u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom za različito vreme trajanja kultivacije: izolati sa listova paprika .....	90
Slika 5.19. Uticaj vremena trajanja kultivacije na sadržaj ksantana (P) u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom: izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača .....	91
Slika 5.20. Uticaj vremena trajanja kultivacije na sadržaj ksantana (P) u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom: izolati sa listova paprika .....	91
Slika 5.21. Uticaj selekcije proizvodnog soja na molekulsku masu ksantana ( $M_w$ ) biosintetisanih na medijumu sa sirovim glicerolom za različito vreme trajanja kultivacije: izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača .....	97
Slika 5.22. Uticaj selekcije proizvodnog soja na molekulsku masu ksantana ( $M_w$ ) biosintetisanih na medijumu sa sirovim glicerolom za različito vreme trajanja kultivacije: izolati sa listova paprika .....	97
Slika 5.23. Uticaj vremena trajanja kultivacije na sadržaj ksantana (P) u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom: izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača .....	98
Slika 5.24. Uticaj vremena trajanja kultivacije na sadržaj ksantana (P) u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom: izolati sa listova paprika .....	99
Slika 5.25. Pareto grafik standardizovanih efekata na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima sa različitim odnosima glukoze i glicerola .....	113
Slika 5.26. Zavisnost sadržaja ksantana (P) u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 od odnosa variranih izvora ugljenika u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma .....	114
Slika 5.27. Zavisnost vrednosti ukupne željene funkcije od odnosa variranih izvora ugljenika u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma .....	115
Slika 5.28. Pareto grafik standardizovanih efekata na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima sa različitim odnosima sastojaka sa azotom .....	122
Slika 5.29. Zavisnost sadržaja ksantana (P) u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 od odnosa sastojaka sa azotom u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma .....	122
Slika 5.30. Zavisnost vrednosti ukupne željene funkcije od odnosa sastojaka sa azotom u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma .....	124

Slika 5.31. Pareto grafik standardizovanih efekata na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima sa različitim sadržajem sastojaka i dodatog u različitim koncentracijama .....	131
Slika 5.32. Sadržaj ksantana (P) u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima sa različitim sadržajem sastojaka i dodatog u različitim koncentracijama u funkciji dva faktora pri konstantnoj vrednosti trećeg: .....	132
Slika 5.33. Zavisnost vrednosti ukupne željene funkcije od sadržaja glukoze i glicerola, kao i sladnog ekstrakta u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma pri konstantnoj koncentraciji inokuluma u medijumu za biosintezu od 5,19%(v/v) .....	135
Slika 5.34. Pareto grafik standardizovanih efekata na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumu za pripremu inokuluma optimizovane formulacije u različitom trajanju.....	141
Slika 5.35. Sadržaj ksantana (P) u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumu za pripremu inokuluma optimizovane formulacije u funkciji vremena trajanja prve ( $t_I$ ) i druge faze pripreme inokuluma( $t_{II}$ ) .....	142
Slika 5.36. Zavisnost vrednosti ukupne željene funkcije od vremena trajanja prve ( $t_I$ ) i druge faze pripreme inokuluma ( $t_{II}$ ).....	144
Slika 5.37. Pareto grafik standardizovanih efekata na sadržaj ksantana u medijumima za biosintezu na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 .....	152
Slika 5.38. Sadržaj ksantana (P) u medijumima za biosintezu na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 u funkciji dva faktora pri konstantnoj vrednosti trećeg: .....	153
Slika 5.39. Pareto grafik standardizovanih efekata na molekulsku masu ksantana koje na medijumima na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota biosintetiše soj PAP LIST 4 .....	155
Slika 5.40. Molekulska masa ksantana ( $M_w$ ) biosintetisanih na medijumima na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 u funkciji dva faktora pri konstantnoj vrednosti trećeg:.....	156
Slika 5.41. Pareto grafik standardizovanih efekata na rezidualni sadržaj glicerola u medijumima za biosintezu na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 .....	158
Slika 5.42. Rezidualni sadržaj glicerola (S) u medijumima na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 u funkciji dva faktora pri konstantnoj vrednosti trećeg: .....	159
Slika 5.43. Pareto grafik standardizovanih efekata na rezidualni sadržaj ukupnog azota u medijumima za biosintezu na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 .....	161
Slika 5.44. Rezidualni sadržaj ukupnog azota ( $N_{uk}$ ) u medijumima na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 u funkciji dva faktora pri konstantnoj vrednosti trećeg: .....	163

Slika 5.45. Zavisnost sadržaja ksantana u medijumu za biosintezu na bazi sirovog glicerola po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 od početnog sadržaja glicerola i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ u medijumu za biosintezu bez dodatka ekstrakta kvasca .....	165
Slika 5.46. Zavisnost molekulske mase ksantana biosintetisanih na medijumu na bazi sirovog glicerola primenom soja PAP LIST 4 od početnog sadržaja glicerola i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ u medijumu za biosintezu bez dodatka ekstrakta kvasca.....	166
Slika 5.47. Zavisnost rezidualnog sadržaja glicerola u medijumu za biosintezu na bazi sirovog glicerola po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 od početnog sadržaja glicerola i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ u medijumu za biosintezu.....	167
Slika 5.48. Uticaj početnog sadržaja $\text{K}_2\text{HPO}_4$ na sadržaj ksantana (P) u medijumima za biosintezu na bazi sirovog glicerola po završetku kultivacije soja PAP LIST 4.....	171
Slika 5.49. Uticaj početnog sadržaja $\text{K}_2\text{HPO}_4$ na molekulsku masu ksantana ( $M_w$ ) koje na medijumima na bazi sirovog glicerola biosintetiše soj PAP LIST 4.....	172
Slika 5.50. Uticaj početnog sadržaja $\text{K}_2\text{HPO}_4$ na rezidualni sadržaj ukupnog fosfora ( $P_{uk}$ ) u medijumu za biosintezu na bazi sirovog glicerola po završetku kultivacije soja PAP LIST 4...	172
Slika 5.51. Tok biosinteze ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom primenom soja PAP LIST 4 u laboratorijskom bioreaktoru ukupne zapremine 3 l .....	177
Slika 5.52. Tok biosinteze ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom primenom soja PAP LIST 4 u laboratorijskom bioreaktoru ukupne zapremine 14 .....	178

Slika 8.1. Poređenje eksperimentalno dobijenih i modelom predviđenih vrednosti za sadržaj ksantana u medijumu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima sa različitim odnosima izvora ugljenika .....	206
Slika 8.2. Poređenje eksperimentalno dobijenih i modelom predviđenih vrednosti za sadržaj ksantana u medijumu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima sa različitim odnosima izvora azota.....	206
Slika 8.3. Poređenje eksperimentalno dobijenih i modelom predviđenih vrednosti za sadržaj ksantana u medijumu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima sa različitim početnim sadržajem nutrijenata i dodatog u različitim koncentracijama .....	207
Slika 8.4. Poređenje eksperimentalno dobijenih i modelom predviđenih vrednosti za sadržaj ksantana u medijumu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumu optimizovane formulacije u različitom trajanju.....	207
Slika 8.5. Poređenje eksperimentalno dobijenih i modelom predviđenih vrednosti za sadržaj ksantana u medijumima za biosintezu na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 .....	208
Slika 8.6. Poređenje eksperimentalno dobijenih i modelom predviđenih vrednosti za molekulsku masu ksantana koje na medijumima na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota biosintetiše soj PAP LIST 4.....	208
Slika 8.7. Poređenje eksperimentalno dobijenih i modelom predviđenih vrednosti za rezidualni sadržaj glicerola u medijumima na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 .....	209
Slika 8.8. Poređenje eksperimentalno dobijenih i modelom predviđenih vrednosti za rezidualni sadržaj ukupnog azota u medijumima na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 .....	209

## 1. UVOD

Enormna upotreba fosilnih goriva dovela je do globalnog ekološkog poremećaja. Ograničene količine i negativni efekti tečnih fosilnih goriva na kvalitet životne sredine, a indirektno i na zdravlje ljudi, doveli su do potražnje za alternativnim, obnovljivim izvorima energije. Među njima posebno se ističe biodizel, koji se sve više koristi kao zamena za fosilna goriva širom sveta, što zahteva proširenje proizvodnih kapaciteta. Intenziviranje proizvodnje biodizela za posledicu ima generisanje značajnih količina efluenta koji sadrže neiskorišćeni katalizator, glicerol, metanol, sapune, a u malim količinama mogu biti prisutni i peptidi, lecitin, proteini i fosfolipidi. Kao najznačajniji nusproizvod prilikom proizvodnje biodizela izdvaja se sirovi glicerol, koji pored dominantno prisutnog glicerola, u svom sastavu sadrži i brojne nečistoće. Sirovi glicerol nastaje u količini od 10% do 20% u odnosu na zapreminu proizvedenog biodizela, što ukazuje na to da se generišu značajne količine ovog efluenta. Kako je odlaganje neprečišćenog glicerola u životnu sredinu ekološki neprihvatljivo, potrebno je pronaći adekvatno rešenje za njegovo prečišćavanje ili primenu u neprečišćenom obliku. Imajući u vidu gotovo neograničene mogućnosti delovanja biokatalizatora na različitim supstratima u svrhu dobijanja tržišno vrednih bioproizvoda, potencijalno iskorišćenje sirovog glicerola kao sirovine u biotehnološkoj proizvodnji, iz ugla ekonomske i ekološke održivosti, predstavlja idealno rešenje. Teorijski gledano, glicerol može predstavljati izvor ugljenika za značajan broj mikroorganizama, a eksperimentalno je potvrđeno i da neki sojevi na medijumima sa glicerolom mogu da biosintetišu tržišno vredne bioproizvode. Podaci iz dostupne naučne i stručne literature ukazuju da pojedini sojevi bakterija roda *Xanthomonas* poseduju sposobnost biosinteze ksantana na medijumu sa glicerolom kao jedinim izvorom ugljenika.

Ksantan predstavlja netoksičan, biokompatibilan i biorazgradiv polisaharid mikrobiološkog porekla. Zahvaljujući svojim izuzetnim reološkim karakteristikama, koristi se u prehrambenoj, farmaceutskoj, naftno-petrohemijskoj, hemijskoj i tekstilnoj industriji. Budući da se potražnja za ksantanom konstantno povećava, procenjuje se da će njegova tržišna vrednost u 2023. godini iznositi 1184 miliona američkih dolara, a da će se do 2026. godine povećati na nešto više od 1403 miliona američkih dolara. Ksantan se na industrijskom nivou uobičajeno dobija delovanjem referentnog soja *Xanthomonas campestris* ATCC 13951 na kultivacionom medijumu odgovarajućeg sastava, u optimalnim uslovima, diskontinualno, submerznom aerobnom biosintezom u bioreaktorima zapremine 100000 l. Iako je proizvodnja ksantana karakteristična po nespecificnosti ugljenohidratnog supstrata, glukoza i saharoza su najčešće korišćeni izvori ugljenika u medijumima za biosintezu. Međutim, porast cene i sve veća potražnja za pomenutim šećerima ukazuju na potrebu primene alternativnih supstrata niže tržišne vrednosti. Otpadni tokovi i sporedni proizvodi prehrambene industrije i industrije pića, koji sadrže glukoza i saharoza, zadovoljavaju ove kriterijume ali je njihova upotreba za biosintezu ksantana ograničena prvenstveno zbog konkurentnosti na tržištu budući da predstavljaju pogodne sirovine za brojne biotehnološke procese. Ono što takođe predstavlja nedostatak ovih efluenta jeste njihova dostupnost koja je ograničena samo na teritorije gde se izvode tehnološki postupci u kojima se generišu. Sa druge strane, biosinteza ksantana na medijumima čija su osnova industrijski otpadni tokovi i/ili nusproizvodi koji nisu često eksploatisani u biotehnologiji do sada nije dala zadovoljavajuće rezultate, što je posledica otežane sposobnosti referentnog soja da metaboliše pojedine izvore ugljenika. Dakle, jasno je da je prvi korak u razvoju održivog

biotehnološkog postupka proizvodnje ksantana na efluentima različitih grana industrije izolacija proizvodnih mikroorganizama čija metabolička aktivnost u prisustvu ponuđenog izvora ugljenika rezultuje biosintezom što veće količine ksantana odgovarajućeg kvaliteta.

Istraživanja koja se odnose na razvoj biotehnološkog postupka proizvodnje ksantana na sirovom glicerolu još uvek su u početnim fazama. Uzrok tome može biti otežana metabolička aktivnost primenjenog proizvodnog mikroorganizma, ali i heterogen i nestandardan sastav same sirovine. Uzimajući u obzir sve navedeno, javila se potreba za iznalaženjem proizvodnog soja koji uspešno metaboliše glicerol i biosintetiše ksantan, kao i za optimizacijom postupka njegovog dobijanja, a sve sa ciljem postizanja najveće efikasnosti bioprocesa. Razvoj biotehnološkog postupka proizvodnje ksantana na kultivacionom medijumu sa sirovim glicerolom bio bi u skladu sa osnovnim principima održivog razvoja i potencijalno bi doprineo smanjenju sve veće količine ovog efluenta na tržištu koja se generiše i završava kao otpad upravo zbog zasićenosti tržišta i kompleksne prerade u cilju primene u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Osnovni cilj istraživanja ove doktorske disertacije je optimizacija proizvodnje ksantana metaboličkom aktivnošću lokalnog izolata *Xanthomonas* sp. na kultivacionom medijumu sa sirovim glicerolom kojeg generiše industrija biodizela na teritoriji Republike Srbije. Ostvarenje ovako postavljenog cilja zahteva poznavanje prirode biokatalizatora i biotehnološkog postupka proizvodnje ksantana, specifičnih zahteva u smislu karakteristika sirovina koje se mogu primeniti i njihovih količina, kao i uslova koji su od presudnog značaja za umnožavanje ćelija, produkciju biopolimera i njegovo izdvajanje.

Realizacija osnovnog cilja ove doktorske disertacije zahteva ispunjenje sledećih specifičnih ciljeva:

- skrining mogućnosti biosinteze ksantana referentnim sojem *X. campestris* ATCC 13951 i lokalnim izolatima roda *Xanthomonas* na polusintetičkim medijumima sa glukozom i komercijalnim glicerolom,
- karakterizacija sirovog glicerola iz industrije biodizela u Republici Srbiji,
- skrining mogućnosti biosinteze ksantana referentnim sojem *X. campestris* ATCC 13951 i lokalnim izolatima roda *Xanthomonas* na kultivacionom medijumu sa sirovim glicerolom,
- standardizacija pripreme inokuluma za biosintezu ksantana odabranim proizvodnim sojem na kultivacionom medijumu sa sirovim glicerolom primenom savremenih metoda modelovanja i optimizacije,
- formulacija sastava kultivacionog medijuma sa sirovim glicerolom za biosintezu ksantana odabranim proizvodnim sojem primenom savremenih metoda modelovanja i optimizacije,
- ispitivanje toka biosinteze ksantana odabranim proizvodnim sojem na kultivacionom medijumu optimizovanog sastava u uvećanim razmerama (*scale-up* bioprocasa).

Rezultati ovih istraživanja, dobijeni matematičkim modelovanjem i optimizacijom odabranih segmenata proizvodnog postupka na osnovu realnih eksperimentalnih podataka primenom odgovarajućih softverskih paketa, sa tehnološkog aspekta predstavljaju pouzdan izvor informacija za dalje unapređenje biotehnološkog postupka proizvodnje ksantana, kao i za njegovo prenošenje sa laboratorijskog na poluindustrijski i industrijski nivo. Dobijeni rezultati su u skladu sa konceptom održive proizvodnje, odnosno ukazuju na ekološku i ekonomsku opravdanost proizvodnje ksantana na kultivacionom medijumu sa sirovim glicerolom iz domaćih pogona za dobijanje biodizela.



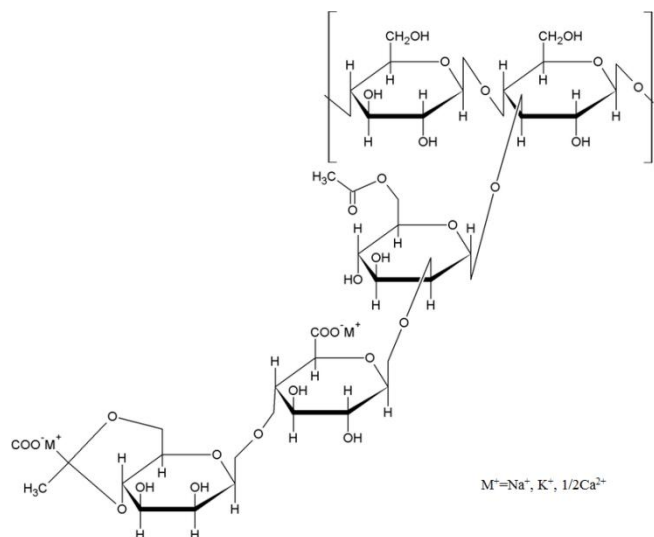
### 3. PREGLED LITERATURE

Održivi razvoj predstavlja jednu od najaktuelnijih i najznačajnijih oblasti istraživanja današnjice. Intenzivna eksploatacija prirodnih resursa, nekontrolisano odlaganje otpada, klimatske promene i zagađenje životne sredine, potencijalne su opasnosti po živi svet i neophodno je što pre pronaći adekvatna, a pre svega održiva rešenja navedenih problema. Kao jedno od obećavajućih rešenja, koja su u skladu sa osnovnim principima održivog razvoja, izdvaja se valorizacija otpada kao sirovine u postupcima dobijanja tržišno vrednih proizvoda (Makkar i sar., 2011; Jayathilakan i sar., 2012). Pored toga, poslednjih decenija biopolimeri mikrobiološkog porekla proizvedeni na najrazličitijim sirovinama, uključujući i one koje su obnovljive, dostigli su veliku popularnost kao alternativa sintetskim polimerima (Wani i Sayyed, 2014). Međutim, bitno je napomenuti da, iako veliki broj mikroorganizama poseduje sposobnost biosinteze polimernih jedinjenja, samo nekoliko biopolimera mikrobiološkog porekla ima industrijsku primenu (Öner, 2013). U nastavku će biti objedinjeni i navedeni podaci iz dostupne naučne literature o komercijalno najznačajnijem mikrobiološkom polisaharidu, ksantanu, standardnom biotehnološkom postupku proizvodnje ovog biopolimera, kao i o mogućnostima njegove proizvodnje na medijumu sa sirovim glicerolom kao potencijalnom sirovinom. Takođe, u okviru ovog poglavlja biće sumirane i osnovne informacije koje se odnose na korake koje treba sprovesti prilikom razvoja novog biotehnološkog postupka za proizvodnju ksantana, kao i na primenu savremenih tehnika za modelovanje i optimizaciju biotehnoloških procesa.

#### 3.1. KSANTAN-MIKROBIOLOŠKI BIOPOLIMER

Ksantan (eng. *Xanthan*) predstavlja jedan od najznačajnijih polisaharida mikrobiološkog porekla. Ovaj složeni heteropolisaharid još se naziva i ksantan guma i guma od kukuruznog šećera (Nordin i sar., 2020). Ksantan nastaje metaboličkom aktivnošću bakterija roda *Xanthomonas*, na kultivacionom medijumu odgovarajućeg sastava i pri optimalnim procesnim uslovima, kao ekstracelularni sekundarni metabolit (García-Ochoa i sar., 2000). Prvi put je biosintetisan 1959. godine u laboratorijama istraživačkog centra iz Sjedinjenih Američkih Država koji je tada nosio naziv *Northern Regional Research Laboratories*, a danas *The National Center for Agricultural Utilization Research* (Born i sar., 2005; Berninger i sar., 2021). Industrijska proizvodnja ksantana prvi put je izvedena 1960. godine, a zvanično je komercijalna proizvodnja ksantana pod nazivom *Kelzan* započeta u Sjedinjenim Američkim Državama 1964. godine (Born i sar., 2005; Nordin i sar., 2020). Američka Uprava za hranu i lekove (FDA, engl. *Food and Drug Administration*) 1969. godine odobrila je primenu ksantana u proizvodnji hrane za američko tržište. Godine 1980. primena ksantana u prehrambenoj industriji odobrena je i u Evropi kada mu je i dodeljena oznaka E 415 (Kumar i sar., 2018). U današnje vreme, najznačajniji proizvođači ksantana su: *Jungbunzlauer* (Švajcarska), *ADM* (SAD), *Cargill* (SAD), *CP Kelco* (SAD), *IFF* (SAD), *Deosen Biochemicals* (Kina), *Fufeng Group* (Kina) i *Meihua Group* (Kina) (Berninger i sar., 2021). Budući da potražnja za ksantanom konstantno raste, procenjuje se da će njegova tržišna vrednost u 2023. godini iznositi 1184 miliona američkih dolara, a prema predviđanjima kompanije *GlobeNewswire* do 2026. godine proizvodnja ksantana će se povećati na nešto više od 1403 miliona američkih dolara.

Osnovnu strukturu molekula ksantana, kojeg biosintetiše referentni proizvodni soj, čine D-glukoza, D-manoza i D-glukuronska kiselina u molaskom odnosu 2:2:1, dok sporedni strukturni niz ksantana čine acetil- i piruvat- ostaci u varirajućem odnosu (Rosalam i England, 2006). Sa slike 3.1. se uočava da je molekul ksantana razgranat i da se sastoji od linearnog dela (osnovnog lanca) i grana (bočnih lanaca). Molekuli glukoze su povezani  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glikozidnom vezom formirajući osnovni celulozni lanac. Svaki drugi ostatak glukoze osnovnog celuloznog lanca nosi trisaharidni bočni niz vezan  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glikozidnom vezom. Bočni lanac čine  $\alpha$ -D-manoza za koju je  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2)-glikozidnom vezom vezana  $\beta$ -D-glukuronska kiselina.  $\beta$ -D-manoza predstavlja poslednju gradivnu jedinicu u trisaharidnom bočnom nizu i vezana je za  $\beta$ -D-glukuronsku kiselinu  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glikozidnom vezom. Acetil- grupe unutar molekula ksantana su vezane na C-6 atom izvesnih jedinica  $\alpha$ -D-manoze, a pirogroždana kiselina vezana je za C-4 i C-6 atom  $\beta$ -D-manoze, ketalnom vezom. Karboksilne grupe glukuronske i pirogroždane kiseline zastupljene su u obliku Na, K i Ca soli (Quinten i sar., 2011).



Slika 3.1. Struktura molekula ksantana (Quinten i sar., 2011)

Bočni trisaharidni lanci učvršćuju osnovni lanac formirajući konformacije u vidu jednostruke, dvostruke ili trostruke spirale koje zajedno sa drugim molekulima polimera formiraju kompleksnu strukturu ksantana (Palaniraj i Jayaraman, 2011). Spiralna konformacija ksantana odgovorna je za pseudoplastične karakteristike njegovih rastvora (Lochhead, 2017).

Ksantan je rastvorljiv u vodi i njegove rastvore karakterišu visoke vrednosti viskoziteta čak i pri niskim koncentracijama biopolimera (Sharma i sar., 2006). Viskozitet rastvora ksantana zavisi od temperaturnih uslova rastvaranja i brzine hlađenja, s obzirom da temperatura značajno utiče na spiralnu konformaciju ovog biopolimera. Pri niskim temperaturama spiralna konformacija je uređena, dok veće temperature preko 100°C dovode do neuređenosti konformacije ksantana i opadanja viskoziteta rastvora (García-Ochoa i sar., 2000; Lochhead, 2017). Viskozitet rastvora ksantana opada pri niskim koncentracijama soli, usled smanjenja intermolekularnih interakcija. Međutim, viskozitet rastvora ksantana postaje nezavisan od koncentracije soli ukoliko je ova koncentracija veća od 0,1%(w/v). Iz navedenog razloga jasno je da je ksantan veoma pogodan

reološki modifikator za rastvore koji sadrže jone i formulacije koje se pripremaju u širokom opsegu koncentracija soli (Lochhead, 2017). Rastvori ksantana pokazuju stabilnost pri širokom rasponu vrednosti pH sredine, i to od 1 do 13 (García-Ochoa i sar., 2000).

Prosečna vrednost molekulske mase ksantana kreće se od  $2 \cdot 10^5$  g/mol do  $5 \cdot 10^7$  g/mol (Papagianni i sar., 2001; Rončević i sar., 2014). Molekulska masa ksantana direktno je povezana sa reološkim svojstvima njegovih rastvora zbog čega se smatra značajnim pokazateljem njegovog kvaliteta. Budući da i veličina polimernog lanca i njegova struktura utiču na viskozitet rastvora ksantana, oba parametra su od izuzetne važnosti za primenu ksantana (Lochhead, 2017). Zahvaljujući svojim izuzetnim reološkim karakteristikama, netoksičnosti, biokompatibilnosti i biorazgradivosti našao je primenu u različitim granama industrije, i to prehrambenoj, farmaceutskoj, naftno-petrohemijskoj, hemijskoj i drugim (Petri, 2015). U tabeli 3.1. prikazane su različite mogućnosti primene ksantana.

Tabela 3.1. Primena ksantana u različitim granama industrije (Becker i sar., 1998; Palaniraj i Jayaraman, 2011)

	Koncentracija (% w/w)	Funkcija
<b>Prehrambena industrija</b>		
Dresing za salate	0,10-0,50	Olakšava tečljivost
Peciva	0,05-0,30	Vezuje vodu, poboljšava teksturu
Napici	0,05-0,20	Poboljšava ukus, suspendujući agens, stabilizator pene
Gotova jela	0,10-0,30	Stabilizator
Supe i umaci	0,05-0,50	Poboljšava temperaturnu stabilnost, sprečava separaciju
Mlečni i mesni proizvodi	0,05-0,50	Stabilizator emulzije, inhibira izdvajanje tečnosti
<b>Kozmetička industrija</b>		
Pasta za zube	0,70-1,00	Obezbeđuje lako istiskivanje
Kreme i losioni	0,20-0,50	Stabilizator, daje kremastu konzistenciju
Šamponi	0,20-0,50	Kontroliše reologiju, suspendujući agens
<b>Hemijska industrija</b>		
Hemikalije u poljoprivredi	0,10-0,30	Suspendujući agens, kontroliše zadržavanje
Sredstva za čišćenje	0,20-0,70	pH stabilizator, produžava vreme kontakta
Boje na bazi vode	0,10-0,30	Kontroliše reologiju i penetraciju
Tekstil i štampa na tepisima	0,20-0,50	Poboljšava obradu, kontroliše migracije boje
Abrazivi	0,10-0,30	Kontroliše reologiju
Industrija papira	0,10-0,20	Suspendujući agens i reološku kontrolu
Bušenje nafte	0,10-0,40	Obezbeđuje dobru stabilnost soli i temperature
<b>Farmaceutska industrija</b>		
Suspenzije i emulzije	0,10-0,50	Obezbeđuje odličnu stabilnost i dobar tok
Tablete	1,00-3,00	Ubrzava oslobađanje leka

Ksantan se u prehrambenoj industriji koristi u cilju sprečavanja sedimentacije i raslojavanja proizvoda tokom skladištenja. Ovaj biopolimer koristi se i kao stabilizator pene i emulzija, te kao suspendujući ili želirajući agens. U smeši sa galaktomananima, kao što je guma rogača, ksantan se može koristiti kao dodatak pudinzima i umacima (Luyten, 1993). Takođe se može koristiti kao zamena za jaja u pecivima, za smanjenje sadržaja belanceta bez uticaja na izgled i ukus proizvoda. Ksantan doprinosi glatkoći, poboljšava zapreminu i teksturu, ali ima i značajnu ulogu u redukciji kalorija peciva i bezglutenskih hlebova (Palaniraj i Jayaraman, 2011). Kada je u pitanju farmaceutska industrija ksantan se koristi kao antioksidujući agens (Shimada i sar., 1996) i sredstvo za raspadanje tableta (Đaković, 1990). Često se koristi i u proizvodima kozmetičke industrije kao suspendujući agens, stabilizator i hidrirajuće sredstvo (Palaniraj i Jayaraman, 2011). U proizvodima za ličnu higijenu poboljšava svojstva tečenja šampona i tečnih sapuna, a predstavlja i dobro vezivo u pastama za zube i različitim gelovima (Rosalam i England, 2006). Ksantan se koristi i kao aditiv za poboljšanje viskoziteta u sekundarnoj i tercijarnoj eksploataciji i transportu nafte (García-Ochoa i sar., 2000). U industriji boja i lakova ksantan se koristi kao stabilizator emulzija u proizvodnji tiksotropnih boja i kao stabilizator pene. Ksantan takođe ima značajnu primenu u agrohemiji gde se koristi kao suspendujuća komponenta u tečnim pesticidima i đubrivima, te kao suspedujući agens u prevlakama za papir i tekstil (Sutherland, 1998).

## 3.2. BIOTEHNOLOŠKA PROIZVODNJA KSANTANA

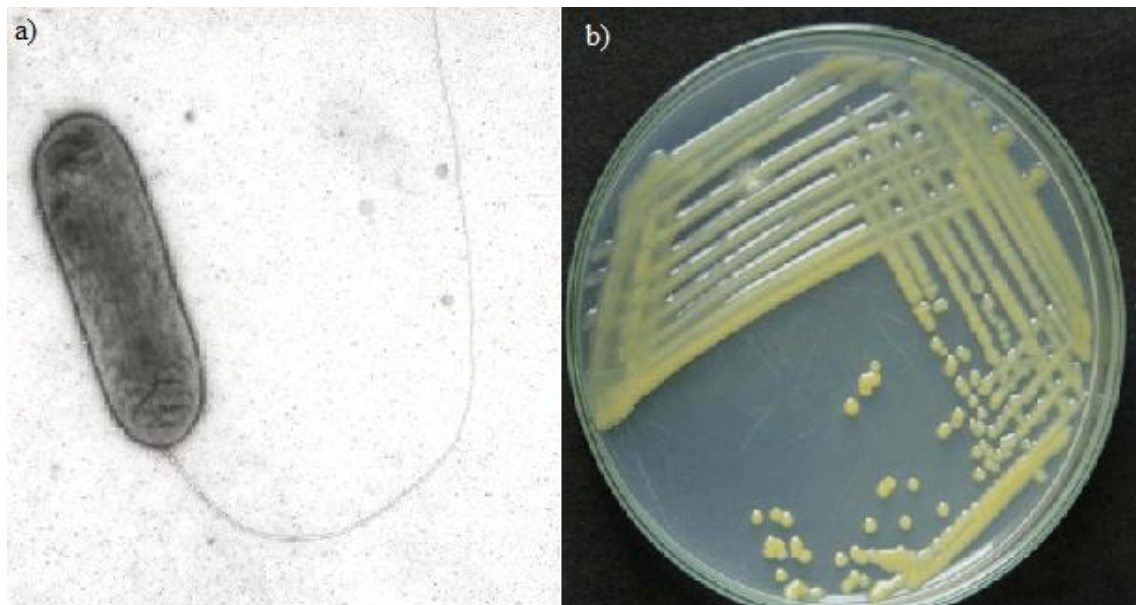
Biotehnološki postupak proizvodnje ksantana u industrijskim uslovima izvodi se u više faza koje su se tokom godina značajno unapredile u tehnološkom smislu. Ovo usavršavanje je vođeno konstantnom težnjom da se postigne što veći prinos i kvalitet biopolimera uz minimalne troškove. Biosinteza ksantana vrši se submerznom aerobnom kultivacijom čiste kulture *X. campestris* u medijumu odgovarajućeg sastava u optimalnim uslovima, diskontinualnim postupkom, u bioreaktorima sa mehaničkim mešanjem i prinudnom aeracijom. Po završenoj biosintezi ksantan se izdvaja i prečišćava u stepenu koji zavisi od njegove krajnje primene. Završne faze proizvodnje ksantana obuhvataju sušenje, mlevenje i pakovanje (García-Ochoa i sar., 2000; Dodić i Grahovac, 2013). U daljem tekstu biće detaljnije opisani faktori koji utiču na samu biosintezu ksantana, a samim tim i na uspešnost izvođenja proizvodnog postupka.

### 3.2.1. Proizvodni mikroorganizam

Prvi korak u biotehnološkoj proizvodnji ksantana predstavlja odabir odgovarajućeg proizvodnog mikroorganizma. Do današnjeg dana je otkriven veliki broj vrsta roda *Xanthomonas* koje poseduju sposobnost biosinteze ksantana (Demirci i sar., 2019). Svi pripadnici roda *Xanthomonas* su fitopatogeni i izazivaju infekcije velikog broja biljaka uključujući i one koje su od velikog značaja za poljoprivredu, kao što su kupus, paprika, paradajz i druge (Gumus i sar., 2010). Iako je naučno dokazano da sojevi bakterija *X. campestris*, *Xanthomonas malvacearum*, *Xanthomonas phaseoli* i *Xanthomonas axonopodis* imaju izražene proizvodne karakteristike, i dalje se za biotehnološku proizvodnju ksantana u industrijskim razmerama najčešće primenjuje referentni soj *X. campestris* ATCC 13951 (Leela i Sharma, 2000; Anbuselvi i sar., 2012).

### 3.2.1.1. *X. campestris*

Taksonomski *X. campestris* su bakterije iz roda *Xanthomonas*, koji pripada porodici *Xanthomonadaceae*, redu *Xanthomonadales*, klasi *Gamma Proteobacteria*, razdelu *Proteobacteria* u carstvu *Bacteria*. *X. campestris* su gram-negativne asporogene štapićaste bakterije, širine od 0,4  $\mu\text{m}$  do 0,7  $\mu\text{m}$  i dužine od 0,7  $\mu\text{m}$  do 1,8  $\mu\text{m}$ . Uglavnom se javljaju kao pojedinačne. Pokretne su, a kretanje ostvaruju jednom polarnom flagelom (monotrihe) koja je obično dužine od 1,7  $\mu\text{m}$  do 3,0  $\mu\text{m}$  (García-Ochoa i sar., 2000). Njihove kolonije su na površini agara glatke, okrugle i buterne konzistencije, a na medijumu sa glukozom su najčešće sluzaste, ispupčene i sjajne. Kada su vidljive golim okom, kolonije su transparentne i meke, blede žute boje, a ova žuta boja kolonija potiče od pigmenta ksantomonadina. Mikroskopski izgled ćelija bakterija roda *Xanthomonas*, kao i izgled rasta ovih bakterija na komercijalnom medijumu PSA (engl. *peptone-sucrose-agar*) prikazani su na slici 3.2.a-b. *X. campestris* su obligatno aerobne bakterije. Rastu na temperaturi od 7°C do 39°C, a optimalna temperatura za njihov rast nalazi se u opsegu od 25°C do 30°C (García-Ochoa i sar., 2000).



Slika 3.2. Bakterija roda *Xanthomonas*: a) mikroskopski izgled ćelije (Janse i sar., 2001); b) rast kolonija na agarizovanom medijumu u Petri ploči (Ranjani i sar., 2018);

U pogledu fizioloških osobina bakterije roda *Xanthomonas* su hemoorganotrofi. Katalaza su pozitivni, oksidaza negativni ili slabo pozitivni.  $\text{H}_2\text{S}$  su pozitivni, indol negativni, dok nitrata ne redukuju. Poseduju sposobnost proizvodnje kiseline bez gasa iz arabinoze, ksiloze, glukoze, galaktoze, manoze, laktoze, maltoze, saharoze, dekstrina, rafinoze, glicerola i manitola, ali ne i iz skroba, eskulina, dulcita (galaktitol), ramnoze, inulina, itd. Većina bakterija ovog roda brzo hidrolizuje skrob, glutaminsku i nikotinsku kiselinu. U pogledu fiziologije bakterija roda *Xanthomonas* značajan je podatak da im asparagin može poslužiti kao pogodan izvor azota u medijumu sa glukozom (kao izvorom ugljenika), ali ne može biti istovremeno i izvor ugljenika i azota (Saddler i Bradbury, 2005).

### 3.2.2.2. Druge *Xanthomonas* vrste

Predstavnici roda *Xanthomonas* su gram-negativne asporogene štapićaste bakterije i obligatni u aerobi. Pored vrste *X. campestris*, *Xanthomonas euvesicatoria* su veoma rasprostranjene bakterije roda *Xanthomonas* na teritoriji Republike Srbije (Ignjatov i sar., 2010; Pajčin i sar., 2020). Njihove kolonije na medijumu sa glukozom su okrugle, ispupčene i sjajne, sluzastog izgleda, svetložute do žuto-smeđe boje, tipične za bakterije roda *Xanthomonas*. Rastu na temperaturi od 7°C do 39°C, a optimalna temperatura za rast nalazi se u opsegu od 25°C do 30°C. Bakterije vrste *X. euvesicatoria* razlažu glukozu oksidativno, ne redukuju nitrate, hidrolizuju želatin i eskulin, ne razlažu škrob, katalaza su pozitivni, oksidaza i pektinaza negativni. Poseduju sposobnost sinteze kiseline iz manoze, D-arabinoze, D-glukoze, D-galaktoze i dekstrina. Pri koncentraciji 0,02% trifenil-tetrazolijum-hlorida (TTC) u medijumu razvoj bakterija je potpun, dok koncentracija od 0,1% inhibira njihov rast. Bakterije *X. euvesicatoria* najčešće uzrokuju oboljenja paprika (Ignjatov i sar., 2010).

*Xanthomonas perforans* obrazuje konveksne, mukoidne kolonije žute boje. Oksidaza, amilaza i pektinaza su pozitivni. Veoma dobro metabolišu dekstrin, N-acetil-D-glukozaminid, D-galaktozu, gentibiozu, laktulozu, sirćetnu kiselinu, malonsku kiselinu, propionsku kiselinu, D-alanin i L-treonin (Aiello i sar., 2013). *X. perforans* je važan uzročnik bakterijskih oboljenja povrća, posebno paradajza. Ove bakterije mogu da prežive i 10 godina unutar semena biljke (Umesha i Avinash, 2015).

*Xanthomonas gardneri* predstavljaju bakterije čije su kolonije na površini agara žute boje. Bakterije *X. gardneri* su specifične u pogledu metabolisanja različitih jedinjenja. Maltoza i celobioza su pozitivne, dok škrob, glikogen, D-manitol, turanozu, asparagin, asparaginsku kiselinu, L-treonin, inozin, uridin, butandiol i glicerol ne metabolišu (Aleksandrova i sar., 2014). Predstavnici navedenog roda su uzročnici bakterijskih oboljenja paradajza i paprike (Jones i sar., 2004).

*Xanthomonas pruni* su širine od 0,2 µm do 0,4 µm i dužine od 0,8 µm do 1,0 µm. Pokretne su, a kretanje ostvaruju jednom polarnom flagelom. Njihove kolonije su na površini agara glatke, okrugle i žute boje. Ove bakterije su obligatni aerobi, a optimalna temperatura za njihov rast nalazi se u opsegu od 24°C do 29°C. Kiselinu proizvode iz arabinoze, ksiloze, glukoze, fruktoze, galaktoze, manoze, maltoze, laktoze i saharoze. Bakterije *X. pruni* uzrokuju oboljenja šljive, breskve i kajsije (Saddler i Bradbury, 2005).

*Xanthomonas citri* formiraju glatke, okrugle, ispupčene kolonije žute boje, a ćelije ovih bakterija su širine od 0,5 µm do 0,7 µm i dužine od 1,5 µm do 2,0 µm. Kretanje ostvaruju jednom polarnom flagelom. Optimalna temperatura za njihov rast nalazi se u opsegu od 25°C do 34°C. Poseduju sposobnost produkcije H<sub>2</sub>S. Ne proizvode gas iz glukoze, laktoze i manitola. Bakterije *X. citri* je moguće izolovati sa različitih citrusa (Saddler i Bradbury, 2005).

*X. malvacearum* na površini agara formiraju kolonije koje su glatke, okrugle, sjajne i blede žute boje. Optimalna temperatura za njihov rast nalazi se u opsegu od 25°C do 30°C. Poseduju sposobnost produkcije H<sub>2</sub>S. Kiselinu proizvode iz glukoze, galaktoze, ksiloze, laktoze, maltoze, saharoze, glicerola i inulina. Bakterije *X. malvacearum* ne fermentišu arabinotu, manitol, kao ni soli formijatne, oksalne i vinske kiseline. Predstavnici navedene vrste su uzročnici bakterijskih oboljenja listova pamuka (Saddler i Bradbury, 2005).

*Xanthomonas oryzae* formiraju kolonije koje su na površini agara glatke, okrugle, sjajne i žute boje. Optimalna temperatura za njihov rast nalazi se u opsegu od 26°C do 30°C. Kiselinu proizvode iz glukoze, laktoze i saharoze. *X. oryzae* je važan uzročnik bakterijskih oboljenja pirinča (Saddler i Bradbury, 2005).

Zanimljiva je činjenica da različiti ksantanogeni sojevi na medijumima istog sastava i pod identičnim procesnim uslovima proizvode različitu količinu ksantana različite molekulske mase, a samim tim i kvaliteta. Naime, makromolekuli ksantana u ovom slučaju imaju isti osnovni deo strukture, ali sadržaj grupa povezanih sa osnovnim delom može biti različit. Razlike u sastavu i konformaciji molekula ksantana posledica su pojave da različite vrste roda *Xanthomonas* poseduju različite metaboličke puteve i cikluse (Saddler i Bradbury, 2004). Iz ovog razloga veoma je mali broj sojeva interesantnih za industrijsku proizvodnju ksantana. Međutim, pažnja naučne javnosti još uvek je u velikoj meri usmerena ka izolovanju sojeva sa izraženim proizvodnim karakteristikama iz prirodnog okruženja. Iako postoje naznake da izolati iz prirodnog okruženja imaju ogroman potencijal, postupak izolacije, a zatim i komercijalne upotrebe ovih sojeva kao proizvodnih je veoma zahtevan i dugotrajan (Rosalam i England, 2006; Gumus i sar., 2010).

### 3.2.2. Kultivacioni medijumi

Sastav kultivacionih medijuma predstavlja značajan faktor koji utiče na uspešnost biosinteze ksantana. Proizvodni mikroorganizam potražuje različitu formulaciju nutrijenata za rast i razmnožavanje sa jedne strane i biosintezu ksantana sa druge. Stoga se, u zavisnosti od faze postupka proizvodnje ksantana koriste medijumi različitog sastava. Prema tome, razlikuju se medijumi za pripremu inokuluma i medijumi za biosintezu ksantana (Dodić i Grahovac, 2013).

Uzimajući u obzir prethodno navedeno, za pripremu inokuluma neophodno je obezbediti medijum tako definisanog sastava kojim se postiže brz rast proizvodnog mikroorganizma (García-Ochoa i sar., 2000). Kultivacioni medijumi koji se koriste za pripremu inokuluma u proizvodnji ksantana obavezno sadrže izvore ugljenika i azota. Fermentabilni šećeri poput glukoze, fruktoze, saharoze i maltoze predstavljaju najpogodnije izvore ugljenika u kultivacionim medijumima za pripremu inokuluma, dok se kao najpogodniji izvori azota u ovom medijumu koriste amonijumove soli, pepton ili tripton. Mikronutrijenti koji se takođe nalaze u medijumu za pripremu inokuluma su izvori kalijuma i fosfora koji se dodaju u vidu kalijumovih soli fosforne kiseline, kao i izvori magnezijuma i sumpora u obliku magnezijumove soli sumporne kiseline (Dodić i Grahovac, 2013).

Bakterije roda *Xanthomonas* proizvode ksantan kao ekstracelularni sekundarni metabolit i stoga je jasno da je za proizvodnju ovog biopolimera neophodan kultivacioni medijum koji favorizuje biosintezu ksantana uz limitiran rast biomase. Slično kao medijum za pripremu inokuluma i medijum za biosintezu ksantana sadrži makronutrijente, ugljenik, azot i fosfor, kao i mikronutrijente, kalijum, magnezijum i kalcijum (García-Ochoa i sar., 2000). Najčešće se kao izvori ugljenika u ovim medijumima koriste glukoza i saharoza. Međutim, porast cene i sve veća potražnja za ovim šećerima ukazuju na potrebu primene alternativnih supstrata manje tržišne vrednosti (Sujithra i sar., 2019). Iz navedenog razloga sve je češća pojava da se polusintetički medijumi i kultivacioni medijumi kompleksnog sastava, bazirani na biodegradabilnim otpadnim

tokovima i sporednim proizvodima različitih grana industrije, koriste kao medijumi za biosintezu ksantana (Ghashghaei i sar., 2016; Li i sar., 2016). Izvori ugljenika u polusintetičkim medijumima su tehnička glukoza, skrob, melasa, javorov sirup, ječmeni slad, proteini surutke, glicerol i drugi (Dodić i Grahovac, 2013; Biswa i sar., 2015; Trindade i sar., 2015), a kada su u pitanju kompleksni medijumi rezultati brojnih naučnih istraživanja ukazuju na mogućnost biosinteze ksantana ako se kao sirovine koriste kuhinjski otpad (Li i sar., 2016) ili industrijski efluenti, kao što su otpadni tokovi konditorske industrije (Bajić i sar., 2014), glicerol iz proizvodnje biodizela (Brandão i sar., 2013), otpadna voda od ispiranja tropa koja se generiše tokom proizvodnje piva (Dodić i sar., 2011), otpadne vode vinarija (Bajić i sar., 2015a; Rončević i sar., 2017), surutka (Gilani i sar., 2011), melasa (Gomashe i sar., 2013) i brojni drugi.

Prema podacima iz dostupne naučne literature preporučuje se da, u cilju postizanja što veće produkcije ksantana, maksimalna koncentracija izvora ugljenika u medijumu ne prelazi 5%(w/v) (Leela i Sharma, 2000). Rezultati naučnih istraživanja pokazali su da se ksantan u najvećoj količini produkuje u medijumu sa 2-4%(w/v) fermentabilnih šećera, dok se najveći stepen konverzije izvora ugljenika u ksantan ostvaruje kada je kultivacioni medijum za biosintezu obogaćen sa oko 1%(w/v) šećera (Souw i Demain, 1979; García-Ochoa i sar., 2000).

Iako ne predstavlja strukturnu komponentu ksantana, azot predstavlja veoma značajan nutrijent u medijumu za biosintezu ksantana. Izvor azota je limitirajući nutrijent za umnožavanje biomase jer njegovim iscrpljenjem dolazi do usporavanja rasta ćelija proizvodnog mikroorganizma i samim tim favorizuje se biosinteza ksantana. Shodno tome, u cilju proizvodnje ksantana u što većoj količini potrebno je da odnos ugljenika i azota u kultivacionom medijumu za biosintezu bude što je moguće veći (Carignatto i sar., 2011). Kao izvori azota u ovim medijumima koriste se organski i neorganski izvori. Ekstrakt kvasca, pepton, sojino brašno i hidrolizati kazeina najčešće su korišćeni organski izvori azota, dok se kao neorganski izvori azota uglavnom koriste amonijumove i nitratne soli (Palaniraj i Jayaraman, 2011).

Mikronutrijenti koji ulaze u sastav medijuma za biosintezu ksantana su kalijum, magnezijum i fosfor. Obično se dodaju u obliku lako rastvornih soli, tačnije u vidu sulfata i fosfata (Dodić, 2000).

### 3.2.3. Procesni uslovi

Procesni uslovi poput temeperature, vrednosti pH, brzine mešanja, intenziteta aeracije, ali i sterilnost i vreme trajanja bioprocesa u značajnoj meri utiču na uspešnost izvođenja biotehnološkog postupka proizvodnje ksantana. Vrednosti navedenih parametara podešavaju se shodno krajnjem cilju proizvodnog postupka jer se optimalni uslovi za postizanje visokog prinosa ksantana razlikuju od optimalnih uslova za biosintezu ksantana visokog kvaliteta (García-Ochoa i sar., 2000).

Sterilni uslovi su izrazito značajni tokom biotehnološke proizvodnje ksantana i iz ovog razloga se ksantan uglavnom proizvodi diskontinualno. Na taj način rizik od kontaminacije je smanjen, a kontrola procesnih parametara je olakšana. Za biosintezu ksantana neophodno je prethodno obezbediti čistu kulturu proizvodnog mikroorganizma, a potom i sterilnost posuđa, kultivacionih



medijuma, bioreaktora, vazduha za aeraciju, kao i svih dodataka koji se koriste tokom izvođenja bioprocasa (Dodić i Grahovac, 2013).

Temperatura predstavlja procesni parametar koji značajno utiče na uspešnost biosinteze ksantana. Optimalna temperatura za intenzivan rast i umnožavanje ćelija proizvodnog mikroorganizma kreće se od 24°C do 27°C, dok se optimalna vrednost ovog parametra za biosintezu ksantana nalazi u opsegu od 30°C do 33°C. Ukoliko ne postoji mogućnost regulacije temperature tokom izvođenja bioprocasa, uobičajeno je da se biosinteza ksantana odvija na 28°C (García-Ochoa i sar., 2000). Pored toga što utiče na kvantitet, temperatura značajno utiče i na kvalitet ksantana. Izvođenjem bioprocasa na temperaturi u intervalu od 25°C do 28°C dobija se ksantan koji u svom molekulu sadrži više acetanih i piruvatnih grupa u odnosu na biopolimer biosintetisan na temperaturi u opsegu od 31°C do 34°C. S obzirom da su struktura i kvalitet ksantana u direktnoj vezi sa njegovom molekulskom masom, jasno je da se biopolimer većih molekulskih masa, a samim tim i boljeg kvaliteta sintetiše pri nižim temperaturama (Casas i sar., 2000).

Vrednost pH kultivacionog medijuma predstavlja još jedan parametar značajan za uspešnost biosinteze ksantana. Za intenzivnu biosintezu ksantana optimalna vrednost pH nalazi se između 7,0 i 8,0, dok se optimalna vrednost ovog parametra za rast i razmnožavanje bakterija roda *Xanthomonas* kreće između 6,0 i 7,5. Uzimajući u obzir sve navedeno, inicijalna vrednost pH kultivacionog medijuma za proizvodnju ksantana uglavnom se podešava na 7,0 (Sherley i Priyadharshi, 2015). Zbog produkcije organskih kiselina i ksantana, koji sadrži kisele funkcionalne grupe, vrednost pH medijuma opada tokom trajanja biosinteze. Kritična vrednost pH za biosintezu ksantana iznosi oko 5,5. Ispod ove vrednosti ne dolazi do biosinteze pomenutog biopolimera. U toku bioprocasa vrednost pH se koriguje sterilnim rastvorom baze, najčešće KOH i NaOH, pri čemu regulacija ovog procesnog parametra ne utiče na kvalitet ksantana (García-Ochoa i sar., 2000). Prema literaturnim podacima, najveća uspešnost ovog bioprocasa postiže se ukoliko se vrednost pH tokom trajanja biosinteze održava u opsegu od 6,0 do 8,0 (Mirik i sar., 2011).

Potrebe mikroorganizama za kiseonikom su različite u različitim fazama bioprocasa i zavise od velikog broja faktora, a optimalan sadržaj kiseonika za rast ćelija ne mora uvek da bude optimalan i za biosintezu željenog metabolita. Bakterije roda *Xanthomonas* su obligatni aerobi i zahtevaju prisustvo kiseonika za rast i metaboličke aktivnosti (Rye i sar., 1988). Kiseonik se u kultivacioni medijum unosi aeracijom, koja se obezbeđuje mešanjem medijuma i provođenjem vazduha (Becker i sar., 1998). Sadržaj kiseonika u kultivacionom medijumu se smanjuje tokom trajanja bioprocasa usled potrošnje ovog elementa za biosintezu ćelijskih konstituenata, rast biomase i obezbeđivanje energije, ali i za produkciju gasovitih proizvoda metabolizma proizvodnog mikroorganizma (Dodić i Grahovac, 2013). Kritična vrednost sadržaja kiseonika u fazi biosinteze ksantana nalazi se između 6%(v/v) i 10%(v/v), međutim, ispod 6%(v/v) pored smanjene sposobnosti biosinteze ksantana dolazi i do značajnog pada specifične brzine usvajanja kiseonika od strane proizvodnog mikroorganizma (Amanullah i sar., 1998). Podaci iz dostupne literature sugerišu da osim na prinos ksantana, dostupnost kiseonika značajno utiče i na kvalitet ovog biopolimera (Sriram i Sureshkumar, 1999).

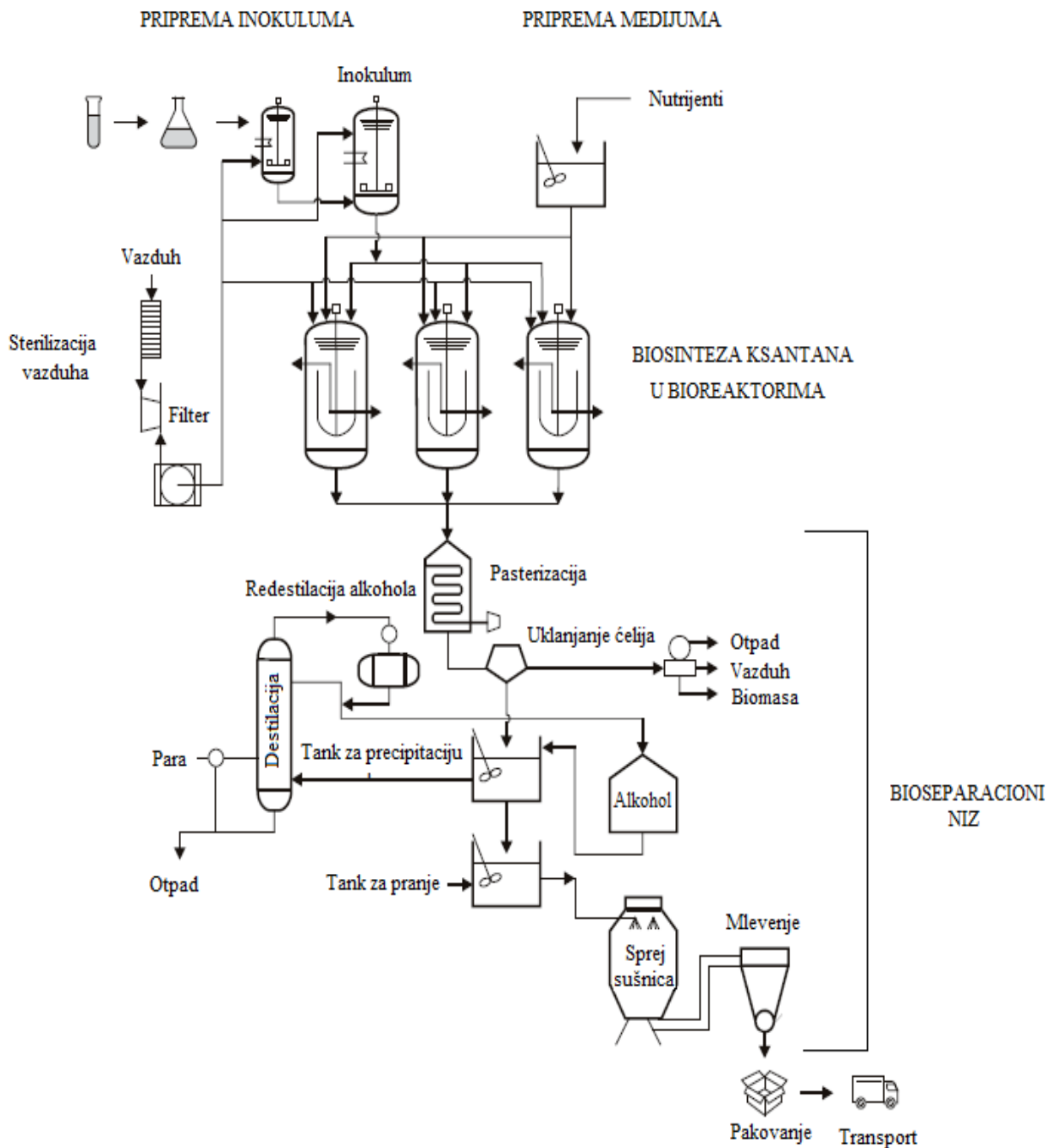
Sadržaj rastvorenog kiseonika usko je povezan sa brzinom mešanja kultivacionog medijuma. Mešanjem se postiže homogenizacija ukupne zapremine medijuma i na taj način se obezbeđuju

optimalni uslovi za željenu metaboličku aktivnost proizvodnog mikroorganizma. Veoma je važno da intenzitet aeracije i brzina mešanja budu adekvatno uspostavljeni kako bi se ostvarila što bolja razmena kiseonika između medijuma i vazduha koji se disperguje (García-Ochoa i sar., 2000). Intenzitet mešanja uslovljen je energetsom efikasnošću primenjene operacije, pojavom pene usled mešanja i aeracije, prividnim povećanjem zapremine medijuma (ograničena zapremina bioreaktora) i negativnim delovanjem smicajnih sila na proizvodni mikroorganizam. Svaki aerobni mikrobiološki proces zahteva mešalice pogodne geometrije i adekvatan intenzitet brzine mešanja (Dodić i Grahovac, 2013). Tokom izvođenja biosinteze ksantana u klasičnim bioreaktorima sa mehaničkim mešanjem i prinudnom aeracijom obično se intenzitet aeracije održava konstantnim, dok brzina mešanja može, ali i ne mora biti konstantna. Ukoliko se bioproces izvodi pri konstantnoj brzini mešanja manjoj od 500 o/min, biosinteza ksantana je smanjena usled ograničenog prenosa mase kiseonika u medijumima čiji je viskozitet povećan zbog produkcije ovog biopolimera. Ukoliko se proizvodnja ksantana odvija u uslovima intenzivnog mešanja pri brzini većoj od 500 o/min, a održava se konstantnom u toku bioprocasa, takođe ne dolazi do povećanja produktivnosti usled pojave mehaničkih oštećenja ćelija proizvodnog mikroorganizma. U cilju rešavanja ovog problema neophodno je optimizovati vrednost brzine mešanja u konkretnim uslovima proizvodnje. Obično se brzina mešanja tokom bioprocasa proizvodnje ksantana kreće od 200 o/min do 300 o/min na početku kultivacije, a potom se povećava na željenu vrednost u skladu sa krajnjim ciljem proizvodnog postupka (García-Ochoa i sar., 2000). Dostupni literaturni podaci ukazuju na to da se povećanjem brzine mešanja povećava molekulska masa ksantana (Ramirez i sar., 1988).

Vreme trajanja kultivacije takođe značajno utiče na proizvodnju ksantana, njegov kvalitet i strukturu (Psomas i sar., 2007; Borges i sar., 2008). Različiti mikroorganizmi metabolišu određene izvore ugljenika za različito vreme i shodno tome, biosintetišu željeni proizvod za različito vreme. Generalno, vreme trajanja biosinteze ksantana kreće se u opsegu od 72 h do 120 h (Psomas i sar., 2007; Reis i sar., 2010; Bajić i sar., 2015b), dok je u nekim istraživanjima vreme trajanje biosinteze ksantana iznosilo 168 h (Rončević i sar., 2014). Prema podacima iz dostupne naučne literature povećanje vremena trajanja kultivacije pozitivno utiče na sadržaj piruvata unutar molekula ksantana, što direktno utiče i na molekulska masu ovog biopolimera (Flores Candia i Deckwer, 1999). Dakle, prilikom izvođenja biosinteze ksantana neophodno je ustanoviti koji je to vremenski period za koji proizvodni mikroorganizam uspešno metaboliše korišćeni supstrat i produkuje ksantan zadovoljavajućeg kvaliteta i u željenoj količini.

#### **3.2.4. Proizvodni postupak**

Ksantan se na industrijskom nivou uobičajeno proizvodi submerznom kultivacijom referentnog soja *X. campestris* ATCC 13951 na medijumu odgovarajućeg sastava, u aerobnim uslovima i pri optimalnim vrednostima procesnih parametara, diskontinualno, u bioreaktorima odgovarajućih konstrukcionih karakteristika. Pojednostavljen šematski prikaz prikaz biotehnološkog postupka proizvodnje ksantana u industrijskim uslovima prikazan je na slici 3.3.



Slika 3.3. Šematski prikaz biotehnološkog postupka proizvodnje ksantana (De Monaco Lopes i sar., 2015)

Uspešnost biosinteze ksantana zavisi od odabira proizvodnog soja, formulacije sastava kultivacionog medijuma, primenjenih procesnih uslova, tipa bioreaktora i režima proizvodnje. Razlikuju se dva režima proizvodnje ksantana, diskontinualni i kontinualni. Proizvodnja ksantana, ali i rast proizvodnog mikroorganizma u velikoj meri zavise od toga koji od ova dva načina će biti primenjen (Palaniraj i Jayaraman, 2011). Diskontinualni postupak proizvodnje karakteriše lakša kontrola procesnih parametara i smanjen rizik od kontaminacije, dok kontinualni postupak obezbeđuje veću zapreminsku produktivnost, ujednačen kvalitet proizvoda i bolju kontrolu bioprocasa (Pejin, 2003). Glavni nedostatak primene kontinualnog postupka

proizvodnje predstavljaju teškoće vezane za očuvanje aseptičnih uslova u dužem periodu i upravo iz ovog razloga diskontinualni postupak je dominantan režim u proizvodnji ksantana (Rosalam i England, 2006)

Osnovne faze biotehnološkog postupka proizvodnje ksantana su (García-Ochoa i sar., 2000):

- osvežavanje proizvodne kulture i priprema inokuluma u laboratorijskim uslovima,
- priprema inokuluma u pogonskim uslovima,
- biosinteza ksantana i
- izdvajanje i prečišćavanje ksantana.

Svi sojevi proizvodnih mikroorganizama čuvaju se na polučvrstim hranljivim medijumima sa dodatkom  $\text{CaCO}_3$  uz obavezno mesečno presejavanje. Proizvodnja ksantana započinje osvežavanjem i umnožavanjem fiziološki aktivnih ćelija *X. campestris* u postupku pripreme inokuluma. Osvežavanje proizvodnog mikroorganizma vrši se na polučvrstom medijumu odgovarajućeg sastava a sam postupak je aeroban i odvija se na temperaturi od  $24^\circ\text{C}$  do  $26^\circ\text{C}$  u trajanju od  $24^\circ\text{C}$  do 48 h (Rončević, 2016).

Sledeći korak predstavlja umnožavanje ćelija, a započinje suspendovanjem ćelija sa polučvrstog medijuma za osvežavanje u tečni medijum za umnožavanje nakon čega sledi inkubacija koja se odvija na temperaturi od  $25^\circ\text{C}$  uz obavezno mešanje u trajanju od oko 24 h (Rončević, 2016). Umnožavanje ćelija proizvodnog mikroorganizma uglavnom se izvodi u više faza. Ono što je zajedničko za sve njih jesu slični uslovi (temperatura i obavezno mešanje, koje je u zavisnosti od zapremine i geometrije suda eksterno ili interno) i vreme trajanja inkubacije, kao i nejednako zamućenje medijuma. U takvim inokulumima, uobičajenim metodama kakva je nefelometrijska, nemoguće je odrediti udeo ksantana i udeo biomase ćelija. Iz tog razloga, a u cilju dobijanja inokuluma približnog kvaliteta, najčešće se vrši višestruko pasažiranje jer se na taj način proizvodna kultura dovodi u stanje maksimalne fiziološke aktivnosti (Dodić i Grahovac, 2013). Inokulum pripremljen na ovaj način se dodaje u kultivacioni medijum za biosintezu u koncentraciji od 5%(v/v) do 10%(v/v) računato na ukupnu zapreminu medijuma (García-Ochoa i sar., 2000).

Po dodatku inokuluma u proizvodni medijum počinje biosinteza ksantana. Proizvodnja ksantana izvodi se u različitim bioreaktorima pri čemu se dobijaju kultivacione tečnosti čije reološke karakteristike nisu iste, što je posledica različite količine biosintetisanog biopolimera, ali i njegovog kvaliteta. Najčešće se za biosintezu ksantana koriste bioreaktori sa mehaničkim mešanjem i prinudnom aeracijom. U ovim bioreaktorima intenzitet aeracije uglavnom se podešava na 1 l/l/min, dok se, usled veoma dobrog mešanja, vrednosti ostalih procesnih parametara lako mere i regulišu (García-Ochoa i sar., 2000).

Biosinteza ksantana sastoji se iz dve faze. U prvoj fazi dolazi do intenzivnog rasta i umnožavanja ćelija proizvodnog mikroorganizma uz minimalnu produkciju ksantana, dok u drugoj fazi ne dolazi do promene broja ćelija proizvodnog mikroorganizma, ali dolazi do biosinteze ksantana. Sam kraj bioprocasa karakteriše opadanje sadržaja biomase usled lize ćelija. U industrijskim uslovima biosinteza ksantana se odvija diskontinualno u trajanju od 72 h do 96 h (Dodić i Grahovac, 2013). Proizvodnja ksantana odvija se uz drastične promene reologije kultivacionog medijuma što je posledica biosinteze biopolimera. Iz navedenog razloga se ovaj bioproc

najčešće prati analiziranjem uzoraka kultivacionog medijuma uzetih u tačno definisanim vremenskim intervalima i određivanjem njihovog viskoziteta (Dodić i Grahovac, 2013).

Nakon završetka biosinteze ksantana neophodno je izvršiti izdvajanje biopolimera iz kultivacionog medijuma, što je relativno težak i poprilično skup postupak. Zbog visoke koncentracije ksantana, medijum je veoma viskozan te je sa njim teško raditi. Glavni problem je što velik viskozitet komplikuje izdvajanje biomase. Radi lakše primarne obrade, medijum se uglavnom razblažuje, ali to utiče na ekonomičnost čitavog proizvodnog postupka (García-Ochoa i sar., 2000).

Izbor postupaka izdvajanja i prečišćavanja određen je krajnjom upotrebom ksantana i ekonomskim ulaganjima. Od ukupnih troškova proizvodnje ksantana, oko 50% čine troškovi njegovog izdvajanja iz kultivacionog medijuma. Glavni koraci u izdvajanju i prečišćavanju ksantana su deaktivacija i izdvajanje biomase, taloženje biopolimera, uklanjanje vode, sušenje, mlevenje i pakovanje. Tokom postupka obrade ne sme doći do degradacije ksantana. Finalni proizvod najčešće je suvi prah ili koncentrovani rastvor (García-Ochoa i sar., 2000).

Inaktivacija proizvodnog mikroorganizma je prvi i veoma važan korak s obzirom da su sojevi vrste *X. campestris* fitopatogeni i potrebno je sprečiti njihovo nekontrolisano širenje u okolni prostor. U zavisnosti od krajnje namene proizvedenog biopolimera, inaktivacija proizvodnog mikroorganizma može se izvršiti primenom toplotnog tretmana, tretmana biocidima i hemikalijama ili sterilnom filtracijom (Dodić i Grahovac, 2013).

Tek nakon inaktivacije ćelija proizvodnog mikroorganizma sledi izdvajanje ksantana iz medijuma. Ovaj korak na prvom mestu podrazumeva operacije koje za cilj imaju uklanjanje inaktiviranih ćelija proizvodnog mikroorganizma. To su centrifugiranje ili filtracija. Potom sledi izdvajanje ksantana pri čemu se kao najčešći postupak primenjuje taloženje.

Izdvajanje ksantana taloženjem je moguće zahvaljujući polivalentnom karakteru biopolimera. Ovaj postupak moguće je izvesti dodatkom mono- ili polivalentnih soli i/ili organskih rastvarača kao taložnih agenasa. Talozenje solima ograničeno je čistoćom i cenom. Ukoliko je biopolimer izdvojen dodatkom soli ne preporučuje se njegova primena u prehrambenoj industriji. Od organskih rastvarača koriste se alkoholi male molekulske mase (metanol, etanol, izopropanol ili terc-butanol) uz dodatak elektrolita, a ovako izdvojen biopolimer namenjen je prehrambenoj industriji. Ksantan se taloži pri sadržaju etanola od oko 55%(v/v) i sadržaju zasićenog rastvora KCl od 1%(v/v) u taložnoj smeši čija je optimalna temperatura 15°C. Ovim postupkom se postiže i delimično prečišćavanje taloga ksantana, a potreba za velikim utroškom alkohola podrazumeva njegovo recikliranje (Dodić i Grahovac, 2013).

Tokom ranijih istraživanja utvrđeno je da se ksantan iz kultivacionog medijuma najbolje izdvaja taloženjem etanolom do postizanja koncentracije alkohola u taložnoj smeši od 60%(v/v) (Albiter i sar., 1994). Takođe, dokazano je da se primenom ultrafiltracije za koncentrisanje kultivacione tečnosti pre taloženja (pri čemu se sadržaj ksantana poveća sa oko 25 g/l na oko 150 g/l), može uštedeti oko 80% energije koja se utroši prilikom recikliranja alkohola. Međutim, kada koncentracija ksantana pređe 100 g/l efikasnost ultrafiltracije opada, a potrošnja energije raste. Optimizacijom ovih postupaka, utvrđeno je da je najpogodnije da se kultivaciona tečnost

koncentriše tako da sadrži 70 g/l ksantana čime se troškovi izdvajanja smanjuju za oko 45% (Dodić i Grahovac, 2013).

Izdvojeni ksantan se rastvara u smeši alkohol-voda, centrifugira ili filtrira sa ciljem uklanjanja ćelija, ostataka medijuma i pigmenata, a zatim se ponovo taloži. Nakon toga, biopolimer se suši na rotacionim sušnicama ili sušnicama sa raspršivačem. Usitnjavanje mlinovima do čestica odgovarajuće veličine je finalni korak pred pakovanje u vodonepropusnu ambalažu, a vrši se radi boljeg rastvaranja i lakše upotrebe konačnog proizvoda (Palaniraj i Jayaraman, 2011). Takođe, dodaju se i antibakterijska sredstva radi bolje stabilnosti proizvoda (Becker i sar., 1998). Na tržište se plasira u obliku praha, paste ili suspenzije. Važno je napomenuti da se svi koraci tokom izdvajanja i prečišćavanja ksantana moraju izvršiti tako da ne dođe do degradiranja njegove strukture (Palaniraj i Jayaraman, 2011).

### **3.3. SIROVI GLICEROL IZ PROIZVODNJE BIODIZELA KAO SIROVINA ZA BIOTEHNOLOŠKE PROCESE**

Zamena tečnih fosilnih goriva obnovljivim izvorima energije usled porasta cene nafte dovela je do intenziviranja proizvodnje biodizela širom sveta. Povećanje razmera proizvodnje ovog biogoriva, a samim tim i količine generisanih otpadnih tokova ukazuju na potrebu za njihovom valorizacijom kako bi se održala isplativost proizvodnog postupka (Wang i sar., 2017). Sirovi glicerol, kao najznačajniji nusproizvod industrije biodizela, nastaje u količini od 10% do 20% u odnosu na zapreminu proizvedenog biodizela (Quispe i sar., 2013). Uzimajući u obzir da proizvodnja biodizela raste iz dana u dan jasno je da se istovremeno generišu sve veće količine sirovog glicerola čije ispuštanje u prirodne recipijente bez prethodne obrade izaziva brojne ekološke probleme zbog čega su sve češća istraživanja čiji je cilj pronalaženje ekonomski i ekološki prihvatljivih rešenja za njegovu valorizaciju. Kako bi rešenja razvijena na laboratorijskom nivou bila industrijalizovana potrebna su opširna ispitivanja koja uključuju detaljnu karakterizaciju sirovog glicerola, a potrebno je razmotriti i stanje i perspektive njegovog lokalnog i globalnog generisanja.

#### **3.3.1. Karakterizacija sirovog glicerola**

Biodizel predstavlja smešu metil-estara viših masnih kiselina, koji nastaju iz triacilglicerola ili slobodnih masnih kiselina iz ulja ili masti biljnog i životinjskog porekla i metanola ili etanola reakcijama transesterifikacije i esterifikacije. Iako se u svetu koriste različite sirovine za proizvodnju biodizela, najčešća sirovina u ovoj industriji su jestiva ulja dobijena ceđenjem uljarica (Banković-Ilić i sar., 2012). Postoji više načina za proizvodnju biodizela, međutim, nezavisno od vrste sirovine korišćene za proizvodnju biodizela i primenjenog postupka, glicerol će se dobiti kao glavni nusproizvod (Soriano i sar., 2009).

Postupak dobijanja biodizela se odigrava u nekoliko faza, a prva među njima je priprema reaktanata. Na samom početku se ulje zagrejava do odgovarajuće temperature transportuje do reakcione posude. U drugom sudu se meša katalizator sa metanolom, uz zagrevanje na temperaturi bliskoj temperaturi reakcije metanolize kako bi se smanjio utrošak energije za

zagrevanje između rezervoara i reaktora. Smeše metanol-katalizator i ulje, u odgovarajućem molском odnosu, uvode se u reaktor za reakciju transesterifikacije. Transesterifikacija se odvija na temperaturi ključanja alkohola i atmosferskom pritisku. Po završetku transesterifikacije reakciona smeša se transportuje do separatora radi odvajanja sporednog proizvoda glicerola od metil-estara. Izdvojeni metil-estri se odvođe na prečišćavanje ispiranjem vode na sobnoj temperaturi, radi otklanjanja zaostalog katalizatora, glicerola, metanola i sapuna, uz centrifugiranje i sušenje. U dekanter se izdvaja sirovi glicerol zajedno sa neiskorišćenim katalizatorom i nastalim sapunima. Neophodno je neutralizovati bazni katalizator mineralnom kiselinom usled čega dolazi do nastajanja soli. Nastale masne kiseline tokom ove neutralizacije se skladište, a bazna so se može upotrebiti kao đubrivo. Višak alkohola u svakoj fazi izdvaja se destilacijom. Izdvojeni alkohol se može ponovo koristiti (Stamenković i sar., 2009). Glicerol koji se generiše prilikom proizvodnje biodizela u sirovoj formi uglavnom sadrži nečistoće u zavisnosti od procesa proizvodnje i sirovine koja se koristi (Ueoka i Katayama, 2001). Osnovne karakteristike čistog, odnosno komercijalnog glicerola, kao i sirovog glicerola prikazane su u tabeli 3.2.

Tabela 3.2. Karakteristike čistog i sirovog glicerola (Kaur i sar., 2020)

Parametar	Jedinica	Čist glicerol	Sirovi glicerol
Sadržaj glicerola	%(w/w)	> 98,70	22,90–63,00
Gustina	g/cm <sup>3</sup>	1,31	1,01-1,20
Viskoznost	(mPa·s)	930,00	1213,00
pH	(1)	6,40	2,00-10.80
Boja	-	bezbojan	braon
Sadržaj pepela	%(w/w)	-	2,70- 5,70
Sadržaj vode	%(w/w)	-	1,00- 28,70
Sadržaj sapuna	%(w/w)	-	20,50-31,40
Sadržaj metanola	%(w/w)	-	6,20–12,60
Rastvorljivost	-	-	meša se sa vodom

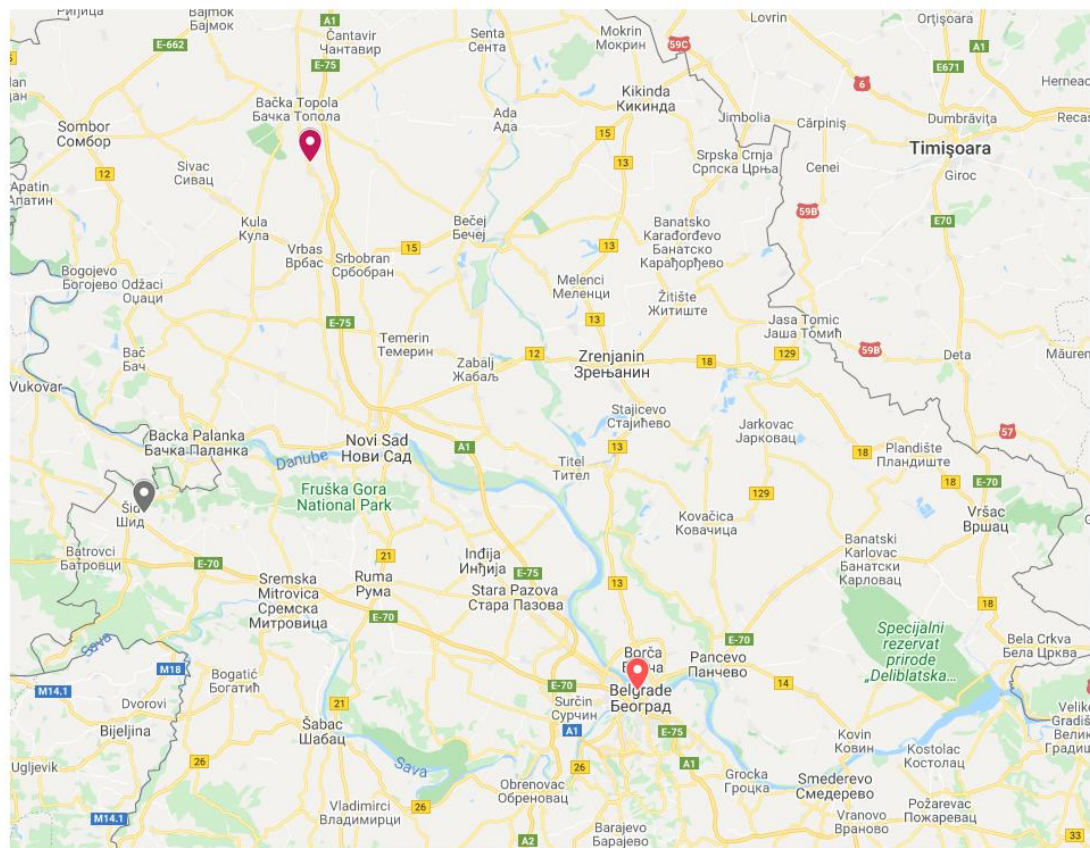
Sirovi glicerol iz industrije biodizela obično je čistoće od 55%(w/w) do 90%(w/w), a nečistoće u ovom nusproizvodu potiču od nekonvertovanog triacilglicerola, metanola, etanola, biodizela, sapuna i drugih materija (Trindade i sar., 2015). Karakteriše ga žuta do tamno braon boja, kao i visok sadržaj soli i slobodnih masnih kiselina (Sdrula, 2010). Osim metanola i sapuna, sirovi glicerol takođe sadrži i neke metale i nemetale. Od metala, u sirovom glicerolu su prisutni kalcijum (3-15 ppm), magnezijum (1-2 ppm), natrijum (više od 1%(w/w)) i kalijum (3,73%(w/w)), dok su od nemetala uglavnom prisutni fosfor (8-13 ppm), sumpor (22-26 ppm) i azot (0,3-1,2%(w/w)) (Thompson i He, 2006; Ayoub i Abdullah, 2012; Hu i sar., 2012).

Prema podacima iz dostupne naučne literature, sadržaj pepela u sirovom glicerolu dobijenom iz proizvodnje biodizela kreće se od 2,70%(w/w) do 6,34%(w/w), a sadržaj suve materije od 56,58%(w/w) do 99%(w/w) (Hu i sar., 2012; Kumar i sar., 2019).

U zavisnosti od ulaznih sirovina i čitavog postupka za proizvodnju biodizela, sadržaj sirovog glicerola i udeo pratećih nečistoća mogu se razlikovati u manjoj ili većoj meri. Upravo heterogen i nestandardan sastav sirovog glicerola diktira njegovu dalju upotrebu, odnosno tretman (Thompson i He, 2006).

### 3.3.2. Stanje i perspektive generisanja sirovog glicerola

Procenjuje se da se u Republici Srbiji u toku godine proizvede do 100000 t biodizela. Pored toga, više od 1000 poljoprivrednika proizvodi biodizel za sopstvene potrebe zbog čega se ne može doći do tačnih podataka o godišnjoj proizvodnji ovog biogoriva u našoj zemlji. Analizom površine obradivog zemljišta za gajenje kultura koje predstavljaju potencijalnu sirovinu za dobijanje biodizela, od kojih je 93% na teritoriji Vojvodine, utvrđeno je da teorijski potencijal proizvodnje biodizela u našoj zemlji iznosi do 250000 t godišnje (Tešić i sar., 2009). Osim povoljnih uslova za gajenje sirovina, Srbija ima i postrojenja za proizvodnju biodizela instalisanih kapaciteta koja premašuju nacionalnu potražnju, što otvara mogućnost izvoza biodizela, posebno u jugoistočnu Evropu. Prema podacima Agencije za privredni registar, u Republici Srbiji su trenutno registrovane dve kompanije koje se aktivno bave proizvodnjom biodizela, dok je jedna kompanija u likvidaciji. Geografska pozicija navedenih kompanija prikazana je na slici 3.4. Činjenica da se biodizel aktivno proizvodi u Srbiji ukazuje na to da se određene količine sirovog glicerola generišu i u našoj zemlji.



- BIODIZEL
- BIODIZELA NO001 DOO, MALI IDOŠ
- VICTORIA BIODIZEL DOO ŠID - U LIKVIDACIJU

Slika 3.4. Mapa privrednih subjekata na teritoriji Republike Srbije registrovanih za proizvodnju biodizela



Svetsko tržište biodizela zabeležilo je najveći skok 2013. godine, kada su proizvodnja i potrošnja biogoriva u transportu porasli za čak 7%, što predstavlja više od  $1,16 \cdot 10^{11}$  l. Najveći deo ove proizvodnje i potrošnje pripada evropskom tržištu (Olivera i Coelho, 2017). Evropska Unija je najveći regionalni proizvođač biodizela još od 1992. godine. Sa druge strane, u Sjedinjenim Američkim Državama je u 2013. godini proizvedeno oko  $4,8 \cdot 10^9$  l biodizela, što predstavlja 17% od ukupne svetske proizvodnje (Olivera i Coelho, 2017). Brazil je jedan od najpoznatijih proizvođača biogoriva, a proizvodnja biodizela u Brazilu registrovala je ogroman skok, sa  $7,36 \cdot 10^6$  l u 2005. na blizu  $3,5 \cdot 10^9$  l u 2014. godini. Indonezija je takođe značajno povećala svoju proizvodnju biodizela u poslednjih deset godina kao rezultat novih mera nacionalne politike za biogoriva, što je dovelo ovu državu među najveće svetske proizvođače biodizela. Tajland je u poslednjih nekoliko godina povećao proizvodnju biodizela za 30%. Proizvodnja biodizela u Africi značajno je napredovala u poslednjih deset godina. Budućnost proizvodnje pomenutog biogoriva u Africi izgleda obećavajuće jer ovaj kontinent poseduje kapacitete da postane najveći proizvođač bioenergetskih useva za globalnu proizvodnju biodizela (Wolde-Georgis i Glantz, 2010). Stručnjaci predviđaju da će biodizel činiti od 60% do 80% transportnog goriva u Africi do 2030. godine (Ogunkunle i Ahmed, 2019). Prema bazi portala *IndexMundi* trenutno su Sjedinjene Američke Države najveći proizvođač biodizela u svetu, dok se Nemačka i Argentina nalaze na drugom i trećem mestu, redom.

Od 1970-ih do 2004. godine cena komercijalnog glicerola visoke čistoće bila je stabilna i kretala se između 1200 i 1800 \$/t. Ovo relativno stabilno tržište drastično je promenjeno usled pojave biodizela i intenziviranje njegove proizvodnje koja je praćena generisanjem sirovog glicerola kao nusproizvoda. Kako su sve veće količine sirovog glicerola lansirane na relativno stabilno tržište, 2005. godine došlo je do pada stabilnih cena. Količina sirovog glicerola rasla je neverovatnom brzinom, a većina hemijskih kompanija koje se bave proizvodnjom glicerola imale su problem sa njegovim prečišćavanjem zbog visokih troškova, što je dovelo do zatvaranja različitih preduzeća (Quispe i sar., 2013).

Velika količina sirovog glicerola koja se dobija nakon proizvodnje biodizela iz palminog ulja u zemljama poput Malezije i Indonezije uzrokovala je pad cene glicerola na čak 0,33 \$/kg ili manje. U 2003. godini rafinirani glicerol koštao je oko 1200 \$/t, a 2006. godine cena se stabilizovala na oko 600 \$/t, ali sa snažnim trendom pada zbog rastuće proizvodnje biodizela. Ipak, do kraja 2006. godine sirovi glicerol (80% glicerola) koštao je 125 €/t. Iste godine, cena sirovog glicerola zabeležila je pad i u Sjedinjenim Američkim Državama gde se kretala između 0 \$/t i 70 \$/t. U 2011. godini cena sirovog glicerola u Sjedinjenim Američkim Državama je bila toliko niska, odnosno iznosila je od 0,00002 \$/kg do 0,00005 \$/kg, zbog čega su mnogi proizvođači biodizela skladištili sirovi glicerol kako bi sačekali bolje tržišne uslove (Quispe i sar., 2013).

U današnje vreme, cena proizvodnje biodizela povećava se za 0,021 \$/l za svako smanjenje cene sirovog glicerola od 0,00022 \$/kg (da Silva i sar., 2009; Li i Lesnik, 2013). I pored toga, svetsko tržište biodizela je iz godine u godinu u porastu, uz procenu da će do 2026. godine dostići nivo proizvodnje od čak  $40,5 \cdot 10^9$  l biodizela (OECD/FAO, 2017). Evropska Unija je globalni lider u proizvodnji biodizela, a osnovna sirovina za njegovu proizvodnju na ovom području je ulje uljane repice (da Silva i sar., 2009). Sve ovo nagoveštava da će se i u narednim godinama generisati značajne količine sirovog glicerola koji je neophodno adekvatno tretirati pre ispuštanja

u okolinu. Prema izveštaju agencije ITC (*International Trade Centre*) cena sirovog glicerola za 2019. godinu iznosi 170 \$/t. Sve navedeno sugerira da glicerol dobijen nakon proizvodnje biodizela predstavlja jeftino dostupnu potencijalnu sirovinu koja se sa ili bez prethodnog tretmana može primeniti u određenim industrijama.

### 3.3.3. Valorizacija sirovog glicerola u biotehnološkim procesima

Sirovi glicerol se na samom početku industrijskog dobijanja biodizela plasirao na tržište u neprečišćenom obliku, kao pogodan za primenu u automobilskoj, duvanskoj, papirnoj i tekstilnoj industriji (Quispe i sar., 2013). Kako bi se mogao upotrebiti u kozmetičkoj, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji sirovi glicerol je potrebno dodatno obraditi do željenog stepena čistoće (Coronado i sar., 2014). Međutim, visoki troškovi prečišćavanja i degradacija kvaliteta životne sredine razlozi su zbog kojih tržište i prirodno okruženje ne mogu da apsorbuju sve veće količine sirovog glicerola, a budući da se sve više smatra otpadom teži se pronalasku adekvatne alternative za njegovo iskorišćenje (Hejna i sar., 2016).

Teorijski gledano, glicerol je pogodan izvor ugljenika za veliki broj mikroorganizama, a eksperimentalnim ispitivanjima je i potvrđeno da neki od njih na medijumima sa glicerolom mogu da biosintetišu tržišno vredne bioproizvode (Nwachukwu i sar., 2012). Glicerol predstavlja monomer za sintezu poliestara, polietara i poliuretana, a 1,3-propandiol je jedan od prvih proizvoda fermentacije glicerola. Takođe se koristi kao izvor ugljenika u medijumu za mikrobiološku proizvodnju dihidroksiacetona. Glicerol se uspešno koristi i prilikom biotehnološke proizvodnje kiselina, kao što su sukcininska kiselina, propionska kiselina i limunska kiselina. Ostali značajni proizvodi nastali fermentacijom glicerola su etanol, pigmenti, različita biološki aktivna jedinjenja i biosurfaktanti. U većini slučajeva, efikasnost proizvodnje, prinos i kvalitet finalnog proizvoda identični su onima koji se dobijaju na podlozi sa glukozom (da Silva i sar., 2009). Uprkos tome što su publikovana brojna istraživanja koja se odnose na primenu čistog glicerola za biotehnološko dobijanje različitih bioproizvoda, ipak su malobrojna ona istraživanja u kojima je kao sirovina korišćen sirovi glicerol (da Silva i sar., 2009).

U pogledu metabolisanja, glicerol, kao i drugi mali nenaelektrisani molekuli, nesmetano prolazi kroz ćelijsku membranu difuzijom. Izuzetak čine mikroorganizmi koji koriste isključivo pasivni transport za unos glicerola u ćeliju jer ispoljavaju mnogo sporiji rast pri malim koncentracijama glicerola u podlozi. Aktivni transport glicerola se vrši proteinima integrisanim u strukturu membrane nekih mikroorganizama, a unutar ćelije se konvertuje u glicerol-3-fosfat, delovanjem enzima glicerol-kinaze. Glicerol-3-fosfat ostaje unutar ćelije dok ga ona ne metaboliše, jer ne može da reaguje sa transportnim enzimom u membrani (da Silva i sar., 2009). Nakon ulaska u unutrašnjost ćelije, veliki broj mikroorganizama koristi glicerol kao izvor ugljenika i energije, a pojedine bakterije, kao što su *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumonia* i *Clostridium pasteurianum* imaju sposobnost anaerobnog metabolisanja glicerola. Druge bakterije, među kojima su i bakterije roda *Xanthomonas*, glicerol razgrađuju oksidativnim putem, uz veću efikasnost (da Silva i sar., 2009).

Uzimajući u obzir prethodno navedene činjenice jasno je da se i sirovi glicerol može primeniti kao sirovina u biotehnologiji. Ovakvih ispitivanja nema mnogo i relativno su novijeg datuma. U

tabeli 3.3. navedeni su proizvodi dobijeni valorizacijom sirovog glicerola u biotehnološkoj proizvodnji.

Johnson i Taconi (2007) su u svom istraživanju istakli da se sirovi glicerol može uspješno koristiti prilikom biotehnološke proizvodnje butana primenom bakterija roda *Clostridium*. Grčki naučnici su 2009. godine potvrdili primenu sirovog glicerola za biosintezu manitola primenom različitih sojeva *Yarrowia lipolytica* (LFMB 19, LFMB 20 i ACA-YC 5033) (Rymowicz i sar., 2009). Sa druge strane, Rymowicz i saradnici su u svom istraživanju potvrdili da prilikom kultivacije soja *Y. lipolytica* *Wratislavia* K1 na medijumu sa sirovim glicerolom dolazi do biosinteze eritrola, ali i određene količine limunske kiseline.

Sirovi glicerol se takođe pokazao kao dobra sirovina za biotehnološku proizvodnju mlečne kiseline. Naime, naučnici iz Indije su ispitivali mogućnost iskorišćenja čistog i sirovog glicerola u biotehnološkoj proizvodnji mlečne kiseline primenom sojeva *Lactobacillus casei* 2125, *Lactobacillus delbrueckii* 2025, *Lactobacillus pentosus* 2912, *Bacillus laevolactius* 2464, *Paenibacillus pabuli* 2912 i *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 3041 (Choubisa i sar., 2012).

Prema podacima iz dostupne naučne literature sirovi glicerol se pokazao kao pogodan izvor ugljenika u kultivacionom medijumu za proizvodnju 1,3-propandiola primenom bakterija *Citrobacter freundii* FMCC-B294 i *Klebsiella pneumoniae* CGMCC 1.6366 CPS (Guo i sar., 2009; Metsoviti i sar., 2013). Došli su do zaključka da se sirovi glicerol pokazao kao pogodniji izvor ugljenika u kultivacionom medijumu prilikom proizvodnje mlečne kiseline testiranim sojevima u primenjenim eksperimentalnim uslovima.

Pored navedenih, sirovi glicerol se pokazao kao adekvatan izvor ugljenika u medijumu za biosintezu kiselina, kao što su ćilibarna, oksalna i glicerinska (Hejna i sar., 2016). Vođeni idejom da postoji mogućnost sinteze ksantana na sirovom glicerolu naučnici iz Brazila, kao i naučnici iz Srbije izveli su uspešnu biotehnološku proizvodnju ksantana na medijumu koji je sadržao sirovi glicerol (Zahović i Trivunović, 2020).

Prethodno navedeni primeri iskorišćenja sirovog glicerola proizvodnji značajnih bioproizvoda ukazuju na odličan potencijal ovog efluenta kao sirovine u biotehnologiji. Biotehnološko iskorišćenje sirovog glicerola za dobijanje visokovrednih proizvoda značajno smanjuje troškove njihove proizvodnje zbog veoma niske cene ovog supstrata. Osim toga, sve veća primena otpadnog glicerola u biotehnološkoj proizvodnji utiče na smanjenje ekoloških problema izazvanih njegovim nakupljanjem u životnoj sredini.

Tabela 3.3. Primeri primene sirovog glicerola u biotehnološkoj proizvodnji

Proizvodni mikroorganizam	Bioproizvod	Referenca
<i>Klebsiella</i> sp.	sićetna kiselina etanol mlećna kiselina sukcinska kiselina 2,3-butandiol CO <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	Johnson i Taconi, 2007
<i>Clostridium</i> sp.	1, 3-propandiol acetat butirat aceton butanol etanol sukcinat laktat	Johnson i Taconi, 2007
<i>Candida</i> sp. <i>Debaryomyces</i> sp. <i>Lachancea</i> sp. <i>Kluyveromyces</i> sp. <i>Tetrapisispora</i> sp. <i>Pichia</i> sp. <i>Saccharomyces</i> sp. <i>Torulaspora</i> sp. <i>Yarrowia</i> sp. <i>Rhodotorula</i> sp. <i>Metschnikowia</i> sp. <i>Aureobasidium</i> sp. <i>Kodamaea</i> sp. <i>Amauroascus</i> sp.	biomasa	Taccari i sar., 2012
<i>K. pneumoniae</i>	1, 3-propandiol	Yang i sar., 2012
<i>Clostridium butyricum</i>	1, 3-propandiol	Yang i sar., 2012
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	hidrogen	Yang i sar., 2012
<i>Thermotoga neapolitana</i> DSM 4359	hidrogen	Sarma i sar., 2012
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	hidrogen	Sarma i sar., 2012
<i>Pachysolen tannophilus</i>	etanol	Liu i sar., 2012
<i>Rhizopus microsporus</i>	suplementi u ishrani životinja	Sarma i sar., 2012
<i>Acremonium chrysogenum</i> M35	antibiotik	Konstantinović i sar., 2016
<i>Yarrowia</i> sp.	limunska kiselina	Konstantinović i sar., 2016
<i>Y. lipolytica</i>	biosurfaktant	Konstantinović i sar., 2016
<i>Enterobacter aerogenes</i> HU-101	vodonik	Ćirić, 2017
<i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395	mlećna kiselina	Ćirić, 2017
<i>X. campestris</i>	ksantan	Ćirić, 2017 Zahović i Trivunović, 2020

### 3.4. UNAPREĐENJE BIOTEHNOLOŠKOG POSTUPKA PROIZVODNJE KSANTANA

Uspešnost izvođenja biotehnološkog postupka za dobijanje ksantana u velikoj meri zavisi od različitih faktora, i to genetskog potencijala proizvodnog mikroorganizma i njegovog održavanja, sastava kultivacionih medijuma, uslova pod kojima se bioproces odvija, primenjenih tehnika i opreme za proizvodnju, kao i od postupaka izdvajanja, prečišćavanja i finalne obrade konačnog proizvoda (Dodić i Grahovac, 2013). Iako se čini da je proizvodnja ovog mikrobiološkog polisaharida veoma razvijena i dalje ima prostora za unapređenje postojećih i razvoj novih biotehnoloških postupaka. Pravci u kojima treba da se kreću istraživanja da bi se postigli ovi ciljevi jesu konstrukcija novih bioreaktora u kojima se ostvaruje bolji prenos mase i energije, variranje procesnih uslova, izolacija novih proizvodnih sojeva i ispitivanje najrazličitih otpadnih efluenta kao alternativnih supstrata (Becker i sar., 1998).

Opšte je poznato da se biotehnološka proizvodnja ksantana uspešno izvodi kultivacijom bakterija roda *Xanthomonas* na medijumu sa glukozom ili saharozom, u bioreaktorima odgovarajućih konstrukcionih karakteristika pri tačno definisanim procesnim uslovima (García-Ochoa i sar., 2000). Međutim, porast cene i sve intenzivnija potražnja za pomenutim šećerima i sirovinama koje sadrže ove šećere ukazuju na potrebu pronalaska alternativnih supstrata manje tržišne vrednosti. Otpadni tokovi i sporedni proizvodi prehrambene industrije i industrije pića koji sadrže glukozu i saharozu ispunjavaju ove kriterijume, ali je njihova upotreba za biosintezu ksantana ograničena prvenstveno zbog konkurentnosti na tržištu budući da predstavljaju pogodne sirovine za brojne biotehnološke procese (Bajić i sar., 2015a). Još jedan nedostatak primene ovih efluenta jeste njihova dostupnost koja je ograničena samo na teritorije gde se izvode tehnološki postupci u kojima se generišu.

Dakle, kao prvi korak u razvoju ekonomski održivog postupka proizvodnje ksantana nameće se pronalazak alternativne sirovine koja ima nižu tržišnu vrednostu od aktuelno primenjivanih sirovina i na kojoj metabolička aktivnost bakterija roda *Xanthomonas* može nesmetano da se odvija. Imajući u vidu sve prethodno iznete literaturne podatke jasno je da sirovi glicerol iz proizvodnje biodizela zadovoljava ove zahteve i da poseduje potencijal primene u ovom biotehnološkom postupku. Pregled najvažnijih rezultata dosadašnjih istraživanja u kojima su sa ciljem proizvodnje ksantana različiti sojevi roda *Xanthomonas* kultivisani na medijumima sa čistim i/ili sirovim glicerolom dat je u tabeli 3.4.

Glavni nedostatak primene sirovog glicerola iz industrije biodizela u proizvodnji ovog biopolimera ogleda se u ograničenoj sposobnosti referentne proizvodne kulture da metaboliše glicerol kao izvor ugljenika (Brandão i sar., 2013; Bajić i sar., 2015b). Upravo iz ovog razloga najznačajniji korak u razvoju biotehnološkog postupka proizvodnje ksantana na sirovom glicerolu podrazumeva odabir proizvodnog mikroorganizma. Osim što treba da poseduje mogućnost metabolisanja glicerola, potrebno je da se njegov rast na ovako kompleksnom supstratu neometano odvija i da produkuje što veću količinu ksantana što boljeg kvaliteta. Nakon odabira adekvatnog proizvodnog soja neophodno je izvršiti optimizaciju sastava kultivacionog medijuma koji se koristi za pripremu inokuluma, a nakon toga i optimizaciju sastava medijuma za produkciju željenog proizvoda.

Tabela 3.4. Uspešnost biosinteze ksantana na medijumima sa čistim i/ili sirovim glicerolom u definisanim eksperimentalnim uslovima primenom različitih sojeva roda *Xanthomonas*

Proizvodni mikroorganizam	Izvor ugljenika	Geometrija (zapremina) suda	Mešanje (o/min)	Vreme (h)	Ksantan (g/l)	Referenca
<i>Xanthomonas</i> sp. C1	Čist glicerol (50 g/l)				0,157	
	Čist glicerol (25 g/l) i saharoza (25g/l)	Erlenmajer (250 ml)	180	96	0,363	Reis i sar. (2010)
<i>Xanthomonas</i> sp. C9	Čist glicerol (50 g/l)				0,186	
	Čist glicerol (25 g/l) i saharoza (25g/l)				0,363	
<i>X. campestris mangiferaeindicae</i> 2103	Sirovi glicerol (20g/l)	Erlenmajer (500 ml)	250	120	7,23	Brandão i sar. (2013)
<i>X. campestris mangiferaeindicae</i> 2103	Sirovi glicerol (20g/l)	Bioreaktor (4500 ml)	500	120	6,07	Assis i sar. (2014)
<i>X. campestris</i> pv. <i>magiferaeindicae</i> IBSBF 1230	Sirovi glicerol (50g/l)	Erlenmajer (500 ml)	200	48	4,98	Trindade i sar. (2015)
<i>X.campestris</i> pv. <i>magiferaeindicae</i> IBSBF 1230	Sirovi glicerol (25g/l) i saharoza (25g/l)				4,07	
<i>X. campestris</i> ATCC 13951	Čist glicerol (20g/l)	Erlenmajer (300 ml)	150	120	7,44	Bajić i sar. (2015b)
<i>X. campestris</i> ATCC 13951	Čist glicerol (15 g/l) Sirovi glicerol (15 g/l)	Erlenmajer (300 ml)	150	168	11,25 7,22	Rončević i sar., 2020a

Optimizacija sastava kultivacionih medijuma za pripremu inokuluma i biosintezu ksantana izvodi se u više koraka pri čemu je potrebno izvesti veliki broj eksperimenata kako bi se definisao uticaj ispitivanih promenljivih na odabrane odzive. U ovom koraku razvoja bioprocasa, umesto analize uticaja jednog po jednog faktora, a radi uštede vremena i resursa, korisnije je primeniti odgovarajući statistički dizajniran eksperimentalni plan (Singh i sar., 2017). Na osnovu podataka dobijenih iz prethodno statistički planiranih i izvedenih eksperimenata potrebno je izvršiti modelovanje bioprocasa nakon čega se generisane matematičke jednačine mogu primeniti za definisanje optimalnih vrednosti ispitivanih parametara, u konkretnom slučaju sastojaka medijuma.

Razvoj odovarajućeg biotehnološkog postupka za komercijalnu proizvodnju podrazumeva i ispitivanje uspešnosti izvođenja u uvećanim razmerama. Uvećanje razmera bioprocasa (*scale-up*) podrazumeva povećanje veličine bioreaktora, u kojem se željeni bioprocasa odvija, od laboratorijskog, preko poluindustrijskog do industrijskog nivoa. U cilju dobijanja istih ili bar približno sličnih rezultata prilikom izvođenja bioprocasa u uvećanim razmerama potrebno je sledeće (Hsu i Lo, 2003):

- izvršiti optimizaciju željenog bioprocasa na laboratorijskom nivou,
- potvrditi dobijene rezultate izvođenjem bioprocasa pod optimalnim uslovima u pilot postrojenju i
- izvršiti procenu ekonomske isplativosti izvođenja optimizovanog bioprocasa na industrijskom nivou.

Kako se tokom biosinteze ksantana dešavaju drastične promene reologije medijuma, uvećanje razmera ovog bioprocasa predstavlja pravi izazov. Međutim, prethodno pomenuti matematički modeli mogu da se iskoriste i za simulaciju bioprocasa u uvećanim razmerama, za šta se primenjuju različiti softverski paketi. Ovo predstavlja veoma značajan korak u razvoju novog biotehnološkog postupka i vodi ka njegovoj industrijalizaciji (Baş i Boyacı, 2007; Singh i sar., 2017).

### 3.5. MODELOVANJE I OPTIMIZACIJA BIOTEHNOLOŠKIH PROCESA

Mnoga eksperimentalna ispitivanja, koja se obavljaju u strogo kontrolisanim laboratorijskim uslovima, karakteriše definisanje proizvodnih uslova koji će dati optimum u kvalitetu željenog proizvoda i ekonomičnosti njegovog dobijanja. Ispitivanje se u ovom slučaju uglavnom vrši *OFAT* metodom (*one-factor-at-a-time*). Prilikom primene ove metode početne vrednosti za svaki parametar su poznate, pri čemu se ispituje uticaj jednog po jednog parametra tako što se dati parametar menja u okviru svog domena, dok su svi ostali konstantni. Nakon što se izvedu svi testovi, formiraju se grafici koji pokazuju kako svaki pojedinačni parametar utiče na izlazne promenljive. Nedostatak ove metode ogleda se u tome što njegovom primenom ne uspeva da se ispita uticaj interakcije između pojedinačnih parametara, a samim tim ne daje prikaz kompletnih uticaja parametara na izlazne promenljive. Drugi nedostatak *OFAT* metode je veliki broj eksperimenata potrebnih da bi se sprovedo istraživanje, koji sa sobom povlače i velike troškove (Lundstedt i sar, 1998). Navedeni nedostaci prevazilaze se savremenim metodama modelovanja i optimizacije bioprocasa (Baş i Boyacı, 2007).

Modeli za opisivanje biotehnoloških procesa razvijeni su zahvaljujući sakupljenim neophodnim znanjima o biohemijskim reakcijama u živoj ćeliji, bioreaktorima i mernoj opremi, kao i razvijenoj računarskoj opremi, programima i dobro razvijenom matematičkom aparatu. Razvijeni modeli pokazali su se veoma pogodnim za uvećanje razmera, kontrolu, simulaciju i optimizaciju bioprocasa (Baras i sar., 2009).

Uopšteno, modeli predstavljaju matematičke opise bioprocasa koji verodostojno predstavljaju njihovu prirodu. Mogu se definisati i kao matematička formula ili jednačina koja opisuje važne promene u toku nekog bioprocasa. Razlozi iz kojih se generišu su sledeći (Baras i sar., 2009):

- predviđanje konverzije supstrata ili proizvodnosti bioprocasa,
- ispitivanje rada postrojenja u različitim uslovima,
- projektovanje bioprocasa,
- uvećanje razmera bioprocasa,
- modifikacija u cilju unapređenja bioprocasa,
- optimizacija bioprocasa,
- kompjutersko simuliranje bioprocasa,
- identifikovanje nepoznatih uticajnih faktora i
- kontrola bioprocasa.

Optimizacija nekog bioprocasa podrazumeva njegovo izvođenje u uslovima pri kojima se ostvaruje najveća efikasnost. U industrijskim uslovima optimizacija podrazumeva postizanje najveće ekonomičnosti, s obzirom da profitabilnost industrijskog bioprocasa iziskuje postizanje maksimalnog prinosa željenog proizvoda očekivanog kvaliteta u što jeftinijim uslovima proizvodnje. Veoma je važno da je optimizacija biotehnološkog procesa u koraku sa novim naučnim saznanjima o svakoj fazi tog biotehnološkog procesa. Ovo je moguće postići poboljšanjem karakteristika proizvodnog mikroorganizma, sastava kultivacionih medijuma i procesnih parametara (Baras i sar., 2009). Generisanje matematičkih modela i njihova primena u cilju definisanja optimalnih vrednosti variranih parametara smatraju se najpopularnijim načinima za povećanje efikasnosti različitih procesa. Među najčešće korišćenim tehnikama za modelovanje i optimizaciju biotehnoloških procesa izdvojio se postupak odzivne površine u kombinaciji sa metodom željene funkcije (Grahovac, 2011).

### 3.5.1. Postupak odzivne površine

Postupak odzivne površine (*RSM*, engl. *Response Surface Methodology*) predstavlja skup matematičkih i statističkih postupaka koji se koriste za formiranje empirijskih modela i analizu procesa. Primenom postupka odzivne površine se na osnovu pažljivo odabranog plana eksperimenta optimizuju odzivi sistema ( $Y$ ) koji zavise od više nezavisno promenljivih faktora ( $X_1, X_2, X_3, \dots$ ) (Montgomery, 2013). Jednačina formirana ovom prilikom naziva se funkcija odziva, a njen geometrijski prikaz se naziva odzivna površina i prikazuje se u dve ili tri dimenzije (Brereton, 2003). Opšti oblik odzivne funkcije je sledeći:

$$Y=f(X_1, X_2, X_3, \dots X_i)+\varepsilon \quad (3.1)$$



gde su:

$Y$  – analizirani parametar,

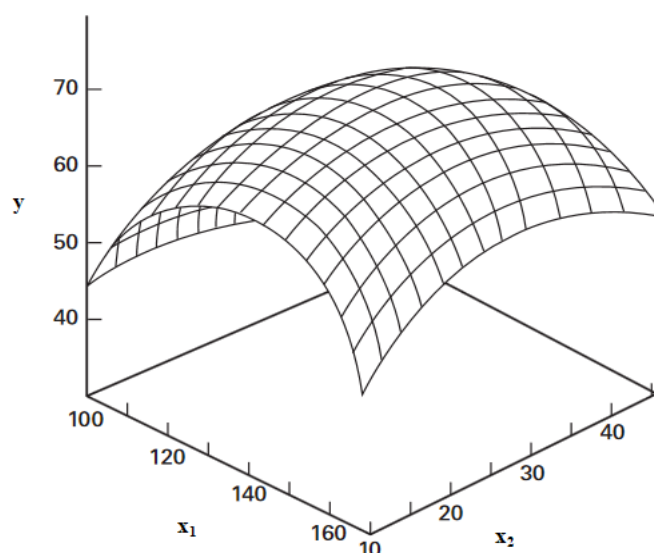
$f$  – funkcija odziva,

$X_1, X_2, X_3, X_i$  – ispitivani faktori,

$i$  – broj ispitivanih faktora  $i$

$\varepsilon$  – statistička greška.

Statistička greška ( $\varepsilon$ ) sadrži slučajne greške merenja i efekte slučajnih spoljnih uticaja koji nisu obuhvaćeni funkcijom  $f$ . Ova greška predstavlja razliku između stvarne (izmerene) i funkcionalnom zavisnošću (modelom) izračunate vrednosti za iste nivoe ulaznih faktora. Obe komponente greške eksperimenata su slučajne veličine sa normalnom raspodelom oko tačne (istinite) vrednosti  $\mu\varepsilon=0$  (Montgomery, 2013). Rezultati postupka odzivne površine se obično predstavljaju grafički, gde je odzivni sistem ( $Y$ ) nacrtan u zavisnosti od nezavisno promenljivih parametara procesa ( $X_1$  i  $X_2$ ). Izgled odzivne površine prikazan je na slici 3.5.



Slika 3.5. Trodimenzionalni prikaz matematičkog modela generisanog primenom postupka odzivne površine koji opisuje uticaj dva parametra na posmatrani odziv,  $y=f(x_1, x_2)$  (Montgomery, 2013).

Optimizacija bioprocesa primenom postupka odzivne površine izvodi se u tri faze:

- određivanje nezavisnih promenljivih i njihovih nivoa,
- odabir eksperimentalnog dizajna i generisanje matrice izvođenja eksperimenata i
- generisanje matematičkih modela i ocena njihove adekvatnosti.

### 3.5.1.1. Određivanje nezavisnih promenljivih i njihovih nivoa

Uspešnost svakog biotehnoškog procesa zavisi od više faktora. Kako nije moguće istovremeno odrediti uticaj svih njih, potrebno je izabrati parametre sa najvećim uticajem na posmatrani bioproc. Skringing eksperimenti su pogodni za identifikaciju parametara koji će se varirati, a

faktorijalni planovi se mogu koristiti u tu svrhu. Veoma je važno za odabrane parametre odrediti nivoe ispitivanja jer je uspeh optimizacije bioprocesa direktno povezan sa njima. Pogrešno odabrani nivoi mogu dovesti do neuspešno izvedenih eksperimenata, ali i do nemogućnosti definisanja adekvatnih matematičkih modela (Baş i Boyaci, 2007).

### 3.5.1.2. Odabir eksperimentalnog dizajna

Izbor adekvatnog plana za izvođenje eksperimenata predstavlja kritičnu tačku u primeni postupka odzivne površine. Statističko planiranje eksperimenata (*Design of Experiments - DoE*) je opšte prihvaćena metoda u inženjerskim ispitivanjima. Ova metoda obuhvata istovremeno posmatranje promena više ulaznih parametara i analizu značajnosti uticaja posmatranih parametara na rezultate eksperimenata. Najčešće se koriste sledeći eksperimentalni planovi (Ivanović i sar, 2014):

- potpuni faktorski dizajn,
- centralni kompozitni dizajn i
- Boks-Benkenov (*Box-Behnken*) dizajn.

Pored navedenih, eksperimentalnih dizajna, dizajn smeše je takođe pronašao primenu u optimizaciji procesa. Dizajn smeše predstavlja vrstu eksperimentalnog dizajna koja se koristi kada se ispituje formulacija koju čine više različitih sastojaka, čiji je zbir udela stalan. Primenom dizajna smeše se na osnovu najmanjeg broja eksperimenata pouzdano dolazi do određenih zaključaka (Krstić i Ibrić, 2016).

Za optimizaciju eksperimentalnih rezultata primenom postupka odzivne površine najčešće se koristi Boks-Benkenov plan. Prednost Boks-Benkenovog plana nad ostalima ogleda se u efikasnosti, odnosno odnosu između broja koeficijenata koji se javljaju u odabranom modelu i broja eksperimenata koje je potrebno izvesti (Ferreira i sar., 2007). Oblik odzivne funkcije u postupku odzivne površine prikazuje se u obliku polinoma obzirom da se stepen fitovanja eksperimentalnih podataka može poboljšati povećanjem stepena polinoma. Polinomi prvog reda uzimaju u obzir samo linearne uticaje pojedinačnih faktora. Međutim, ukoliko se vrši optimizacija procesa, neophodno je koristiti polinome drugog i višeg reda. Oblik odzivne funkcije u postupku odzivne površine najčešće se ocenjuje analizom varijanse (ANOVA). ANOVA je najpoznatija statistička metoda korišćena za poređenje srednjih vrednosti više posmatranih grupa podataka (Ivanović i sar., 2014).

Jedna od najznačajnijih prednosti primene Boks-Benkenovog dizajna je to što ne sadrži kombinacije faktora u kojima su svi istovremeno na maksimalnom ili minimalnom nivou. Dakle, izvođenjem oglada dizajniranih prema ovom dizajnu mogu se izbeći ekstremni eksperimentalni uslovi za koje su mogući neprihvatljivi rezultati. Međutim, bitno je napomenuti da se sve pomenute prednosti Boks-Benkenovog plana gube kada se ispituje uticaj više od četiri faktora (Ferreira i sar., 2007).

### 3.5.1.3. Generisanje matematičkih modela

Na osnovu podataka dobijenih iz statistički dizajniranih eksperimenata moguće je generisati matematičke modele pomoću kojih se opisuje uticaj nezavisnih promenljivih (faktora) na odabrane zavisne promenljive (odzive) bioprocasa. Međutim, matematički modeli mogu da se koriste i za predviđanje ishoda bioprocasa prilikom variranja vrednosti nezavisnih promenljivih. Definisani matematički modeli su polinomskeg oblika, a definisanje značajnosti pojedinih faktora moguće je odraditi pomoću Studentovog  $t$ -testa. Nakon određivanja vrednosti koeficijenata u jednačini moguće je izračunati vrednosti posmatranog odziva. Adekvatnost modela tumači se na osnovu koeficijenata determinacije ( $R^2$ ), kao mere odstupanja odzivne funkcije od eksperimentalno dobijenih rezultata (Jokić, 2010).

### 3.5.1.4. Prednosti i nedostaci primene postupka odzivne površine

Kao što je već prethodno navedeno, postupak odzivne površine odlikuje nekoliko prednosti u odnosu na ostale metode optimizacije. Glavna prednost primene postupka odzivne površine ogleda se u smanjivanju broja eksperimenata uz obezbeđivanje dovoljnog broja informacija za određivanje statistički validnih rezultata. Postupkom odzivne površine može se odrediti zajednički uticaj više faktora na posmatrani odziv. Navedene prednosti omogućavaju uspešnu primenu postupka odzivne površine za rešavanje optimizacionih problema u različitim biotehnološkim procesima (Baş i Boyacı, 2007).

Sa druge strane, najveći nedostatak primene postupka odzivne površine ogleda se u nemogućnosti opisivanja dobijenih eksperimentalnih podataka kvadratnim modelom. Ovaj problem se prevazilazi variranjem nezavisnih parametara u užem opsegu čime se povećava adekvatnost modela, međutim, ujedno se smanjuje mogućnost određivanja stacionarne tačke. Iz ovog razloga je u statističkom planiranju eksperimenata veoma važno odrediti opseg u kom će se ispitivani faktori varirati (Baş i Boyacı, 2007).

### 3.5.2. Metoda željene funkcije

Po završetku modelovanja dobijaju se matematički modeli koji predstavljaju osnovu za optimizaciju bioprocasa. Optimizacijom se dolazi do optimalnih vrednosti ispitivanih nezavisnih promenljivih u cilju maksimizacije, minimizacije ili održavanja vrednosti zavisnih promenljivih u željenom opsegu. Za optimizaciju biotehnoloških procesa najčešće se koristi metoda željene funkcije (*Desirability Function Approach*) (Baş i Boyacı, 2007).

Metoda željene funkcije predstavlja postupak za optimizaciju biotehnoloških procesa sa dva ili više variranih odziva. Primenom metode željene funkcije vrši se konvertovanje individualnih odziva u individualne željene funkcije čije vrednosti se kreću od nula do jedan. Najniža vrednost individualne željene funkcije predstavlja najlošiju vrednost, dok vrednost jedan predstavlja najbolju vrednost posmatranog odziva. Ukupna željena funkcija jednaka je geometrijskoj sredini pojedinačnih željenih funkcija (Ferreira i sar., 2007). Kako različiti odzivi imaju različit značaj za optimizaciju posmatranog bioprocasa svakom od njih se može dodeliti prioritet od kojeg će zavisiti i optimalne vrednosti variranih parametara. Najmanje značajnom odzivu dodeljuje se

vrednost prioriteta jedan (\*), a najznačajnijem pet (\*\*\*\*\*). Ukupna željena funkcija ima vrednost jedan samo u slučaju kada svaka pojedinačna željena funkcija ima maksimalnu vrednost. Kada makar jedna pojedinačna željena funkcija ima najlošiju, odnosno najmanju moguću vrednost (nula) tada i ukupna željena funkcija ima tu vrednost što znači da nije moguće izvesti optimizaciju (Costa i sar., 2011).

## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1. PROIZVODNI SOJEVI

Za biosintezu ksantana u okviru ovih istraživanja korišćeno je 14 proizvodnih mikroorganizama, i to referentni soj *X. campestris* ATCC 13951 i 13 izolata roda *Xanthomonas* koji su svrstani u dve grupe. Prvoj grupi izolata pripadaju sojevi roda *Xanthomonas* izolovani sa inficiranih listova biljaka iz porodice kupusnjača (Am, KUPUS, KELJ, KARFIOL, Xp 3-1, Xp 7-2, Mn 7-2 i 12-2) koji su klasičnim mikrobiološkim metodama identifikovani kao sojevi *X. campestris*, dok drugu grupu čine sojevi roda *Xanthomonas* izolovani sa listova paprika sa karakterističnim simptomima bakterioze (PAP LIST 1, PAP LIST 2, PAP LIST 3, PAP LIST 4 i PAP LIST 5), a koji su primenom savremenih molekularnih metoda identifikovani kao sojevi *X. euvesicatoria* (Pajčin i sar., 2020). Navedeni sojevi čuvaju se na agarizovanom medijumu odgovarajućeg sastava (*Yeast Malt Agar*, YMA<sup>®</sup>, HiMedia, Indija), na temperaturi od 4°C, u zbirci kultura Tehnološkog fakulteta Novi Sad, Srbija (referentni soj i sojevi izolovani sa listova biljaka iz porodice kupusnjača), kao i u zbirci kultura Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, Srbija (sojevi izolovani sa listova paprika).

U eksperimentima koji su za cilj imali skrining mogućnosti biosinteze ksantana primenom sojeva *Xanthomonas* spp. na različitim medijumima (poglavlja 5.1. i 5.3) korišćeno je svih 14 sojeva, izuzev u okviru poglavlja 5.3.3. gde je korišćeno pet odabranih proizvodnih sojeva (ATCC 13951, KUPUS, KARFIOL, PAP LIST 3 i PAP LIST 4). Za dalja ispitivanja (poglavlja 5.4-5.6) korišćen je proizvodni soj koji je pokazao najbolju produktivnost u primenjenim eksperimentalnim uslovima inicijalnog skrininga (PAP LIST 4).

### 4.2. SASTAV KULTIVACIONIH MEDIJUMA

Sastav kultivacionih medijuma od posebnog je značaja za biotehnošku proizvodnju ksantana. U zavisnosti od faze proizvodnog postupka koriste se medijumi različitog sastava, usled različitih zahteva proizvodnog mikroorganizma u pogledu nutrijenata u različitim fazama proizvodnje ksantana. Shodno tome, u okviru ovog ispitivanja korišćene su dve vrste kultivacionih medijuma, za pripremu inokuluma i za biosintezu ksantana.

#### 4.2.1. Kultivacioni medijumi za pripremu inokuluma

U okviru ovih istraživanja za osvežavanje proizvodnog mikroorganizma korišćen je komercijalni medijum YMA<sup>®</sup> (HiMedia, Indija).

Umnožavanje proizvodnog mikroorganizma u svim eksperimentima odvijalo se u dva koraka. U prvom koraku umnožavanja uvek je korišćen komercijalni medijum YMB<sup>®</sup> (*Yeast Malt Broth*, HiMedia, Indija), dok su u drugom koraku umnožavanja korišćeni različiti medijumi u različitim fazama ispitivanja.

Prilikom skrininga mogućnosti biosinteze ksantana primenom sojeva *Xanthomonas* spp. na različitim medijumima (poglavljja 5.1. i 5.3) u drugom koraku umnožavanja proizvodnog mikroorganizma korišćen je komercijalni medijum YMB<sup>®</sup> (HiMedia, Indija).

U eksperimentima koji su za cilj imali standardizaciju pripreme inokuluma (poglavlje 5.4) u drugom koraku umnožavanja odabranog proizvodnog soja korišćeni su medijumi sa različitim izvorima nutrijenata. Prilikom definisanja optimalnog odnosa glukoze i glicerola u medijumu za pripremu inokuluma (poglavlje 5.4.1) korišćeni su medijumi sa različitim odnosima ispitivanih izvora ugljenika, odnosno glukoze (D-glukoza p.a., Lach-Ner, Češka), komercijalnog glicerola (Glicerol p.a., Lach-Ner, Češka) i sirovog glicerola (tabela 5.13, fabrika biodizela, Srbija), a koji su dodati u ukupnoj koncentraciji od 10 g/l (tabela 4.2). Ovi medijumi su sadržali i 3 g/l ekstrakta kvasca, 3 g/l sladnog ekstrakta i 5 g/l peptona.

U eksperimentima čiji je krajnji cilj bio definisanje optimalnog sastava medijuma za pripremu inokuluma u pogledu odnosa sastojaka sa azotom (poglavlje 5.4.2) korišćeni su medijumi sa različitim odnosima ispitivanih sastojaka, odnosno ekstrakta kvasca (10,7-12,2%(w/w) azota, HiMedia, Indija), sladnog ekstrakta (4,0-5,0%(w/v) proteina, PRENA-M, Srbija) i peptona ( $\geq 12,0\%$ (w/w) azota, HiMedia, Indija), koji su dodati u ukupnoj koncentraciji od 11 g/l (tabela 4.3). Medijumi u ovoj fazi istraživanja sadržali su i glukozu i sirovi glicerol, koji su dodati u prethodno optimizovanom odnosu (40:60), u ukupnoj koncentraciji od 10 g/l.

U eksperimentima čiji je krajnji cilj bio definisanje optimalnog početnog sadržaja sastojaka medijuma za pripremu inokuluma, kao i količine dodatog inokuluma (poglavlje 5.4.3) varirani su početni sadržaj glukoze i glicerola dodati u odnosu 40:60 (5-15 g/l), početni sadržaj sladnog ekstrakta (5-15 g/l) i koncentracija inokuluma koja se dodaje u medijum za biosintezu (5-15%, v/v). Sastav ispitivanih kultivacionih medijuma definisan je prema odabranom eksperimentalnom planu koji je prikazan u tabeli 4.4. Optimizovan sastav medijuma za drugu fazu pripreme inokuluma (2 g/l glukoze, 3 g/l sirovog glicerola i 5 g/l sladnog ekstrakta), kao i optimizovana koncentracija inokuluma (7,5%, v/v), koja se dodaje u kultivacioni medijum za biosintezu ksantana, primenjeni su u daljim istraživanjima (poglavljja 5.4.4., 5.5. i 5.6).

Priprema svih kultivacionih medijuma obuhvatala je i korekciju vrednosti pH na  $7,0 \pm 0,2$  pre sterilizacije koja je vršena u autoklavu na temperaturi od  $121^\circ\text{C}$  i pritisku od 2,1 bar u trajanju od 20 min. Po završetku sterilizacije u primenjenim uslovima nije zabeležena promena vrednosti pH medijuma veća od 0,2.

#### 4.2.2. Kultivacioni medijumi za biosintezu ksantana

U prvoj fazi skrininga mogućnosti biosinteze ksantana primenom sojeva *Xanthomonas* spp. (poglavlje 5.1) korišćeni su polusintetički medijumi sa različitim izvorima ugljenika. Od izvora ugljenika ispitivani su glukoza i komercijalni glicerol, a dodati su u koncentraciji od 20,0 g/l. Kao izvori azota upotrebljeni su ekstrakt kvasca i  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u koncentracijama od 3,0 g/l i 1,5 g/l, redom. Pored navedenog, medijumi su sadržali i 0,3 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  i 3,0 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .

Prilikom skrininga mogućnosti biosinteze ksantana primenom sojeva *Xanthomonas* spp. na medijumu sa sirovim glicerolom (poglavlje 5.3) korišćen je medijum koji je u svom sastavu

sadržao sirovi glicerol generisan u domaćem pogonu za proizvodnju biodizela iz otpadnog ulja. Sirovi glicerol je u medijum za biosintezu dodat u količini koja obezbeđuje početni sadržaj glicerola od 20,0 g/l. Kao izvori azota korišćeni su ekstrakt kvasca i  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u koncentracijama od 3,0 g/l i 1,5 g/l, redom. Kao i u prethodno izvedenim eksperimentima, medijum je sadržao i 0,3 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  i 3,0 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Isti medijum za biosintezu ksantana korišćen je i u ogleđima čiji je krajnji cilj bio standardizacija pripreme inokuluma (poglavlje 5.4).

Eksperimenti koji su za cilj imali formulaciju sastava kultivacionog medijuma sa sirovim glicerolom za biosintezu ksantana (poglavlje 5.5), obuhvatali su ispitivanje uspešnosti biosinteze ksantana primenom odabranog proizvodnog soja na medijumima različitog sastava. U eksperimentima koji su vršeni radi optimizacije sadržaja glicerola i izvora azota u medijumu za biosintezu ksantana (poglavlje 5.5.1) korišćeni su medijumi čiji je sastav definisan prema odabranom eksperimentalnom planu (tabela 4.6), a u kojima su varirani početni sadržaj glicerola (10-50 g/l) poreklom iz sirovog glicerola, početni sadržaj ekstrakta kvasca (0-6 g/l) i početni sadržaj  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0-3 g/l). Pored navedenih komponenti svi ispitivani medijumi sadržali su i 0,3 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  i 3,0 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .

Prilikom izvođenja eksperimenata koji su za krajnji cilj imali definisanje optimalnog sadržaja izvora fosfora u medijumu za biosintezu ksantana (poglavlje 5.5.2) korišćeni su medijumi sa različitim početnim sadržajem  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,0 g/l, 0,5 g/l, 1,0 g/l, 1,5 g/l, 2,0 g/l, 2,5 g/l i 3,0 g/l). U ovoj fazi istraživanja sirovi glicerol je u sve ispitivane medijume za biosintezu dodat u količini koja obezbeđuje prethodno optimizovani sadržaj glicerola (16,0 g/l), dok je kao izvor azota korišćen  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  koji je dodat u, takođe, prethodno optimizovanoj koncentraciji (3,0 g/l).

Za ispitivanje toka biosinteze ksantana primenom odabranog proizvodnog soja u uvećanim razmerama (poglavlje 5.6) korišćen je kultivacioni medijum sa sirovim glicerolom prethodno optimizovanog sastava (16,0 g/l glicerola, 3,0 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  i 2,5 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ).

Prilikom izvođenja navedenih eksperimenata vrednost pH svih kultivacionih medijuma za biosintezu podešena je na  $7,0 \pm 0,2$  pre sterilizacije koja je vršena u autoklavu na temperaturi od  $121^\circ\text{C}$  i pritisku od 2,1 bar u trajanju od 20 min. Nakon izvedene sterilizacije u definisanim uslovima nije zabeležena promena vrednosti pH medijuma veća od 0,2.

### 4.3. PRIPREMA INOKULUMA

Priprema inokuluma za biosintezu ksantana obuhvatala je osvežavanje i umnožavanje proizvodnog mikroorganizma. Proizvodni mikroorganizam osvežen je na agarizovanom medijumu (YMA<sup>®</sup>, HiMedia, Indija), stacionarnom kultivacijom u aerobnim uslovima, na temperaturi od  $25^\circ\text{C}$ , u toku 48 h. Osvežena kultura umnožena je postupkom dvostrukog pasažiranja u količini dovoljnoj za inokulaciju medijuma za biosintezu. Druga pasaža je zasejana sa 10%(v/v) inokuluma proizvedenog prvim pasažiranjem. U zavisnosti od faze istraživanja inkubacija svake pasaže izvedena je na odgovarajućim medijumima (poglavlje 4.2) u erlenmajerima različite zapremine sa odnosom zapremine suda i zapremine medijuma od 3:1, u aerobnim uslovima, uz eksterno mešanje (laboratorijska tresilica, 150 o/min), na temperaturi od  $25^\circ\text{C}$ . Vreme inkubacije prilikom izvođenja ogleđda u okviru poglavlja 5.1, 5.3, 5.4.1, 5.4.2. i

5.4.3. iznosilo je po 48 h za obe faze umnožavanja proizvodnog mikroorganizma. U eksperimentima koji su vršeni radi optimizacije vremena pripreme inokuluma (poglavljje 5.4.4), varirano je vreme inkubacije obe pasaže (24-48 h) prema odabranom eksperimentalnom planu koji je dat u tabeli 4.5. Optimizovano vreme inkubacije za umnožavanje proizvodnog mikroorganizma u postupku pripreme inokuluma primenjeno je u narednim eksperimentima (poglavljja 5.5. i 5.6), a iznosilo je 36 h za prvu, odnosno 48 h za drugu fazu.

Prilikom izvođenja oglada u okviru poglavljja 5.1, 5.3, 5.5. i 5.6, kvalitet pripremljenog inokuluma procenjen je na osnovu promene mutnoće, tečljivosti i boje medijuma za umnožavanje, dok je u eksperimentima koji su imali za cilj standardizaciju pripreme inokuluma (poglavljje 5.4) njegov kvalitet procenjivan indirektno, a na osnovu sadržaja ksantana u medijumu za biosintezu.

Pripremljeni inokulumi su u medijume za biosintezu dodati u koncentracijama od 10,0%(v/v) (poglavljja 5.1,5.3, 5.4.1. i 5.4.2), 5,0-10,0%(v/v) (poglavljje 5.4.3) ili 7,5%(v/v) (poglavljja 5.4.4, 5.5. i 5.6) računato na njihovu zapreminu.

#### 4.4. USLOVI BIOSINTEZE

U okviru ovih istraživanja biosinteza ksantana je izvedena submerznom tehnikom, kultivacijom proizvodnih mikroorganizama (poglavljje 4.1) na odgovarajućim medijumima (poglavljje 4.2) pri tačno definisanim uslovima.

Eksperimenti koji su za cilj imali skrining mogućnosti biosinteze ksantana primenom različitih sojeva *Xanthomonas* spp. na medijumima sa različitim izvorima ugljenika (poglavljja 5.1.1. i 5.1.2) i optimizacioni eksperimenti (poglavljja 5.4. i 5.5) izvedeni su u erlenmajerima ukupne zapremine 300 ml (radna zapremina 100 ml) u trajanju od 168 h, a eksperimenti u kojima je ispitivan uticaj vremena trajanja kultivacije na uspešnost biosinteze ksantana (poglavljja 5.1.3, 5.1.4, 5.3.1. i 5.3.2) izvedeni su u istim sudovima, ali u trajanju od 168 h i 240 h. U svim ogleđima kultivacija se odvijala u aerobnim uslovima, uz eksterno mešanje od 150 o/min (KS 4000i control, IKA® Werke, Nemačka), na temperaturi od 30°C.

Eksperimenti koji su izvedeni sa ciljem odabira proizvodnog soja za biosintezu ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom (poglavljje 5.3.3) izvedeni su u Vulfovima (Woulff) bocama ukupne zapremine 2 l (radna zapremina 1,5 l) u trajanju od 168 h, u aerobnim uslovima uz odgovarajuću korekciju procesnih parametara. Biosinteza se u prvih 48 h odvijala na temperaturi od 25°C, pri protoku vazduha od 1 l/min i brzini mešanja od 150 o/min. Vrednosti navedenih parametara su nakon 48 h povećane na 30°C, 2 l/min i 250 o/min, redom. Aeracija je vršena kondicioniranim vazduhom, a temperatura i mešanje su obezbeđeni postavljanjem sudova na laboratorijsku tresilicu u termostatu.

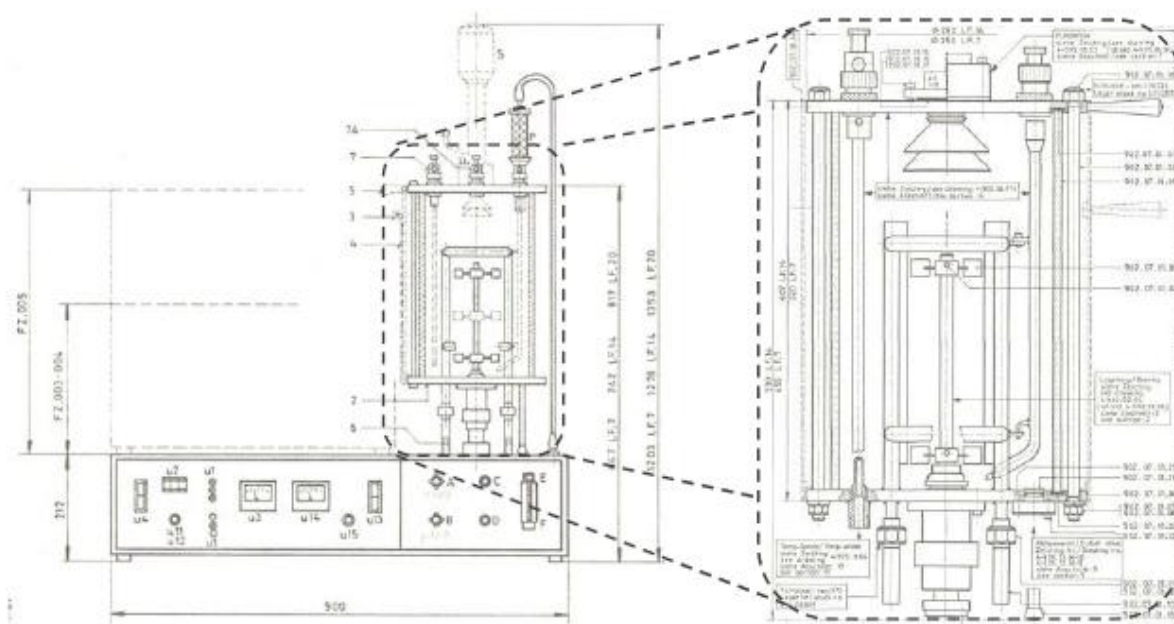
Tok biosinteze ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom optimizovanog sastava (poglavljje 5.6) ispitan je kultivacijom odabranog proizvodnog soja u laboratorijskom bioreaktoru (Biostat® Aplus, Sartorius AG, Nemačka) ukupne zapremine 3 l (radna zapremina 2 l) i laboratorijskom bioreaktoru (CH-8708, Chemap AG, Švajcarska) ukupne zapremine 14 l (radna zapremina 11 l). Automatsko merenje (pH, pO<sub>2</sub>, t) i regulacija procesnih parametara vršeni su



tokom čitavog trajanja bioprocesa u oba bioreaktora. Interno mešanje medijuma u bioreaktoru ukupne zapremine 3 l (slika 4.1) vršeno je pomoću dve paralelno postavljene Ruštonove turbine u staklenom sudu bez odbojnika, dok je bioreaktor ukupne zapremine 14 l (slika 4.2) opremljen sa dve paralelno postavljene Ruštonove turbine i četiri odbojnika. Aeracija je vršena kondicioniranim vazduhom sterilisanim prolaskom kroz filter sa prečnikom pora od 0,2  $\mu\text{m}$ . Biosinteza ksantana je vršena u trajanju od 168 h pri čemu se u prvih 48 h izvodila na temperaturi od 25°C, pri protoku vazduha od 1 l/l/min i brzini mešanja od 200 o/min. Nakon navedenog vremenskog perioda, vrednosti temperature i protoka vazduha su povećane na 30°C i 2 l/l/min, redom, dok je brzina mešanja korigovana po potrebi, a prema sadržaju rastvorenog kiseonika koji je održavan na vrednosti većoj od 30%.



Slika 4.1. Laboratorijski bioreaktor BIOSTAT A-Plus ukupne zapremine 3 l



Slika 4.2. Laboratorijski bioreaktor CH-8708 ukupne zapremine 14 l

## 4.5. IZDVAJANJE PROIZVODA

Po završetku bioprocasa uzorci kultivacionog medijuma su centrifugirani pri 10000 o/min u trajanju od 15 min (Rotina 380 R, Hettich, Nemačka), a zatim je iz supernatanta kultivacione tečnosti ksantan izdvojen taloženjem hladnim etanolom (96%, v/v) u prisustvu KCl kao elektrolita. Etanol je dodavan u malim porcijama (1 kap/s) uz neprekidno mešanje do postizanja sadržaja etanola u celokupnoj taložnoj smeši od 60%(v/v). Pre početka taloženja dodat je zasićeni rastvor KCl tako da njegov sadržaj u smeši po završetku taloženja iznosi 1%(v/v). Tokom taloženja temperatura smeše održavana je na oko 15°C. Po završetku taloženja ksantana vršena je njegoa dehidracija na temperaturi od 4°C u trajanju od 24 h. Ksantan je iz taložne smeše izdvojen centrifugiranjem pri 4000 o/min (Tehtnica LC-321, Slovenija) u trajanju od 15 min. Talog ksantana sušen je na 60°C do postizanja konstantne mase na osnovu koje je određen sadržaj ksantana u medijumu.

Vrednost stepena konverzije izvora ugljenika u ksantan izračunata je na osnovu jednačine:

$$K_{P/S} = \frac{P}{S_0} \cdot 100 \quad (4.1)$$

gde je:

$K_{P/S}$  – stepen konverzije izvora ugljenika u ksantan (%),

P – sadržaj biosintetisanog ksantana (g/l) i

$S_0$  – početni sadržaj izvora ugljenika (g/l).

## 4.6. ANALITIČKI POSTUPCI

### 4.6.1. Analiza sirovog glicerola

Uzorak sirovog glicerola, poreklom iz domaćeg pogona za proizvodnju biodizela iz otpadnog ulja, podvrgnut je određivanju vrednosti pH, sadržaja ukupnih rastvorenih soli, sadržaja glicerola, sadržaja ukupnog i asimilabilnog azota, sadržaja suve materije i sadržaja pepela.

Vrednost pH sirovog glicerola izmerena je staklenom elektrodom pomoću multiparametarskog laboratorijskog analizatora Consort C863 (Consort, Belgija).

Sadržaj ukupnih rastvorenih soli (TDS, engl. *Total Dissolved Solids*) u sirovom glicerolu izmeren je konduktometrijskom elektrodom pomoću multiparametarskog laboratorijskog analizatora Consort C863 (Consort, Belgija).

Sadržaj glicerola u sirovom glicerolu određen je visokopritisnom tečnom hromatografijom (HPLC, engl. *High Performance Liquid Chromatography*). Pre analiziranja uzorci su propušteni kroz 0,22 µm najlonski filter (Agilent Technologies, Nemačka). Instrument za HPLC (Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 series) opremljen je sa pumpom HPG-3200SD/RS, autosamperom WPS-3000(T)SL (zapremina injektovanog uzorka iznosila je 10 µl), kolonom ZORBAX NH2 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) i detektorom RefractoMax520 (ERC Inc, Japan). Kao mobilna faza korišćen je 70%(v/v) acetonitril sa protokom od 1,0 ml/min. Vreme elucije iznosilo je 10 min, a temperatura kolone 30°C.

Sadržaj ukupnog azota u sirovom glicerolu određen je metodom po Kjeldalu (Kjeldahl) (Herlich, 1990), dok je sadržaj asimilabilnog azota određen volumetrijskom metodom (Zoecklein i sar., 1999).

Suva materija sirovog glicerola određena je gravimetrijski, sušenjem na temperaturi od 105°C do postizanja konstantne mase (AOAC, 2000).

Sadržaj pepela u sirovom glicerolu određen je gravimetrijski, spaljivanjem na temperaturi od 550°C do postizanja konstantne mase (AOAC, 2000).

#### 4.6.2. Analiza kultivacionog medijuma

U eksperimentima u okviru ovog istraživanja, uzorci kultivacionog medijuma su po završetku bioprocasa analizirani u pogledu vrednosti pH, sadržaja ukupnih rastvorenih soli, sadržaja izvora ugljenika, sadržaja ukupnog i asimilabilnog azota, sadržaja fosfora, sadržaja biomase i reoloških karakteristika. Prilikom ispitivanja toka biosinteze ksantana u uvećanim razmerama (poglavlje 5.6) uzorci medijuma su radi potrebnih analiza uzimani u sterilnim uslovima u definisanim vremenskim intervalima tokom čitavog trajanja bioprocasa.

U zavisnosti od zahteva analitičke metode prikupljeni uzorci su adekvatno obrađeni pre svakog merenja. Razdvajanje tečne i čvrste faze kultivacionog medijuma vršeno je centrifugiranjem na 10000 o/min u trajanju od 10 min (Rotina 380 R, Hettich, Nemačka).

Uslovi merenja vrednosti pH i sadržaja ukupnih rastvorenih soli opisani su u poglavlju 4.6.1.

Sadržaj izvora ugljenika određivan je u supernatantu kultivacionog medijuma visokopritisnom tečnom hromatografijom. HPLC instrument i uslovi određivanja sadržaja glicerola opisani su u poglavlju 4.6.1, a kada je u pitanju određivanje sadržaja šećera (glukoza i maltoza) kao mobilna faza korišćen je 75%(v/v) acetonitril sa protokom od 1,2 ml/min. Pri ovoj analizi vreme elucije bilo je 20 min, a temperatura kolone održavana je na 25°C. Na osnovu dobijenih rezultata računat je stepen konverzije izvora ugljenika pomoću sledeće jednačine:

$$K_S = \frac{S_0 - S}{S_0} \cdot 100 \quad (4.2)$$

gde su:

$K_S$  – stepen konverzije izvora ugljenika (%),  
 $S_0$  – početni sadržaj izvora ugljenika (g/l) i  
 $S$  – rezidualni sadržaj izvora ugljenika (g/l).

Sadržaj ukupnog azota u supernatantu kultivacionog medijuma određivan je pomenutom metodom po Kjeldalu (Herlich, 1990). Za računanje stepena konverzije ukupnog azota dobijeni rezultati uvršteni su u sledeću jednačinu:

$$K_N = \frac{N_{uk0} - N_{uk}}{N_{uk0}} \cdot 100 \quad (4.3)$$

gde su:

$K_N$  – stepen konverzije ukupnog azota (%),  
 $N_{uk0}$  – početni sadržaj ukupnog azota (mg/l) i  
 $N_{uk}$  – rezidualni sadržaj ukupnog azota (mg/l).

Sadržaj asimilabilnog azota u supernatantu kultivacionog medijuma je, kao i u uzorcima sirovog glicerola, određivan volumetrijskom metodom (Zoecklein i sar., 1999).

Sadržaj ukupnog fosfora u supernatantu kultivacionog medijuma određivan je spektrofotometrijskom metodom (Gales i sar., 1966) sa rastvorom anhidrovanog  $KH_2PO_4$  kao standardom. Dobijeni rezultati korišćeni su za računanje stepena konverzije ukupnog fosfora pomoću sledeće jednačine:

$$K_{P_{uk}} = \frac{P_{uk0} - P_{uk}}{P_{uk0}} \quad (4.4)$$

gde su:

$K_{P_{uk}}$  – stepen konverzije ukupnog fosfora (%),  
 $P_{uk0}$  – početni sadržaj ukupnog fosfora (mg/l) i  
 $P_{uk}$  – rezidualni sadržaj ukupnog fosfora (mg/l).

Sadržaj biomase određivan je metodom poseva (Vrbaški i Markov, 1992) iz tri razblaženja ( $10^6$ ,  $10^7$  i  $10^8$ ) u tri ponavljanja i izražen je kao broj ćelija proizvodnog mikroorganizma u kultivacionom medijumu.

Reološke karakteristike uzoraka kultivacionog medijuma određene su na osnovu rezultata merenja pomoću rotacionog viskozimetra "Reotest 2 RV-2" (Medingen GmbH, Nemačka) sa koaksijalnim cilindričnim mernim priborom oznake N (Dodić i Grahovac, 2013). Na osnovu očitanih vrednosti otklona kazaljke za različite brzine smicanja izračunate su vrednosti napona smicanja primenom sledeće jednačine:

$$\tau = 0,1 \cdot z \cdot \alpha \quad (4.5)$$

gde su:

$\tau$  – napon smicanja (Pa),  
 $z$  – konstanta ( $3,08 \text{ dyn/cm}^2 \cdot \text{Skt}$ ) i  
 $\alpha$  – otklon kazaljke (Skt).

U cilju utvrđivanja pseudoplastičnog ponašanja analiziranih uzoraka i određivanja reoloških parametara, faktora konzistencije i indeksa toka, izračunate vrednosti napona smicanja fitovane su stepenim zakonom:

$$\tau = K \cdot D^n \quad (4.6)$$

gde su:

$\tau$  – napon smicanja (Pa),  
 $K$  – faktor konzistencije ( $\text{Pa} \cdot \text{s}^n$ ),  
 $D$  – brzina smicanja (1/s) i  
 $n$  – indeks toka (1).

Fitovanje podataka odrađeno je pomoću programa Microsoft® Excel 2010 (MS Office, Microsoft Corporation, SAD), a poklapanje analiziranih rezultata sa navedenom funkcionalnom zavisnošću procenjeno je na osnovu vrednosti koeficijenta determinacije ( $R^2$ ), koji je u svim izvedenim eksperimentima u okviru ove doktorske disertacije bio iznad 0,90.

Prividni viskozitet kultivacionog medijuma izračunat je na osnovu vrednosti reoloških parametara primenom izraza:

$$\eta_a = K \cdot D^{(n-1)} \cdot 1000 \quad (4.7)$$

gde su:

$\eta_a$  – prividni viskozitet ( $\text{mPa} \cdot \text{s}$ ),  
 $K$  – faktor konzistencije ( $\text{Pa} \cdot \text{s}^n$ ),  
 $D$  – brzina smicanja ( $100 \text{ l/s}$ ) i  
 $n$  – indeks toka (1).

#### 4.6.3. Analiza biosintetisanog ksantana

Srednja vrednost molekulskih masa ksantana određena je merenjem vremena isticanja rastvora ksantana različite koncentracije u 0,1M NaCl upotrebom Ubelodovog (Ubbelohde) kapilarnog viskozimetra. Merenje je vršeno u termostatiranom kupatilu pri temperaturi od 25°C. Na osnovu rezultata dobijenih obradom u programu Microsoft® Excel 2010 (MS Office, Microsoft Corporation, SAD) određena je vrednost unutrašnjeg viskoziteta koja je korišćena za računanje vrednosti srednje molekulske mase izdvojenog biopolimera primenom Mark-Hauvinkove (Mark-Houwink) jednačine (Milas i sar., 1985) čije se konstante određuju u skladu sa oblikom makromolekula, prirodom rastvarača i temperaturom merenja. Za računanje molekulske mase ksantana u ovim istraživanjima korišćena je sledeća relacija:

$$[\eta] = 1,7 \cdot 10^{-7} \cdot M_w^{1,14} \quad (4.8)$$

gde su:

$[\eta]$  – unutrašnji viskozitet ( $\text{l/g}$ ),  
 $M_w$  – srednja molekulska masa ksantana ( $\text{g/mol}$ ).

Reološke karakteristike 1%(w/v) rastvora ksantana u 0,1 M NaCl određene su na osnovu rezultata merenja pomoću rotacionog viskozimetra "Reotest 2 RV-2" (Medingen GmbH, Nemačka) sa koaksijalnim cilindričnim mernim priborom oznake N (Dodić i Grahovac, 2013), a prema postupku opisanom u poglavlju 4.6.2.

## 4.7. STATISTIČKA ANALIZA

Ogledi koji su za cilj imali skrining mogućnosti biosinteze ksantana primenom sojeva *Xanthomonas* spp. na različitim medijumima (poglavlja 5.1. i 5.3), kao i ogledi u okviru optimizacije kultivacionog medijuma sa sirovim glicerolom za biosintezu ksantana (poglavlje

5.5.2) izvedeni su u tri ponavljanja pri identičnim uslovima, a dobijeni rezultati predstavljeni su u obliku srednjih vrednosti sa standardnim odstupanjem. Svi podaci u okviru istraživanja iz navedenih poglavlja obrađeni su statistički primenom odgovarajućih testova. U zavisnosti od broja ispitivanih faktora, izvršena je jednofaktorijalna analiza varijanse (*One-Way ANOVA*) ili dvofaktorijalna analiza varijanse (*Two-Way ANOVA*) eksperimentalno dobijenih podataka, kao i *post-hoc* testiranje primenom Dankanovog testa višestrukih poređenja (*Duncan's multiple range test*). Naime, Dankanovim testom su utvrđene homogene grupe i značajnost razlika između srednjih vrednosti grupa u okviru svakog od analiziranih parametara. Obrađeni podaci su prikazani i grafički pravougaonim dijagramima (*Box & Whisker Plots*) u cilju vizuelnog poređenja varijacija prisutnih unutar i između grupa. Statistička analiza svim primenjenim testovima vršena je pri nivou značajnosti od 0,05. Srednje vrednosti i standardne devijacije ispitivanih parametara izračunate su primenom programa Microsoft® Excel 2010 (MS Office, Microsoft Corporation, SAD). Statistička obrada podataka i izrada pravougaonih dijagrama izvršeni su primenom softverskog paketa Statistica v13.2 (Dell Inc., SAD).

#### 4.8. MODELOVANJE I OPTIMIZACIJA

U okviru ove doktorske disertacije u različitim fazama istraživanja korišćeni su različiti eksperimentalni planovi (tabela 4.1) za dizajniranje i izvođenje optimizacionih ogleada. Rezultati statistički dizajniranih eksperimenata fitovani su odgovarajućim polinomskim zavisnostima kako bi se generisali matematički modeli koji opisuju uticaj ispitivanih faktora na posmatrane odzive i na osnovu kojih su definisane optimalne vrednosti faktora.

Tabela 4.1. Prikaz eksperimentalnih planova po fazama istraživanja

Faze istraživanja	Ogledi	Eksperimentalni planovi
Standardizacija pripreme inokuluma za biosintezu ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom (poglavljje 5.4)	Definisanje odnosa glukoze i glicerola u medijumu za pripremu inokuluma (poglavljje 5.4.1)	Dizajn smeše
	Definisanje odnosa sastojaka sa azotom u medijumu za pripremu inokuluma (poglavljje 5.4.2)	Dizajn smeše
	Definisanje sadržaja sastojaka medijuma za pripremu inokuluma i koncentracije inokuluma u medijumu za biosintezu (poglavljje 5.4.3)	Boks-Benkenov plan eksperimenta
	Definisanje vremena trajanja pripreme inokuluma (poglavljje 5.4.4)	Faktorijalni dizajn
Formulacija sastava medijuma sa sirovim glicerolom za biosintezu ksantana (poglavljje 5.5)	Definisanje sadržaja glicerola i izvora azota u medijumu za biosintezu ksantana (poglavljje 5.5.1)	Boks-Benkenov plan eksperimenta

Uspešnost fitovanja eksperimentalnih rezultata primenjenom jednačinom procenjena je na osnovu vrednosti koeficijenta determinacije ( $R^2$ ), dok je značajnost modela utvrđena pomoću F-vrednosti i *p*-vrednosti. Pored navedenog, matematički modeli prikazani su i grafički,

konturnim dijagramima (poglavlja 5.4.3. i 5.4.4), ili trodimenzionalnim odzivnim površinama (poglavlja 5.4.3, 5.4.4. i 5.5.1). Značajnost uticaja pojedinačnih faktora, kao i njihovih interakcija procenjena je preko  $p$ -vrednosti za svaki od koeficijenata u regresionoj jednačini, dok je intenzitet njihovog uticaja određen poređenjem  $t$ -vrednosti prikazanih na Pareto dijagramima. Prilikom crtanja Pareto dijagrama efekti svih parametara, kao i njihovih interakcija su standardizovani, odnosno podeljeni sa standardnom greškom, a redosled prikaza odgovara veličini njihovog uticaja. Vertikalna linija na grafiku ukazuje na statističku značajnost koeficijenata pri nivou značajnosti od 95 %. To znači da je efekat značajan ukoliko je  $t$ -vrednost veća od  $t$ -vrednosti definisane za  $p=0,05$  u datom eksperimentalnom planu.

Statistička obrada eksperimentalnih podataka (analiza varijanse, ANOVA), generisanje matematičkih modela, kao i crtanje odzivnih površina i Pareto dijagrama urađeni su primenom softverskog paketa Statistica v13.2 (Dell Inc., SAD). Za optimizaciju vrednosti ispitivanih faktora primenjena je metoda željene funkcije, koja je zajedno sa crtanjem konturnih dijagrama odrađena u softverskom paketu Design-Expert<sup>®</sup> 8.1. (Stat-Ease, Inc., SAD).

Za definisanje optimalnog odnosa glukoze i glicerola (poglavlje 5.4.1) i sastojaka sa azotom (poglavlje 5.4.2) u medijumu za pripremu inokuluma kao eksperimentalni plan korišćen je dizajn smeše (*Simplex-Centroid Mixture Design*) za tri faktora sa ponavljanjem tri kombinacije ogleada. U cilju supstitucije dela glukoze glicerolom namešavani su glukoza ( $X_1$ , 0-100%), komercijalni glicerol ( $X_2$ , 0-100%) i sirovi glicerol ( $X_3$ , 0-100%) tako da ukupna početna koncentracija ovih izvora ugljenika u svim oglecima iznosi 10 g/l. Kao sastojci sa azotom u različitim udelima dodavani su ekstrakt kvasca ( $X_1$ , 0-100%), sladni ekstrakt ( $X_2$ , 0-100%) i pepton ( $X_3$ , 0-100%) pri čemu je njihova ukupna početna koncentracija u svim oglecima iznosila 11 g/l. U tabelama 4.2. i 4.3. prikazane su kodirane vrednosti i vrednosti navedenih nutrijenta variranih u skladu sa primenjenim eksperimentalnim planom.

Tabela 4.2. Dizajn smeše i varirane vrednosti sadržaja glukoze i glicerola u medijumu za pripremu inokuluma

Redni broj ogleada	Kodirane vrednosti			Varirane vrednosti		
	$X_1$ (%)	$X_2$ (%)	$X_3$ (%)	Glukoza (g/l)	Komercijalni glicerol (g/l)	Sirovi glicerol (g/l)
1	100,00	0	0	10,00	0	0
2	0	100,00	0	0	10,00	0
3	0	0	100,00	0	0	10,00
4	50,00	50,00	0	5,00	5,00	0
5	50,00	0	50,00	5,00	0	5,00
6	0	50,00	50,00	0	5,00	5,00
7	33,33	33,33	33,33	5,00	5,00	5,00
8	66,67	16,67	16,67	6,67	1,67	1,67
9	16,67	66,67	16,67	1,67	6,67	1,67
10	16,67	16,67	66,67	1,67	1,67	6,67
11	100,00	0	0	10,00	0	0
12	0	100,00	0	0	10,00	0
13	0	0	100,00	0	0	10,00

Tabela 4.3. Dizajn smeše i varirane vrednosti sadržaja sastojaka sa azotom u medijumu za pripremu inokuluma

Redni broj oglada	Kodirane vrednosti			Varirane vrednosti		
	X <sub>1</sub> (%)	X <sub>2</sub> (%)	X <sub>3</sub> (%)	Ekstrakt kvasca (g/l)	Sladni ekstrakt (g/l)	Pepton (g/l)
1	100,00	0	0	11,0	0	0
2	0	100,00	0	0	11,0	0
3	0	0	100,00	0	0	11,0
4	50,00	50,00	0	5,5	5,5	0
5	50,00	0	50,00	5,5	0	5,5
6	0	50,00	50,00	0	5,5	5,5
7	33,33	33,33	33,33	3,7	3,7	3,7
8	66,67	16,67	16,67	7,3	1,8	1,8
9	16,67	66,67	16,67	1,8	7,3	1,8
10	16,67	16,67	66,67	1,8	1,8	7,3
11	100,00	0	0	11,0	0	0
12	0	100,00	0	0	11,0	0
13	0	0	100,00	0	0	11,0

Za definisanje optimalnog odnosa glukoze i glicerola (poglavljje 5.4.1) i sastojaka sa azotom (poglavljje 5.4.2) u medijumu za pripremu inokuluma kao odziv je odabran sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu (Y, g/l). Rezultati eksperimentalnih određivanja fitovani su kvadratnom jednačinom sledećeg oblika:

$$Y=b_1 \cdot X+b_2 \cdot X_2+b_3 \cdot X_3+b_{12} \cdot X_1 \cdot X_2+b_{13} \cdot X_1 \cdot X_3+b_{23} \cdot X_2 \cdot X_3 \quad (4.9)$$

gde su:

Y - modelovani odziv,

X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> i X<sub>3</sub> - ispitivani faktori,

b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub> i b<sub>3</sub> - linearni koeficijenti i

b<sub>12</sub>, b<sub>23</sub> i b<sub>13</sub> - koeficijenti interakcije regresione jednačine.

Sa ciljem definisanja sadržaja sastojaka medijuma za pripremu inokuluma i koncentracije inokuluma koji se dodaje u medijum za biosintezu (poglavljje 5.4.3) korišćen je Boks-Benkenov eksperimentalni plan sa tri faktora na tri nivoa i tri ponavljanja u centralnoj tački. Kao faktori ispitivani su početni sadržaj glukoze i glicerola (dodati u odnosu 40:60) u medijumu za pripremu inokuluma (X<sub>1</sub>, 5-15 g/l), početni sadržaj sladnog ekstrakta u medijumu za pripremu inokuluma (X<sub>2</sub>, 5-15 g/l) i koncentracija inokuluma dodatog u medijum za biosintezu (X<sub>3</sub>, 5-15%). U tabeli 4.4. prikazane su kodirane vrednosti i vrednosti navedenih parametara varirane u skladu sa primenjenim eksperimentalnim planom.



Tabela 4.4. Boks–Benkenov eksperimentalni plan i varirane vrednosti sadržaja sastojaka medijuma za pripremu inokuluma i koncentracije inokuluma u medijumu za biosintezu

Redni broj ogleđa	Kodirane vrednosti			Varirane vrednosti		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Glu:Gly (g/l)	Sladni ekstrakt (g/l)	Inokulum (%, v/v)
1	-1	-1	0	5	5	10
2	1	-1	0	15	5	10
3	-1	1	0	5	15	10
4	1	1	0	15	15	10
5	-1	0	-1	5	10	5
6	1	0	-1	15	10	5
7	-1	0	1	5	10	15
8	1	0	1	15	10	15
9	0	-1	-1	10	5	5
10	0	1	-1	10	15	5
11	0	-1	1	10	5	15
12	0	1	1	10	15	15
13	0	0	0	10	10	10
14	0	0	0	10	10	10
15	0	0	0	10	10	10

*Glu:Gly – glukoza i glicerol dodati u odnosu 40:60*

Za definisanje sadržaja sastojaka medijuma za pripremu inokuluma i koncentracije inokuluma u medijumu za biosintezu (poglavlje 5.4.3) kao odziv analiziran je sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu (Y, g/l). Rezultati eksperimentalnih određivanja fitovani su kvadratnim polinomom:

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_{11} X_1^2 + b_{22} X_2^2 + b_{33} X_3^2 + b_{12} X_1 X_2 + b_{13} X_1 X_3 + b_{23} X_2 X_3 \quad (4.10)$$

gde su:

Y - modelovani odziv,

X<sub>1-3</sub> - ispitivani faktori,

b<sub>0</sub> - odsečak,

b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub>, b<sub>3</sub> - linearni koeficijenti,

b<sub>11</sub>, b<sub>22</sub>, b<sub>33</sub> - kvadratni koeficijenti i

b<sub>12</sub>, b<sub>13</sub>, b<sub>23</sub> - koeficijenti interakcije regresione jednačine.

Eksperimenti koji su za cilj imali definisanje vremena trajanja pripreme inokuluma (poglavlje 5.4.4) izvedeni su u skladu sa faktorijalnim dizajnom (*3-Level Factorial Design*) za dva faktora na tri nivoa i tri ponavljanja u centralnoj tački. Od faktora ispitivani su vreme trajanja prve faze pripreme inokuluma (X<sub>1</sub>, 24-48 h) i vreme trajanja druge faze pripreme inokuluma (X<sub>2</sub>, 24-48 h). U tabeli 4.5. prikazane su kodirane vrednosti i vrednosti navedenih parametara varirane u skladu sa primenjenim eksperimentalnim planom.

Tabela 4.5. Faktorijalni dizajn i varirane vrednosti vremena trajanja pripreme inokuluma

Redni broj ogleda	Kodirane vrednosti		Varirane vrednosti	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	t <sub>I</sub> (h)	t <sub>II</sub> (h)
1	-1	-1	24	24
2	-1	0	24	36
3	-1	1	24	48
4	0	-1	36	24
5	0	0	36	36
6	0	1	36	48
7	1	-1	48	24
8	1	0	48	36
9	1	1	48	48
10	0	0	36	36
11	0	0	36	36

*t<sub>I</sub>* - vreme trajanja prve faze pripreme inokuluma; *t<sub>II</sub>* - vreme trajanja druge faze pripreme inokuluma.

Za definisanje vremena trajanja pripreme inokuluma (poglavlje 5.4.4) kao odziv posmatran je sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu (Y, g/l). Rezultati eksperimentalnih određivanja fitovani su kvadratnim polinomom:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2 \quad (4.11)$$

gde su:

Y – modelovani odziv,

X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> – ispitivani faktori,

b<sub>0</sub> – odsečak,

b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub> – linearni koeficijenti,

b<sub>11</sub>, b<sub>22</sub> – kvadratni koeficijenti i

b<sub>12</sub> – koeficijent interakcije regresione jednačine.

Prilikom definisanja sadržaja glicerola i izvora azota u medijumu za biosintezu ksantana (poglavlje 5.5.1) korišćen je Boks–Benkenov eksperimentalni plan sa tri faktora na tri nivoa i tri ponavljanja u centralnoj tački. Kao faktori ispitivani su početni sadržaj glicerola poreklom iz sirovog glicerola (X<sub>1</sub>, 10-50 g/l), početni sadržaj ekstrakta kvasca (X<sub>2</sub>, 0-6 g/l) i početni sadržaj (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (X<sub>3</sub>, 0-3 g/l) u medijumu za biosintezu ksantana. U tabeli 4.6. prikazane su kodirane vrednosti i vrednosti navedenih parametara varirane u skladu sa primenjenim eksperimentalnim planom.

Tabela 4.6. Boks–Benkenov eksperimentalni plan i varirane vrednosti sadržaja nutrijenata u medijumu za biosintezu

Redni broj oglada	Kodirane vrednosti			Varirane vrednosti		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Glicerol (g/l)	Ekstrakt kvasca (g/l)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/l)
1	-1	-1	0	10	0	1,5
2	1	-1	0	50	0	1,5
3	-1	1	0	10	6	1,5
4	1	1	0	50	6	1,5
5	-1	0	-1	10	3	0
6	1	0	-1	50	3	0
7	-1	0	1	10	3	3,0
8	1	0	1	50	3	3,0
9	0	-1	-1	30	0	0
10	0	1	-1	30	6	0
11	0	-1	1	30	0	3,0
12	0	1	1	30	6	3,0
13	0	0	0	30	3	1,5
14	0	0	0	30	3	1,5
15	0	0	0	30	3	1,5

Kako bi se definisao sadržaj glicerola i izvora azota u medijumu za biosintezu ksantana (poglavlje 5.5.1) analizirano je nekoliko odziva, i to sadržaj biosintetisanog ksantana ( $Y_1$ , g/l), molekulska masa ksantana ( $Y_2$ ,  $10^5$  g/mol), rezidualni sadržaj glicerola ( $Y_3$ , g/l) i rezidualni sadržaj ukupnog azota ( $Y_4$ , mg/l). Rezultati eksperimentalnih određivanja fitovani su kvadratnim polinomom (jednačina 4.10).

## 5. REZULTATI I DISKUSIJA

U prvom delu ovog poglavlja predstavljeni su rezultati skrininga mogućnosti biosinteze ksantana primenom različitih sojeva roda *Xanthomonas* na polusintetičkim medijumima sa glukozom i komercijalnim glicerolom kao izvorima ugljenika. Drugi deo sadrži podatke o karakterizaciji sirovog glicerola, koji je generisan u domaćem pogonu za proizvodnju biodizela, a koji je korišćen u narednim fazama istraživanja. U trećem delu poglavlja dati su rezultati skrininga mogućnosti biosinteze ksantana primenom različitih sojeva roda *Xanthomonas* na medijumu sa prethodno okarakterisanim sirovim glicerolom kao jedinim izvorom ugljenika. U četvrtom delu poglavlja prikazani su rezultati standardizacije pripreme inokuluma za biosintezu ksantana prethodno odabranim proizvodnim sojem na medijumu sa sirovim glicerolom. U petom delu predstavljeni su rezultati ogleđa izvedenih sa ciljem formulacije sastava kultivacionog medijuma sa sirovim glicerolom za biosintezu ksantana primenom odabranog proizvodnog soja. Šesti deo poglavlja sadrži rezultate ispitivanja toka biosinteze ksantana u uvećanim ramerama delovanjem odabranog proizvodnog soja na medijumu sa sirovim glicerolom optimizovane formulacije.

### 5.1. SKRINING MOGUĆNOSTI BIOSINTEZE KSANTANA PRIMENOM SOJEVA *Xanthomonas* spp. NA MEDIJUMIMA SA RAZLIČITIM IZVORIMA UGLJENIKA

Prva faza istraživanja iz okvira ove doktorske disertacije, koja je za cilj imala skrining mogućnosti biosinteze ksantana primenom sojeva *Xanthomonas* spp. na polusintetičkim medijumima sa različitim izvorima ugljenika, izvedena je u nekoliko koraka, a dobijeni rezultati su podeljeni i prikazani u četiri dela. U prvom delu predstavljeni su rezultati ispitivanja uticaja selekcije proizvodnog soja i izvora ugljenika na količinu produkovanog ksantana (Zahović i sar., 2021a). Drugi deo sadrži rezultate ispitivanja uticaja selekcije proizvodnog soja i izvora ugljenika na kvalitet izdvojenog biopolimera (Zahović i sar., 2021a). U trećem delu su dati rezultati ispitivanja selekcije proizvodnog soja i vremena kultivacije na količinu ksantana produkovanog na kultivacionom medijumu sa komercijalnim glicerolom (Zahović i sar., 2021b), dok su u četvrtom delu dati rezultati ispitivanja selekcije proizvodnog soja i vremena kultivacije na kvalitet ksantana produkovanog na medijumu sa komercijalnim glicerolom (Zahović i sar., 2021b).

#### 5.1.1. Uticaj selekcije proizvodnog soja i izvora ugljenika na količinu ksantana

Glukoza i saharoza su najčešće korišćeni izvori ugljenika u medijumima za biosintezu ksantana (Niknezhad i sar., 2015). Međutim, porast cene i sve veća potražnja za ovim šećerima i sirovinama koje sadrže ove šećere ukazuju na potrebu pronalaska drugih izvora ugljenika. Ono što ograničava primenu novih i do sada slabo eksploatisanih neugljenohidratnih supstrata u biotehnološkoj proizvodnji ksantana jeste otežana sposobnost referentnog soja da metaboliše neke od njih, što zahteva upotrebu adekvatne proizvodne kulture (Roseiro i sar., 1992). Na osnovu navedene činjenice jasno je da je za svaku nestandardnu sirovinu potrebno pronaći

adekvatan proizvodni soj koji na medijumu željene formulacije produkuje ksantan odgovarajućeg kvaliteta u što većoj količini.

U skladu sa definisanim ciljem, prva faza istraživanja obuhvatala je skrining mogućnosti biosinteze ksantana na medijumu sa odabranim izvorom ugljenika i poređenje uspešnosti ovako izvedenih bioprocasa sa bioprocima u kojima su isti proizvodni sojevi kultivisani na uobičajeno primenjivanom polusintetičkom medijumu. Stoga su u ovom koraku korišćeni glukoza i komercijalni glicerol kao pojedinačni izvori ugljenika u medijumima za biosintezu ksantana. Sa ciljem odabira proizvodnog mikroorganizma, koji poseduje sposobnost biosinteze ksantana na medijumu sa glicerolom, kultivisano je ukupno 14 sojeva roda *Xanthomonas*, i to referentni soj *X. campestris* ATCC 13951 i 13 lokalnih izolata *Xanthomonas* spp. (poglavlje 4.1). Kultivacioni medijumi korišćeni u ovoj fazi istraživanja opisani su u poglavlju 4.2, dok su priprema inokuluma i uslovi biosinteze dati u poglavljima 4.3. i 4.4. ovog rada. Po završetku kultivacije ispitivanih sojeva izvršena je analiza medijuma kako bi se potvrdila mogućnost biosinteze ksantana i procenila uspešnost izvođenja bioprocasa u primenjenim eksperimentalnim uslovima. U cilju utvrđivanja da li je došlo do produkcije ksantana vršena su reološka merenja (poglavlje 4.6.2), a kao pokazatelj uspešnosti bioprocasa u ovoj fazi istraživanja određivan je sadržaj biosintetisanog ksantana na osnovu čije vrednosti je izračunat i stepen konverzije izvora ugljenika u proizvod (poglavlje 4.5). Dobijeni medijumi analizirani su i u pogledu vrednosti pH i sadržaja TDS (poglavlje 4.6.2).

Reološka svojstva medijuma za biosintezu sa različitim izvorima ugljenika, dobijenih po završetku kultivacije ispitivanih sojeva roda *Xanthomonas* u primenjenim eksperimentalnim uslovima, prikazana su u tabeli 5.1.

Tabela 5.1. Reološke karakteristike medijuma za biosintezu sa različitim izvorima ugljenika po završetku kultivacije sojeva *Xanthomonas* spp.

<i>Xanthomonas</i> sojevi	Medijum sa glukozom			Medijum sa komercijalnim glicerolom			
	K (Pa·s <sup>n</sup> )	n (1)	η <sub>a</sub> (mPa·s)	K (Pa·s <sup>n</sup> )	n (1)	η <sub>a</sub> (mPa·s)	
Izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača	ATCC13951	0,3666	0,4761	32,84±0,05	0,4093	0,4457	31,85±0,15
	Am	0,3954	0,4565	32,31±0,86	0,0560	0,6512	7,46±3,03
	KARFIOL	0,2294	0,5245	26,01±13,26	0,0573	0,6568	8,19±3,07
	KUPUS	0,4127	0,4257	29,24±0,43	0,2398	0,5233	24,94±4,67
	KELJ	0,3499	0,4610	29,08±0,94	0,0627	0,6047	6,73±3,62
	Xp 3-1	0,3054	0,4702	27,16±0,83	0,0645	0,4702	4,23±3,38
	Xp 7-2	0,252	0,5024	25,32±1,40	0,0560	0,5570	4,97±2,14
	Mn 7-2	0,2971	0,4706	25,58±1,97	0,0817	0,5430	6,24±3,42
12-2	0,2465	0,4706	21,49±3,02	0,0628	0,6378	7,71±3,84	
Izolati sa listova paprika	PAP LIST 1	0,1512	0,4708	11,96±2,91	0,4391	0,4285	31,38±3,10
	PAP LIST 2	0,1398	0,4908	11,72±3,24	0,2408	0,5045	24,29±2,34
	PAP LIST 3	0,0966	0,5234	10,34±2,86	0,4474	0,4358	32,89±4,38
	PAP LIST 4	0,0994	0,5125	9,98±1,39	0,4637	0,4354	34,43±1,25
	PAP LIST 5	0,0727	0,5658	9,84±1,08	0,4119	0,4586	30,50±7,48

K – faktor konzistencije; n – indeks toka; η<sub>a</sub> – prividni viskozitet.

Kultivacione tečnosti i rastvori ksantana su nenjutnovski fluidi koji pokazuju pseudoplastični tip proticanja (García-Ochoa i sar., 2000). Pseudoplastične karakteristike proizvodnih medijuma sa različitim izvorima ugljenika, dobijenih po završetku kultivacije ispitivanih proizvodnih sojeva,

potvrđene su vrednostima indeksa toka ( $n$ ) datih u tabeli 5.1. Indeks toka predstavlja nivo odstupanja ponašanja od Njutnovskog. Za Njutnovski fluid indeks toka je jednak jedinici, veći je od jedan za dilatantne, a manji od jedan za pseudoplastične fluide (Björn i sar., 2012). Vrednosti indeksa toka medijuma analiziranih u ovom istraživanju kretale su se u intervalu od 0,4257 do 0,5245 i od 0,4457 do 0,6568 prilikom kultivacije izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača kada su kao izvori ugljenika dodati glukoza i komercijalni glicerol, redom. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa prethodno dobijenim rezultatima gde su vrednosti indeksa toka medijuma za biosintezu sa glukozom i komercijalnim glicerolom (20 g/l) po završetku kultivacije sojeva *Xanthomonas* izolovanih sa listova biljaka iz porodice kupusnjača bile u opsegu od 0,4070 do 0,6884 i od 0,4338 do 0,5246, redom (Bajić i sar., 2015b). Kod izolata sa listova paprika ove vrednosti nisu bile mnogo drugačije prilikom kultivacije na medijumu sa glukozom i kretale su se u intervalu od 0,4708 do 0,5658, dok su se prilikom kultivacije na medijumu sa komercijalnim glicerolom vrednosti ovog reološkog parametra kretale od 0,4285 do 0,5045 (tabela 5.1). Faktor konzistencije je reološki parametar koji je direktno proporcionalan viskozitetu. Vrednosti faktora konzistencije proizvodnih medijuma sa glukozom i komercijalnim glicerolom po završetku kultivacije sojeva *Xanthomonas* izolovanih sa listova biljaka iz porodice kupusnjača bile su u opsegu od 0,2465 Pa·s<sup>n</sup> do 0,4127 Pa·s<sup>n</sup> i od 0,0560 Pa·s<sup>n</sup> do 0,4093 Pa·s<sup>n</sup>, redom (tabela 5.1). Po završetku kultivacije sojeva *Xanthomonas* izolovanih sa listova paprika na medijumima sa glukozom i komercijalnim glicerolom dobijeni su medijumi čiji faktor konzistencije je bio u opsegu od 0,0727 Pa·s<sup>n</sup> do 0,1512 Pa·s<sup>n</sup> i od 0,2408 Pa·s<sup>n</sup> do 0,4637 Pa·s<sup>n</sup>, redom (tabela 5.1). Uzimajući u obzir da viskozitet rastvora ksantana zavisi od koncentracije biopolimera, njegove molekulske mase, dužine i sastava lanaca makromolekula, kao i stepena njihove umreženosti (García-Ochoa i sar., 2000), različite vrednosti faktora konzistencije prikazane u tabeli 5.1. ukazuju na razliku u količini i kvalitetu ksantana biosintetisanog u primenjenim eksperimentalnim uslovima primenom ispitivanih sojeva roda *Xanthomonas* na medijumima sa različitim izvorima ugljenika. Na osnovu prethodno pomenutih vrednosti indeksa toka i faktora konzistencije izračunati su prividni viskoziteti medijuma sa različitim izvorima ugljenika dobijenih po završetku kultivacije ispitivanih izolata roda *Xanthomonas*.

Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 5.1, a ukazuju na to da su se vrednosti prividnog viskoziteta medijuma za biosintezu sa glukozom nakon kultivacije izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača kretale od 21,49±3,02 mPa·s do 32,84±0,05 mPa·s, dok su se vrednosti prividnog viskoziteta medijuma sa komercijalnim glicerolom nakon kultivacije istih sojeva kretale od 4,23±3,38 mPa·s do 31,85±0,15 mPa·s. Međutim, evidentno je da su samo prilikom kultivacije referentnog soja i soja označenog kao KUPUS ostvarene veće vrednosti prividnog viskoziteta za medijum sa komercijalnim glicerolom, a ove vrednosti iznose 31,85±0,15 mPa·s i 24,94±4,67 mPa·s, redom. Za medijume analizirane po završetku kultivacije ostalih sojeva iz ove grupe izolata izračunate su dosta manje vrednosti prividnog viskoziteta od prethodno diskutovanih. Dobijeni rezultati sugerišu da se prilikom kultivacije izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača na proizvodnom medijumu sa glukozom dobija medijum većeg viskoziteta u poređenju sa kultivacijom istih sojeva na medijumu sa komercijalnim glicerolom. Uzimajući u obzir rezultate istraživanja Zhong-a i saradnika iz 2013. godine, gde je utvrđeno da prilikom porasta koncentracije ksantana u rastvoru dolazi do porasta viskoziteta tog rastvora, može se pretpostaviti da se prilikom kultivacije izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača na medijumu za biosintezu sa glukozom dobija veća količina ksantana u poređenju sa kultivacijom

istih sojeva na medijumu sa komercijalnim glicerolom. Svakako, ne bi trebalo isključiti ni uticaj kvaliteta makromolekula ksantana na viskozitet njegovih rastvora.

Prilikom biosinteze ksantana primenom izolata sa listova paprika na istim medijuma dolazi do suprotnog ponašanja. Vrednosti prividnog viskoziteta proizvodnih medijuma sa glukozom nakon biosinteze ksantana primenom izolata sa listova paprika kretale su se od  $9,84 \pm 1,08$  mPa·s do  $11,96 \pm 2,91$  mPa·s, dok su se vrednosti prividnog viskoziteta medijuma sa komercijalnim glicerolom po završetku kultivacije istih izolata kretale od  $24,29 \pm 2,34$  mPa·s pa sve do  $34,43 \pm 1,25$  mPa·s. Iz navedenih rezultata može se primetiti da je veći viskozitet medijuma dobijen nakon biosinteze ksantana na medijumu sa komercijalnim glicerolom primenom ove grupe izolata roda *Xanthomonas*. Dobijeni rezultati prividnog viskoziteta sugerišu da se prilikom kultivacije izolata sa listova paprika na medijumu za biosintezu sa komercijalnim glicerolom produkuje ksantan u većoj količini nego na medijumu sa glukozom. Takođe, za izvođenje konačnih zaključaka trebalo bi pored sadržaja ksantana odrediti i njegov kvalitet.

Metabolička aktivnost odabranog proizvodnog soja na medijumu optimalne formulacije u značajnoj meri zavisi od uslova sredine kakvi su vrednost pH, temperatura i sadržaj rastvorenog kiseonika (Dodić i Grahovac, 2013). Vrednost pH kultivacionog medijuma predstavlja važan parametar za uspešno izvođenje biotehnološkog procesa proizvodnje ksantana. Optimalna vrednost pH za biosintezu ksantana kreće se između 7,0 i 8,0, a kritična vrednost iznosi 5,5 (Sherley i Priyadharshini, 2015). Shodno tome, inicijalne vrednosti pH medijuma korišćenih za biosintezu ksantana u ovim ispitivanjima podešene su na 7,0. Tokom izvođenja mikrobiološkog procesa vrednost pH medijuma se menja usled trošenja katjona i/ili anjona i lučenja primarnih ili sekundarnih metabolita u okolinu (Baras i sar., 2009). Po završetku biosinteze ksantana u okviru ovog istraživanja izvršeno je merenje vrednosti pH proizvodnih medijuma, a dobijene vrednosti date su u tabeli 8.1. (Prilog 1). Izmerene vrednosti pH proizvodnih medijuma sa glukozom nakon biosinteze ksantana kretale su se od  $5,26 \pm 0,02$  do  $6,36 \pm 0,04$  kada su korišćeni izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača, dok su nešto niže vrednosti zabeležene nakon biosinteze primenom izolata sa listova paprika i iznosile su od  $4,72 \pm 0,02$  do  $4,78 \pm 0,03$ . Sa druge strane, vrednosti pH proizvodnih medijuma sa komercijalnim glicerolom nakon biosinteze ksantana kretale su se od  $5,11 \pm 0,04$  do  $7,52 \pm 0,04$  kada su korišćeni izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača i od  $6,62 \pm 0,04$  do  $6,94 \pm 0,03$  kada su korišćeni izolati sa listova paprika, što se može videti iz tabele 8.1. (Prilog 1). I u ovom slučaju dolazi do opadanja vrednosti pH medijuma od neutralne do vrednosti oko 5,0 prilikom kultivacije nekih sojeva što je posledica biosinteze organskih kiselina i ksantana, koji sadrži kisele funkcionalne grupe (García-Ochoa i sar., 2000). Kod manjeg broja ispitivanih izolata dolazi do blagog porasta vrednosti pH medijuma prilikom biosinteze ksantana što je u saglasnosti sa rezultatima istraživanja naučnika iz Grčke gde se vrednost pH medijuma dobijenih nakon biosinteze ksantana kretala od 7,0 do 10,0 (Psomas i sar., 2007). Varijacije u vrednostima pH proizvodnih medijuma po završetku biosinteze ksantana u primenjenim eksperimentalnim uslovima najverovatnije su uzrokovane varijacijama u fiziološkim karakteristikama među primenjenim proizvodnim sojevima (Nitschke i Thomas, 1995).

Iz prethodno diskutovanih rezultata može se uočiti da je vrednost pH pala ispod kritične u dosta izvedenih ogleda. Ipak, primetno je da je vrednost pH medijuma za biosintezu sa komercijalnim glicerolom po završetku kultivacije svih izolata sa listova paprika bila dosta iznad kritične

vrednosti. Ovi rezultati su značajni iz ugla ekonomske isplativosti bioprocesa u kojem je potencijalno moguća proizvodnja ksantana na medijumu sa glicerolom bez troškova korigovanja vrednosti pH tokom izvođenja bioprocesa.

Za pravilan rast i metabolizam ćelija proizvodnog mikroorganizma neophodne su mineralne materije koje se u kultivacioni medijum dodaju u obliku čvrstih soli. Njihova rastvorljivost zavisi od temperature i vrednosti pH medijuma, koja se menja tokom vremena. Tokom izvođenja mikrobiološkog procesa sadržaj ukupnih rastvorenih soli, odnosno sadržaj TDS se menjao usled trošenja katjona i/ili anjona i lučenja primarnih i/ili sekundarnih metabolita u okolinu (Baras i sar., 2009). Po završetku biosinteze ksantana u okviru ovog istraživanja izvršeno je merenje sadržaja TDS u proizvodnim medijumima, a dobijene vrednosti date su u tabeli 8.2. (Prilog 1). Izmerene vrednosti sadržaja TDS u medijumu sa glukozom nakon biosinteze ksantana kretale su se od 2,54 g/l do 2,68 g/l kada su korišćeni izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača i od 2,61 g/l do 2,67 g/l kada su primenjeni izolati sa listova paprika. Nakon kultivacije izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača na proizvodnom medijumu sa komercijalnim glicerolom izmerene su vrednosti sadržaja TDS od 2,61 g/l do 2,80 g/l i od 2,67 g/l do 2,77 g/l kada su primenjeni izolati sa listova paprika. Na osnovu dobijenih rezultata može se uočiti da se sadržaj TDS u svim izvedenim ogledima prilikom kultivacije navedene dve grupe izolata roda *Xanthomonas* nije značajno razlikovao i nalazi se u granicama potrebnim za nesmetanu metaboličku aktivnost proizvodnog mikroorganizma.

Uspešnost izvođenja bioprocesa u primenjenim uslovima procenjena je na osnovu podataka dobijenih statističkom analizom eksperimentalno određenih vrednosti sadržaja biosintetisanog ksantana u medijumu za biosintezu kao odabranog pokazatelja uspešnosti bioprocesa. Dvofaktorijalna analiza varijanse uticaja različitih proizvodnih sojeva i izvora ugljenika na sadržaj biosintetisanog ksantana izvršena je sa ciljem utvrđivanja statističke značajnosti uticaja ispitivanih faktora, kao i njihove kombinacije na količinu produkovanog ksantana. Rezultati ove statističke analize sumarno su prikazani u tabeli 5.2.

Tabela 5.2. Dvofaktorijalna analiza varijanse uticaja različitih proizvodnih sojeva i izvora ugljenika na sadržaj ksantana u medijumima za biosintezu

<i>Xanthomonas</i> sojevi	Izvor varijabiliteta	SS	DF	MS	F-odnos	p-vrednost
<b>Izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača</b>	Proizvodni soj	189,510	8	23,689	119,020	< 0,000001
	Izvor ugljenika	64,587	1	64,587	324,490	< 0,000001
	Proizvodni soj i izvor ugljenika	153,670	8	19,209	96,510	< 0,000001
	Greška	7,165	36	0,199	-	-
<b>Izolati sa listova paprika</b>	Proizvodni soj	17,399	4	4,350	22,245	< 0,000001
	Izvor ugljenika	85,629	1	85,629	437,931	< 0,000001
	Proizvodni soj i izvor ugljenika	11,820	4	2,955	15,113	< 0,000001
	Greška	3,911	20	0,196	-	-

SS – suma kvadrata; DF – stepen slobode; MS – srednja vrednost kvadrata.

Rezultati dvofaktorijalne analize varijanse pokazali su da proizvodni soj, izvor ugljenika, kao i njihova kombinacija kod obe ispitivane grupe izolata imaju statistički značajan uticaj na količinu



produkovano ksantana, što potvrđuje  $p$ -vrednost manja od 0,05 u sva tri slučaja (tabela 5.2). Da proizvodni soj i izvor ugljenika značajno utiču na proizvodnju ksantana potvrdili su i naučnici iz Brazila u svojim istraživanjima u okviru kojih je biosinteza ksantana vršena na različitim kultivacionim medijumima primenom 18 različitih sojeva *Xanthomonas* izolovanih sa šljiva, breskvi i mandarina (Moreira i sar., 2001).

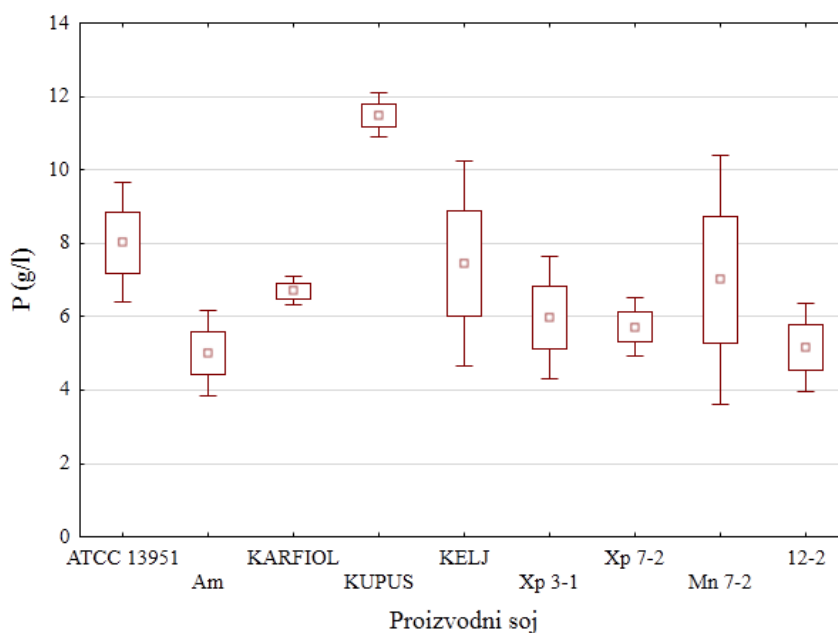
Ukoliko se obrati pažnja na srednje vrednosti kvadrata prikazane u tabeli 5.2. za izolate sa listova biljaka iz porodice kupusnjača može se zaključiti da izvor ugljenika (64,587) značajnije utiče na produkciju ksantana u primenjenim eksperimentalnim uslovima, dok je uticaj proizvodnog soja (23,689) dosta manji. Srednje vrednosti kvadrata prikazane u tabeli 5.2. pokazuju da kombinacija proizvodnog soja i izvora ugljenika (19,209) u najmanjoj meri utiče na ovu grupu rezultata. Posmatrajući srednje vrednosti kvadrata kod izolata sa listova paprika (tabela 5.2) može se zaključiti da izvor ugljenika (85,629) ima najveći uticaj na sadržaj biosintetisanog ksantana, dok je uticaj proizvodnog soja (4,350), kao i kombinacije proizvodnog soja i izvora ugljenika (2,955) daleko manji.

Rezultati statističke analize prikazani su i grafički na slikama 5.1-5.4, a kako bi se odabrala kombinacija proizvodnog soja i izvora ugljenika pri kojoj se ostvaruje najveća produkcija ksantana eksperimentalni podaci su analizirani i primenom Dankanovog testa višestrukih poređenja čiji su rezultati dati u tabeli 5.3.

Na slici 5.1. prikazani su rezultati statističke analize uticaja selekcije proizvodnog soja iz grupe izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača na količinu ksantana produkovanog u medijumima za biosintezu sa različitim izvorima ugljenika. Uzimajući u obzir rezultate prikazane na pomenutoj slici, a bez obzira na izvor ugljenika u medijumu, jasno je da se kao najbolji pokazao soj KUPUS koji je u primenjenim eksperimentalnim uslovima produkovao ksantan u najvećoj koncentraciji. Grafički predstavljeni rezultati ukazuju da su, pored referentnog soja, izolati KELJ i Mn 7-2 pokazali takođe dobru produktivnost, dok su i drugi ispitivani sojevi proizvodili ksantan, ali u znatno manjoj količini. Razlike u količini ksantana najverovatnije su uzrokovane razlikama u fiziološkim karakteristikama među korišćenim proizvodnim sojevima (Moreira i sar., 2001). Najmanji sadržaj ksantana u proizvodnom medijumu ostvaren je prilikom kultivacije sojeva 12-2 i Am. Sadržaj ksantana po završetku kultivacije ispitivanih sojeva roda *Xanthomonas*, izolovanih sa listova biljaka iz porodice kupusnjača, u primenjenim eksperimentalnim uslovima kretao se od oko 4 g/l do 12 g/l. Ostvarene vrednosti su mnogo veće u poređenju sa rezultatima dobijenim u okviru drugih istraživanja gde je najveći sadržaj ksantana od 6,8 g/l postignut kultivacijom soja *X. campestris* izolovanog sa inficiranog lista kupusa na medijumu koji je sadržao 20 g/l glukoze (Kassim, 2011). Sa druge strane, vrednosti sadržaja ksantana ostvarene u okviru ovog ispitivanja su u saglasnosti sa rezultatima istraživanja sprovednih u Brazilu gde su za biosintezu ksantana primenjeni sojevi *X. campestris* izolovani sa različitih inficiranih biljaka iz porodice kupusnjača, i to karfiola, brokolija i kupusa (Nitschke i Rodrigues, 2000).

Rezultati statističke analize uticaja selekcije proizvodnog soja iz grupe izolata sa listova paprika na količinu ksantana, koja je produkovana u medijumima sa različitim izvorima ugljenika, prikazani su na slici 5.2. Posmatrajući grafički predstavljene rezultate može se primetiti da su u ovom slučaju prisutne manje razlike u produkciji ksantana u odnosu na prethodno diskutovanu grupu rezultata (slika 5.1). Prema dobijenim rezultatima najveći sadržaj ksantana, bez obzira na

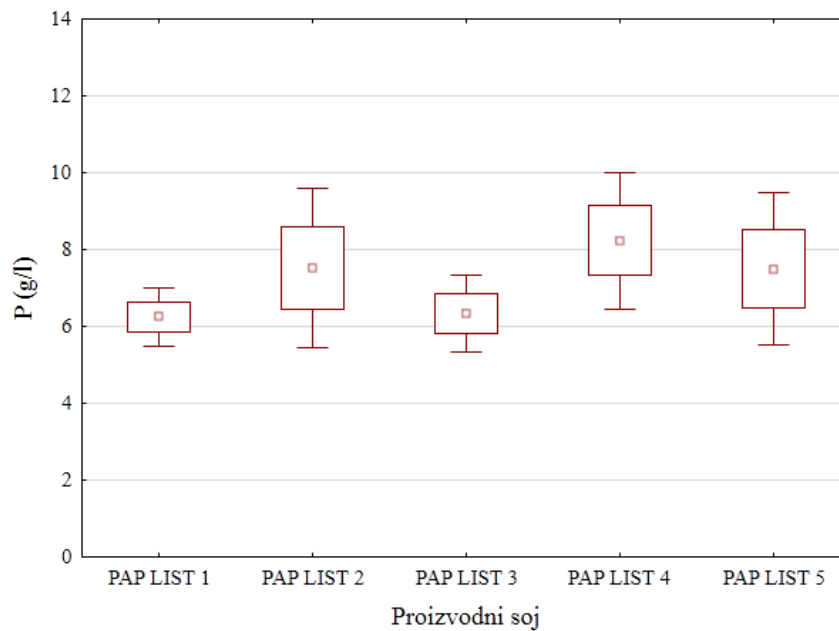
izvor ugljenika u medijumu, ostvaren je prilikom kultivacije soja PAP LIST 4. Međutim, sojevi PAP LIST 2 i PAP LIST 5 takođe su pokazali veliku produktivnost u primenjenim eksperimentalnim uslovima. Najmanji sadržaj ksantana ostvaren je prilikom kultivacije sojeva PAP LIST 2 i PAP LIST 3. Sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu ostvaren u ovom ispitivanju kretao se u opsegu od oko 6 g/l do 10 g/l. Dobijene vrednosti su u saglasnosti sa rezultatima ostvarenim u okviru istraživanja sprovedenih u Turskoj prilikom kojih je soj *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, izolovan sa lista paprika, na medijumu sa 40 g/l glukoze produkovao ksantan u koncentraciji od 6,4 g/l (Gumus i sar., 2010).



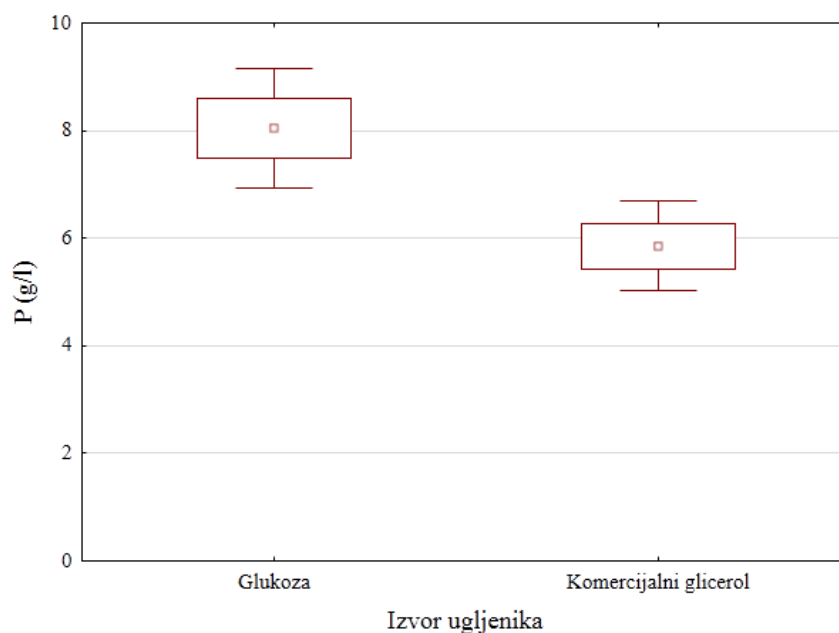
Slika 5.1. Uticaj selekcije proizvodnog soja na sadržaj ksantana (P) u medijumima za biosintezu sa različitim izvorima ugljenika: izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača

Na slici 5.3. prikazani su rezultati statističke analize uticaja selekcije izvora ugljenika na količinu ksantana u medijumu za biosintezu dobijenog primenom izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača, bez obzira na primenjeni soj iz ove grupe izolata. Kao što je već diskutovano, *p*-vrednosti prikazane u tabeli 5.2. ukazuju na razliku u vrednostima sadržaja ksantana ostvarenim prilikom kultivacije proizvodnih sojeva na medijumima sa različitim izvorima ugljenika. Prema rezultatima predstavljenim na slici 5.3, veći sadržaj ksantana se ostvaruje prilikom kultivacije izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača na medijumu sa glukozom. Dakle, dobijeni rezultati sugerišu da je glukoza pogodniji izvor ugljenika za biosintezu ksantana primenom izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača. Ovo je u saglasnosti sa rezultatima iz dostupne naučne literature gde je navedeno da je prilikom kultivacije soja *X. campestris* GK6 izolovanog sa inficiranog lista kupusa na medijumima sa različitim izvorima ugljenika najveći sadržaj ksantana ostvaren upravo na medijumu sa glukozom u koncentraciji od 20 g/l (Leela i Sharma, 2000). Nitschke i Thomas (1995) su u svom istraživanju takođe potvrdili da je glukoza pogodan izvor ugljenika za postizanje visokog prinosa ksantana primenom sojeva *Xanthomonas*

izolovanih sa listova biljaka iz porodice kupusnjača, pri čemu je produkovan ksantan u koncentraciji od 10,60 g/kg do 14,50 g/kg.



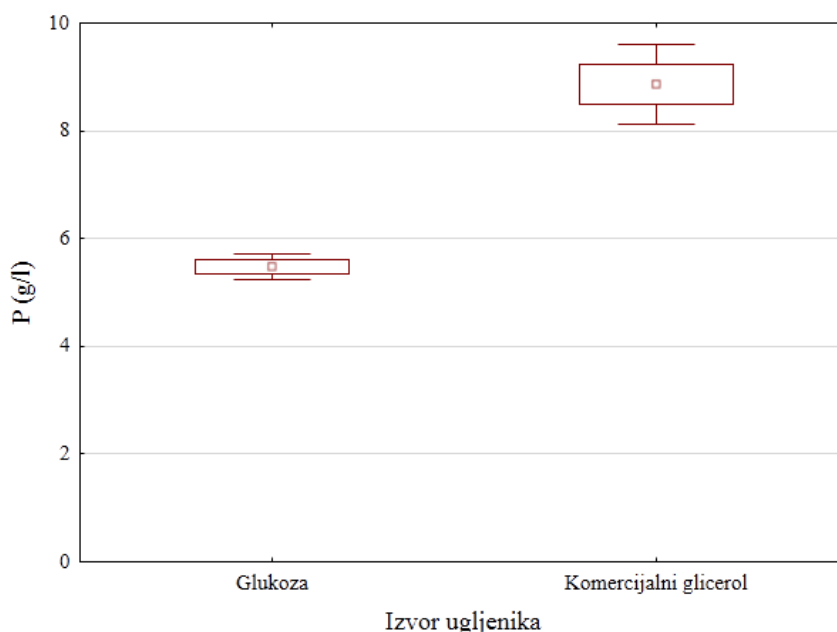
Slika 5.2. Uticaj selekcije proizvodnog soja na sadržaj ksantana (P) u medijumima za biosintezu sa različitim izvorima ugljenika: izolati sa listova paprika



Slika 5.3. Uticaj selekcije izvora ugljenika na sadržaj ksantana (P) u medijumu za biosintezu: izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača

Rezultati statističke analize uticaja selekcije izvora ugljenika na sadržaj ksantana koji se nalazi u medijumu za biosintezu po završetku kultivacije izolata sa listova paprika, bez obzira na

primenjeni soj iz ove grupe izolata, prikazani su na slici 5.4. Grafički predstavljeni rezultati se značajno razlikuju od prethodno diskutovanih (slika 5.3). Rezultati prikazani na slici 5.4. ukazuju na to da je prilikom kultivacije izolata sa listova paprika na medijumu sa komercijalnim glicerolom biosintetisano više ksantana nego na medijumu sa najčešće korišćenim izvorom ugljenika, glukozom. Dobijeni rezultati upućuju na zaključak da su *Xanthomonas* sojevi izolovani sa listova paprika produktivniji na medijumu sa komercijalnim glicerolom.



Slika 5.4. Uticaj selekcije izvora ugljenika na sadržaj ksantana (P) u medijumu za biosintezu: izolati sa listova paprika

Rezultati statističke analize ukazuju na to da se kao najpogodniji izvor ugljenika u medijumu za biosintezu ksantana primenom izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača izdvaja glukoza, dok se kao najpogodniji izvor ugljenika u medijumu za biosintezu ksantana primenom izolata sa listova paprika izdvaja komercijalni glicerol. Do ove razlike najverovatnije dolazi usled varijacija u sposobnosti različitih sojeva roda *Xanthomonas* da metabolišu različite izvore ugljenika (Verniere i sar., 1993).

Homogene grupe proizvodnih sojeva i izvora ugljenika u medijumima za biosintezu na osnovu statističke značajnosti razlika u detektovanom sadržaju ksantana ustanovljene su primenom Dankanovog testa višestrukih poređenja i prikazane su u tabeli 5.3.

Rezultati prikazani u tabeli 5.3. ukazuju da svi primenjeni sojevi roda *Xanthomonas* na oba ispitivana medijuma produkuju ksantan, kao i da je utvrđena statistički značajna razlika među određenim količinama. Sadržaj biosintetisanog ksantana kretao se od  $3,13 \pm 0,12$  g/l do  $11,98 \pm 0,60$  g/l kod izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača, što je u saglasnosti sa rezultatima prethodnih istraživanja gde je prilikom kultivacije izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača na medijumima sličnog sastava (20 g/l glukoza i 20 g/l komercijalni glicerol) ostvaren sadržaj ksantana od 3,65 g/l do 13,24 g/l (Bajić i sar., 2015b). Dobijeni

rezultati pokazuju veliku uspešnost i u poređenju sa rezultatima drugih istraživanja gde je prilikom kultivacije izolata roda *Xanthomonas* na medijumima sa 40 g/l glukoze produkovan ksantan u koncentracijama od 8,22 g/l (Gumus i sar., 2010), dok je na medijumu sa 50 g/l saharoze produkovan ksantan u koncentraciji od 8,40 g/l (Moreira i sar., 2001) i 9,67 g/l (Rotavva i sar., 2009). Soj KUPUS pokazao je najbolju produktivnost među sojevima iz grupe izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača jer je u primenjenim eksperimentalnim uslovima na medijumu sa glukozom produkovao ksantan u najvećoj koncentraciji koja iznosi  $11,98 \pm 0,60$  g/l. Ovaj proizvodni soj je, za razliku od većine ostalih izolata biljaka iz porodice kupusnjača, veoma dobru produktivnost ostvario i na medijumu sa komercijalnim glicerolom, koji je po završetku bioprocesa sadržao  $11,01 \pm 0,61$  g/l ksantana. Najniže vrednosti koncentracije ksantana detektovane su u medijumu za biosintezu sa komercijalnim glicerolom po završetku kultivacije soja Mn 7-2, odnosno u medijumima sa glukozom nakon delovanja sojeva Am i 12-2 u primenjenim eksperimentalnim uslovima, redom. Među ovim vrednostima ne postoji statistički značajna razlika, što potvrđuju *p*-vrednosti veće od 0,05.

Tabela 5.3. Dankanov test višestrukih poređenja: sadržaj ksantana u medijumima za biosintezu sa različitim izvorima ugljenika po završetku kultivacije sojeva *Xanthomonas* spp.

Izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača			Izolati sa listova paprika		
Proizvodni soj	Izvor ugljenika	P (g/l)	Proizvodni soj	Izvor ugljenika	P (g/l)
Mn 7-2	Komercijalni glicerol	$3,13 \pm 0,12^a$	PAP LIST 2	Glukoza	$5,17 \pm 0,39^a$
Am	Glukoza	$3,76 \pm 0,46^{ab}$	PAP LIST 3	Glukoza	$5,25 \pm 0,27^a$
12-2	Glukoza	$3,82 \pm 0,39^{ab}$	PAP LIST 5	Glukoza	$5,27 \pm 0,27^a$
Xp 3-1	Komercijalni glicerol	$4,11 \pm 0,29^{bc}$	PAP LIST 1	Glukoza	$5,45 \pm 0,29^a$
KELJ	Komercijalni glicerol	$4,28 \pm 0,28^{bc}$	PAP LIST 4	Glukoza	$6,24 \pm 0,42^b$
Xp 7-2	Komercijalni glicerol	$4,83 \pm 0,18^c$	PAP LIST 1	Komercijalni glicerol	$7,04 \pm 0,55^c$
ATCC 13951	Komercijalni glicerol	$6,19 \pm 0,32^d$	PAP LIST 3	Komercijalni glicerol	$7,42 \pm 0,36^c$
Am	Komercijalni glicerol	$6,25 \pm 0,54^d$	PAP LIST 5	Komercijalni glicerol	$9,73 \pm 0,56^d$
KARFIOL	Komercijalni glicerol	$6,36 \pm 0,35^d$	PAP LIST 2	Komercijalni glicerol	$9,86 \pm 0,51^d$
12-2	Komercijalni glicerol	$6,51 \pm 0,44^d$	PAP LIST 4	Komercijalni glicerol	$10,22 \pm 0,63^d$
Xp 7-2	Glukoza	$6,58 \pm 0,39^d$			
KARFIOL	Glukoza	$7,02 \pm 0,37^d$			
Xp 3-1	Glukoza	$7,85 \pm 0,61^e$			
ATCC 13951	Glukoza	$9,84 \pm 0,59^f$			
KELJ	Glukoza	$10,62 \pm 0,57^g$			
Mn 7-2	Glukoza	$10,88 \pm 0,51^g$			
KUPUS	Komercijalni glicerol	$11,01 \pm 0,61^g$			
KUPUS	Glukoza	$11,98 \pm 0,60^h$			

*P*- sadržaj biosintetisanog ksantana;

\* Vrednosti u jednoj koloni obeležene istim slovima nalaze se na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja od 95%.

Prilikom kultivacije izolata sa listova paprika, u primenjenim eksperimentalnim uslovima na oba ispitivana medijuma, sadržaj biosintetisanog ksantana kretao se od  $5,17 \pm 0,39$  g/l do  $10,22 \pm 0,63$  g/l (tabela 5.3). Sadržaj ksantana ostvaren u ovom istraživanju u saglasnosti je sa sadržajem ksantana koji je ostvaren prilikom kultivacije istih izolata na medijumima sa različitim izvorima ugljenika gde se sadržaj biosintetisanog ksantana kretao od  $2,24 \pm 0,32$  g/l do

13,20±0,76 g/l (Rončević i sar., 2019). Kao najbolji proizvodni soj iz grupe izolata sa listova paprika izdvojio se soj PAP LIST 4 koji je na medijumu sa komercijalnim glicerolom produkovao ksantan u koncentraciji od 10,22±0,63 g/l (tabela 5.3). Ova vrednost se nalazi na istom nivou značajnosti kao i sadržaj ksantana koji je detektovan u istom medijumu primenom sojeva PAP LIST 2 i PAP LIST 5, što potvrđuju *p*-vrednosti veće od 0,05. Najmanje koncentracije ksantana ostvarene su prilikom kultivacije sojeva PAP LIST 2, PAP LIST 3, PAP LIST 5 i PAP LIST 1 na medijumu sa glukozom, redom. Između navedenih rezultata nema statistički značajne razlike, što potvrđuju *p*-vrednosti veće od 0,05. Sadržaj ksantana produkovan prilikom kultivacije sojeva PAP LIST 2, PAP LIST 3, PAP LIST 5 i PAP LIST 1 na medijumu sa glukozom u saglasnosti je sa rezultatima istraživanja u kojem su na medijumu sa saharozom (50 g/l) kultivisani različiti izolati roda *Xanthomonas* izolovani u Brazilu pri čemu su ostvarene koncentracije ksantana od 5,90 g/l do 9,67 g/l, (Rottava i sar., 2009). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim prilikom kultivacije sojeva *Xanthomonas* izolovanih sa citrusa na medijumu sa glukozom (20 g/l) prilikom čega je biosintetisan ksantan u koncentraciji od 0,54 g/l do 6,47 g/l (Wadhai i Dixit, 2011).

Kao što je prethodno navedeno, rezultati prikazani u tabeli 5.3. pokazuju da soj KUPUS prilikom kultivacije na medijumu sa komercijalnim glicerolom u primenjenim eksperimentalnim uslovima biosintetiše ksantan u velikoj količini, što sugeriše da jedino ovaj izolat sa listova biljaka iz porodice kupusnjača poseduje sposobnost produkcije ksantana u većoj količini i na medijumu sa glicerolom kao jedinim izvorom ugljenika. Sa druge strane, svih pet izolata sa listova paprika pokazuju dosta veću produktivnost na medijumu sa komercijalnim glicerolom nego što je to slučaj na medijumu sa glukozom. Ipak sojevi PAP LIST 2, PAP LIST 4 i PAP LIST 5 se izdvajaju kao najproduktivniji u primenjenim eksperimentalnim uslovima. Budući da je jedan od ciljeva ove faze istraživanja selekcija sojeva koji na medijumu sa glicerolom ostvaruju najbolju produktivnost u primenjenim eksperimentalnim uslovima, izvršena je dodatna statistička obrada podataka za sadržaj ksantana koji je detektovan u medijumima sa komercijalnim glicerolom po završetku kultivacije navedenih sojeva. Dobijeni rezultati prikazani su tabelarno (tabele 8.3. i 8.4) u Prilogu 1 ove doktorske disertacije. Rezultati jednofaktorijalne analize varijanse (tabela 8.3) pokazuju da varijacija proizvodnog soja među selektovanim izolatima nema statistički značajan uticaj na sadržaj biosintetisanog ksantana, na šta ukazuje *p*-vrednost od 0,096778. Sa druge strane, rezultati Dankanovog testa višestrukih poređenja (tabela 8.4) ukazuju na formiranje dve grupe sojeva među kojima nema statistički značajne razlike u pogledu produktivnosti pri čemu se sojevi KUPUS i PAP LIST 4 izdvajaju kao najproduktivniji. Kultivacijom navedenih sojeva na medijumu sa komercijalnim glicerolom dobijaju se kultivacione tečnosti među kojima nema statistički značajne razlike u pogledu sadržaja biosintetisanog ksantana (*p*=0,133227). Ovo ukazuje da selektovani izolati poseduju značajan potencijal primene u biotehnološkoj proizvodnji ksantana na medijumu sa glicerolom kao jedinim izvorom ugljenika.

Pored prinosa, konverzija supstrata u proizvod veoma je značajan pokazatelj uspešnosti bioprocasa. U konkretnom slučaju, konverzija supstrata u proizvod predstavlja količinu izvora ugljenika koja je konvertovana u ksantan. Vrednosti stepena konverzije izvora ugljenika u ksantan koje su ostvarene u medijumima sa različitim izvorima ugljenika nakon kultivacije sojeva *Xanthomonas* spp. u primenjenim eksperimentalnim uslovima prikazane su u tabeli 5.4.

Tabela 5.4. Konverzija izvora ugljenika u ksantan u medijumima za biosintezu sa različitim izvorima ugljenika po završetku kultivacije sojeva *Xanthomonas* spp.

Izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača			Izolati sa listova paprika		
Proizvodni soj	Izvor ugljenika	$K_{p/s}$ (%)	Proizvodni soj	Izvor ugljenika	$K_{p/s}$ (%)
Mn 7-2	Komercijalni glicerol	15,64±0,62	PAP LIST 2	Glukoza	25,87±1,93
Am	Glukoza	18,80±2,30	PAP LIST 3	Glukoza	26,23±1,35
12-2	Glukoza	19,09±1,93	PAP LIST 5	Glukoza	26,36±1,34
Xp 3-1	Komercijalni glicerol	20,55±1,43	PAP LIST 1	Glukoza	27,27±1,45
KELJ	Komercijalni glicerol	21,41±1,40	PAP LIST 4	Glukoza	31,20±2,12
Xp 7-2	Komercijalni glicerol	24,17±0,88	PAP LIST 1	Komercijalni glicerol	35,22±2,73
ATCC 13951	Komercijalni glicerol	30,96±1,61	PAP LIST 3	Komercijalni glicerol	37,12±1,80
Am	Komercijalni glicerol	31,23±2,70	PAP LIST 5	Komercijalni glicerol	48,63±2,78
KARFIOL	Komercijalni glicerol	31,82±1,75	PAP LIST 2	Komercijalni glicerol	49,32±2,57
12-2	Komercijalni glicerol	32,53±2,20	PAP LIST 4	Komercijalni glicerol	51,10±3,15
Xp 7-2	Glukoza	32,90±1,93			
KARFIOL	Glukoza	35,11±1,87			
Xp 3-1	Glukoza	39,25±3,05			
ATCC 13951	Glukoza	49,22±2,95			
KELJ	Glukoza	53,12±2,83			
Mn 7-2	Glukoza	54,41±2,53			
KUPUS	Komercijalni glicerol	55,05±3,03			
KUPUS	Glukoza	59,89±2,98			

$K_{p/s}$  - stepen konverzije izvora ugljenika u ksantan.

Prema dobijenim rezultatima, konverzija izvora ugljenika u željeni metabolit, u primenjenim eksperimentalnim uslovima, kretala se od 15,64±0,62% do 59,89±2,98% za izolate sa listova biljaka iz porodice kupusnjača. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa prethodno objavljenim rezultatima gde je prilikom kultivacije referentnog soja *X. campestris* ATCC 13951 i sojeva roda *Xanthomonas* izolovanih sa listova biljaka iz porodice kupusnjača na medijumima sa glukozom (20 g/l) i komercijalnim glicerolom (20 g/l) ostvarena konverzija izvora ugljenika u ksantan bila u opsegu od 14,90% do 68,70% (Bajić i sar., 2015b). Proizvodni soj KUPUS se izdvaja u ovoj grupi izolata kao soj koji konvertuje veoma dobro i glukozu i komercijalni glicerol u ksantan i to u vrednosti većoj od 50% (59,89±2,98% i 55,05±3,03%, redom). Soj Mn 7-2 se pokazao kao izolat sa listova biljaka iz porodice kupusnjača koji prilikom kultivacije na medijumu sa komercijalnim glicerolom u najmanjoj meri konvertuje izvor ugljenika u ksantan (15,64±0,62%), dok su se u istoj grupi izolata sojevi Am i 12-2 izdvojili po najmanjoj konverziji glukoze u ksantan u primenjenim eksperimentalnim uslovima (18,80±2,30% i 19,09±1,93%, redom). Sa druge strane, kultivacijom izolata sa listova paprika ostvareni stepen konverzije izvora ugljenika u ksantan, u primenjenim eksperimentalnim uslovima, kretao se od 25,87±1,93% do 51,10±3,15%. Proizvodni soj PAP LIST 4 se izdvaja u ovoj grupi izolata kao soj koji konvertuje komercijalni glicerol u ksantan u vrednosti većoj od 50% (51,10±3,15%). Takođe, može se primetiti da soj PAP LIST 2 prilikom kultivacije na medijumu sa glukozom konvertuje izvor ugljenika u ksantan u najmanjoj meri (25,87±1,93%).

Iz rezultata datih u tabeli 5.4. može se uočiti da izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača bolje konvertuju glukozu u ksantan, dok izolati sa listova paprika konvertuju komercijalni

glicerol u ksantan u većoj meri. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da vrednost stepena konverzije u velikoj meri zavisi od korišćenih sojeva *Xanthomonas* što potvrđuju i rezultati prethodnih istraživanja (Nitschke i Thomas, 1995; Bajić i sar., 2015b).

Imajući u vidu da se u industrijskim uslovima stepen konverzije izvora ugljenika u ksantan kreće u intervalu od 50-85% (Rosalam i England, 2006), jedan od ciljeva ove faze istraživanja podrazumeva selekciju sojeva koji pored proizvodnje ksantana na medijumu sa glicerolom ostvaruju i konverziju glicerola u ksantan u vrednosti većoj od 50%. Posmatrajući rezultate prikazane u tabeli 5.4. može se zaključiti da sojevi KUPUS, iz grupe izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača, i PAP LIST 4, među izolatima sa listova paprika, jedini ispunjavaju ovaj uslov. Na osnovu toga može se zaključiti da navedeni sojevi imaju najveći potencijal za primenu u biotehnoškoj proizvodnji ksantana na medijumu sa glicerolom kao jedinim izvorom ugljenika.

### 5.1.2. Uticaj selekcije proizvodnog soja i izvora ugljenika na kvalitet ksantana

Kvalitet ksantana zavisi od različitih faktora, kao što su proizvodni soj, sastav kultivacionog medijuma i uslovi izvođenja bioprocasa, a može se proceniti na osnovu nekoliko parametara. Među njima se izdvajaju viskozitet rastvora ksantana, sastav makromolekula ksantana i njegova molekulska masa (Hublik, 2012). Po završetku bioprocasa ksantan je izdvojen iz proizvodnog medijuma (poglavlje 4.5), a zatim je izvršena njegova kvalitativna karakterizacija. Kao pokazatelj kvaliteta ksantana biosintetisanog u primenjenim eksperimentalnim uslovima određivana je srednja vrednost molekulskih masa (poglavlje 4.6.3). Dvofaktorijalna analiza varijanse uticaja različitih proizvodnih sojeva i izvora ugljenika na molekulska masu ksantana izvršena je sa ciljem utvrđivanja statističke značajnosti uticaja ispitivanih faktora, kao i njihove kombinacije na kvalitet biosintetisanog ksantana. Rezultati izvedene statističke analize sumirani su u tabeli 5.5.

Tabela 5.5. Dvofaktorijalna analiza varijanse uticaja različitih proizvodnih sojeva i izvora ugljenika u medijumima za biosintezu na molekulska masu ksantana

<i>Xanthomonas</i> sojevi	Izvor varijabiliteta	SS	DF	MS	F-odnos	<i>p</i> -vrednost
<b>Izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača</b>	Proizvodni soj	$3,325 \cdot 10^{11}$	8	$4,156 \cdot 10^{10}$	105,764	< 0,000001
	Izvor ugljenika	$1,244 \cdot 10^{11}$	1	$1,244 \cdot 10^{11}$	316,596	< 0,000001
	Proizvodni soj i izvor ugljenika	$3,032 \cdot 10^{11}$	8	$3,790 \cdot 10^{10}$	96,467	< 0,000001
	Greška	$1,415 \cdot 10^{10}$	36	$3,929 \cdot 10^8$		
<b>Izolati sa listova paprika</b>	Proizvodni soj	$5,325 \cdot 10^{11}$	4	$1,331 \cdot 10^{11}$	343,330	< 0,000001
	Izvor ugljenika	$2,362 \cdot 10^{12}$	1	$2,362 \cdot 10^{12}$	6090,530	< 0,000001
	Proizvodni soj i izvor ugljenika	$4,611 \cdot 10^{11}$	4	$1,153 \cdot 10^{11}$	297,320	< 0,000001
	Greška	$7,755 \cdot 10^9$	20	$3,878 \cdot 10^8$		

*SS* – suma kvadrata; *DF* – stepen slobode; *MS* – srednja vrednost kvadrata.

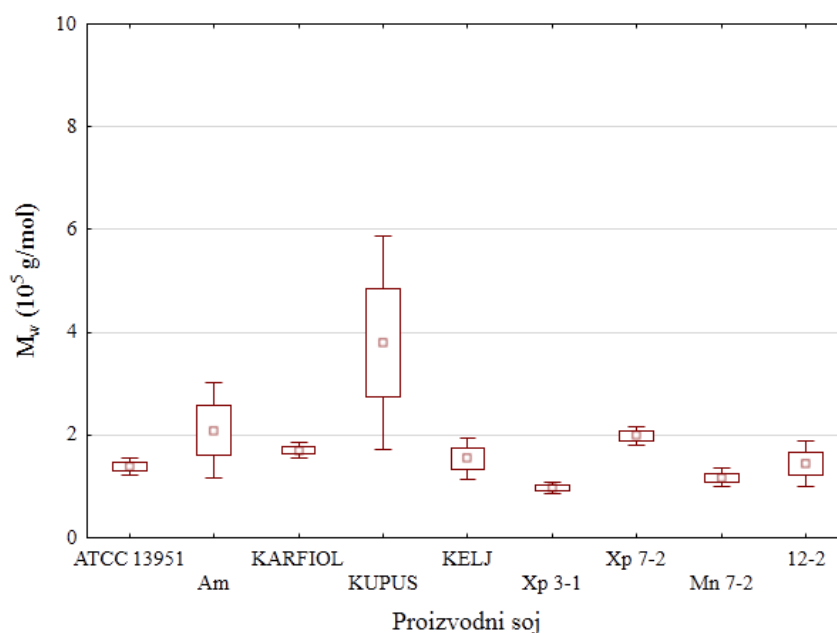
Rezultati dvofaktorijalne analize varijanse pokazali su da proizvodni soj, izvor ugljenika, kao i njihova kombinacija imaju statistički značajan uticaj na molekulska masu ksantana, što



potvrđuje  $p$ -vrednost manja od 0,05 u sva tri slučaja (tabela 5.5), i to kod obe grupe ispitivanih izolata. Ranije objavljeni rezultati naučnih istraživanja takođe potvrđuju da molekulska masa ksantana, između ostalog, zavisi i od primenjenog proizvodnog soja (García-Ochoa i sar., 2000; Moreira i sar., 2001) i sastava kultivacionog medijuma (Chaitali i sar., 2003; Psomas i sar., 2007).

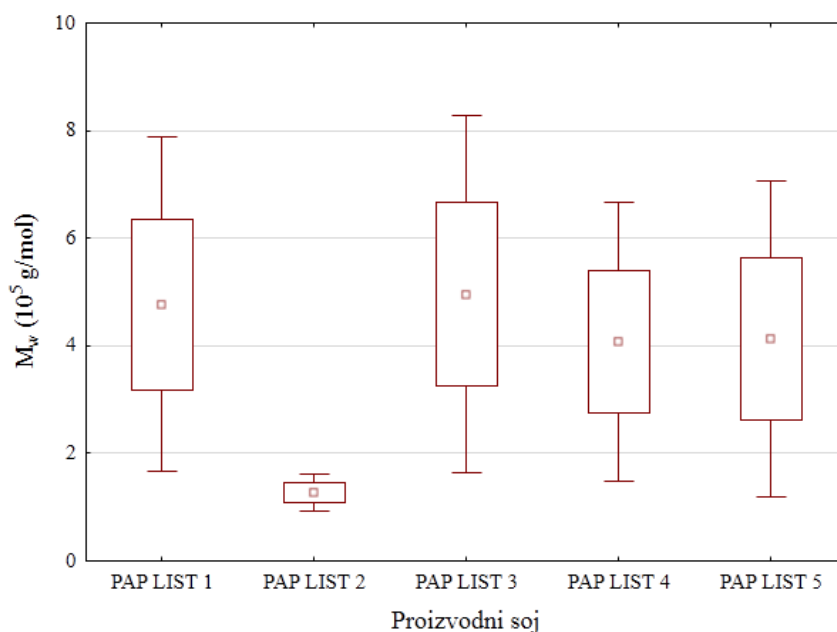
Međutim, ako se obrati pažnja na srednje vrednosti kvadrata prikazane u istoj tabeli može se zaključiti da izvor ugljenika ( $1,244 \cdot 10^{11}$  kod izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača i  $2,362 \cdot 10^{12}$  kod izolata sa listova paprika) u najvećoj meri utiče na molekulska masu ksantana produkovanog u primenjenim eksperimentalnim uslovima, dok je uticaj proizvodnog soja ( $4,156 \cdot 10^{10}$  kod izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača i  $1,331 \cdot 10^{11}$  kod izolata sa listova paprika) na molekulska masu ksantana nešto manji kod obe grupe izolata. Kombinacija proizvodnog soja i izvora ugljenika ( $3,790 \cdot 10^{10}$  kod izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača i  $1,153 \cdot 10^{11}$  kod izolata sa listova paprika) ima najmanji uticaj na molekulska masu ksantana. Pored ovoga, rezultati statističke analize prikazani su i grafički na slikama 5.5-5.8.

Na slici 5.5. prikazani su rezultati statističke analize uticaja selekcije proizvodnog soja iz grupe izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača na molekulska masu ksantana biosintetisanih na medijumima sa različitim izvorima ugljenika. Posmatrajući grafički predstavljene rezultate može se uočiti da se kao najpogodniji za proizvodnju ksantana najboljeg kvaliteta, bez obzira na izvor ugljenika, pokazao soy označen kao KUPUS, koji je u primenjenim eksperimentalnim uslovima produkovao ksantan najveće molekulske mase. Ostali izolati produkovali su ksantan lošijeg kvaliteta, odnosno, manje molekulske mase. Ksantan najlošijeg kvaliteta produkovao je soy Xp 3-1. Analizirajući rezultate prikazane na slici 5.5. može se primetiti da se vrednost molekulske mase ksantana biosintetisanih u ispitivanim eksperimentalnim uslovima kretala od oko  $1 \cdot 10^5$  g/mol do oko  $6 \cdot 10^5$  g/mol.



Slika 5.5. Uticaj selekcije proizvodnog soja na molekulska masu ksantana ( $M_w$ ) biosintetisanih na medijumima sa različitim izvorima ugljenika: izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača

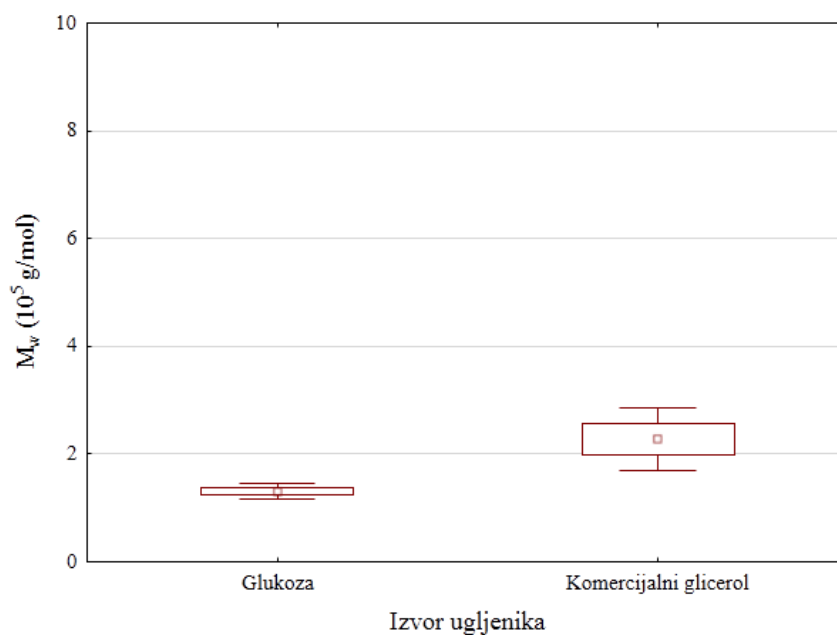
Rezultati statističke analize uticaja selekcije proizvodnog soja iz grupe izolata sa listova paprika na molekulska masu ksantana biosintetisanih na medijumima sa različitim izvorima ugljenika prikazani su na slici 5.6. Prema dobijenim rezultatima ksantan najboljeg kvaliteta biosintetisan je prilikom kultivacije soja PAP LIST 3, bez obzira na izvor ugljenika u medijumu. Biopolimer nešto lošijeg kvaliteta izdvojen je iz medijuma po završetku kultivacije sojeva PAP LIST 1, PAP LIST 4 i PAP LIST 5, dok je ksantan najlošijeg kvaliteta biosintetisao soj PAP LIST 2. Rezultati prikazani na slici 5.6. ukazuju da se srednja vrednost molekulske mase ksantana produkovanih u ispitivanim eksperimentalnim uslovima kretala od oko  $1 \cdot 10^5$  g/mol do oko  $8 \cdot 10^5$  g/mol.



Slika 5.6. Uticaj selekcije proizvodnog soja na molekulska masu ksantana ( $M_w$ ) biosintetisanih na medijumima sa različitim izvorima ugljenika: izolati sa listova paprika

Na slici 5.7. prikazani su rezultati statističke analize uticaja selekcije izvora ugljenika na molekulska masu ksantana dobijenih primenom izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača, bez obzira na primenjeni soj iz posmatrane grupe izolata. Kao što je diskutovano ranije,  $p$ -vrednost prikazana u tabeli 5.5. ukazuje na statistički značajnu razliku u vrednostima molekulske mase ksantana dobijenih prilikom kultivacije proizvodnih sojeva na različitim medijumima. Do ove razlike najverovatnije dolazi usled zavisnosti strukturnih svojstava ksantana od korišćenih izvora ugljenika u kultivacionom medijumu (Habibi i Khosravi-Darani, 2017). Rezultati dati na slici 5.7. pokazuju da postoji statistički značajna razlika u kvalitetu biopolimera kada su glukoza i komercijalni glicerol korišćeni kao izvor ugljenika u medijumu za biosintezu. Utvrđeno je da se na medijumu sa komercijalnim glicerolom biosintetiše ksantan značajno veće molekulske mase nego na medijumu sa glukozom primenom istih proizvodnih sojeva. Literaturni podaci se uglavnom zasnivaju na opisivanju uticaja izvora ugljenika na viskozitet rastvora ksantana kao pokazatelja kvaliteta, a vrlo je mali broj istraživanja fokusiranih na uticaj izvora ugljenika na molekulska masu ovog biopolimera. Na sličnu temu dostupno je samo nekoliko eksperimentalnih ispitivanja. Rezultati istraživanja sprovedenog u Kini ukazuju

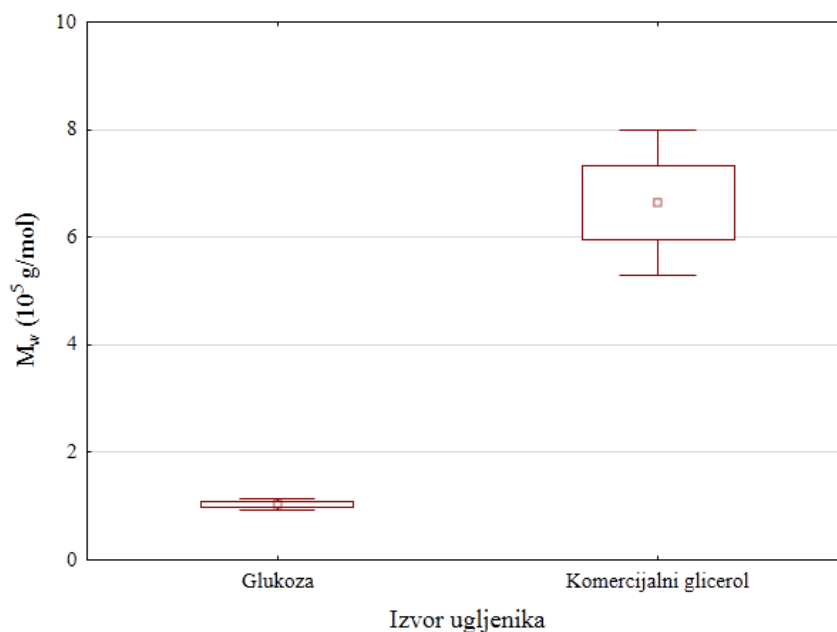
da na molekulska masu ksantana dobijenog kultivacijom soja *X. campestris* CGMCC 1.1781 u velikoj meri utiče inicijalni sadržaj ksiloze i glukoze u kultivacionom medijumu (Zhang i Chan, 2010). Nekoliko godina kasnije, u laboratorijama istraživačkog tima iz Srbije dokazano je da molekulska masa biopolimera kojeg na medijumu sa komercijalnim glicerolom produkuje referentni soj *X. campestris* ATCC 13951 u velikoj meri zavisi od početne koncentracije ovog izvora ugljenika (Rončević i sar., 2014).



Slika 5.7. Uticaj selekcije izvora ugljenika u medijumu za biosintezu na molekulska masu ksantana ( $M_w$ ): izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača

Rezultati statističke analize uticaja selekcije izvora ugljenika na molekulska masu ksantana dobijenih kultivacijom izolata sa listova paprika, bez obzira na primenjeni soj iz posmatrane grupe izolata, prikazani su na slici 5.8, a pokazuju slično ponašanje kao prethodno diskutovani rezultati kada su za biosintezu ksantana primenjeni izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača (slika 5.7). Međutim, kod ove grupe rezultata je mnogo izaženija razlika u vrednosti molekulske mase ksantana biosintetisanih na medijumima sa glukozom i komercijalnim glicerolom. Naime, i u ovom slučaju se na medijumu sa komercijalnim glicerolom produkuje ksantan značajno veće molekulske mase nego na medijumu sa glukozom primenom istih proizvodnih sojeva. Na ovaj način još jednom je potvrđeno da izvor ugljenika u kultivacionom medijumu za biosintezu značajno utiče na strukturu ksantana (Habibi i Khosravi-Darani, 2017).

Rezultati prikazani na slikama 5.7. i 5.8. sugerišu da je komercijalni glicerol pogodniji izvor ugljenika u medijumu za biosintezu što kvalitetnijeg ksantana, ako se kao pokazatelj kvaliteta ovog biopolimera posmatra srednja vrednost molekulskih masa. Dobijeni rezultati važe za obe grupe ispitivanih lokalnih izolata roda *Xanthomonas*.



Slika 5.8. Uticaj selekcije izvora ugljenika na molekulsku masu ksantana ( $M_w$ ): izolati sa listova paprika

Kako bi se odabrala kombinacija proizvodnog soja i izvora ugljenika pri kojoj se biosintetiše ksantan najboljeg kvaliteta, eksperimentalno dobijeni podaci su analizirani i primenom Dankanovog testa višestrukih poređenja čiji su rezultati dati u tabeli 5.6.

Rezultati prikazani u tabeli 5.6. pokazuju da svi testirani izolati roda *Xanthomonas* na oba ispitivana medijuma u primenjenim eksperimentalnim uslovima produkuju ksantan različitog kvaliteta, odnosno zabeležena je statistički značajna razlika u srednjim vrednostima molekulskih masa separisanih biopolimera. Vrednosti molekulske mase ksantana kretale su se u opsegu od  $0,88 \pm 0,02 \cdot 10^5$  g/mol do  $6,16 \pm 0,18 \cdot 10^5$  g/mol kada su primenjeni izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača, odnosno od  $0,77 \pm 0,03 \cdot 10^5$  g/mol do  $8,75 \pm 0,29 \cdot 10^5$  g/mol kada su primenjeni izolati sa listova paprika. Kao najpogodniji soj za proizvodnju ksantana najboljeg kvaliteta, u primenjenim eksperimentalnim uslovima, iz grupe izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača izdvojio se soj KUPUS koji je na medijumu sa komercijalnim glicerolom produkovao ksantan najveće molekulske mase, i to od  $6,16 \pm 0,18 \cdot 10^5$  g/mol, dok se kod izolata sa listova paprika istakao soj PAP LIST 3 koji je na istom medijumu produkovao ksantan molekulske mase  $8,31 \pm 0,20 \cdot 10^5$  g/mol (tabela 5.6). Proizvodni soj Xp 3-1 se izdvaja iz grupe izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača kao soj koji je na medijumu sa glukozom produkovao ksantan najlošijeg kvaliteta ( $0,88 \pm 0,02 \cdot 10^5$  g/mol). Na istom nivou značajnosti nalaze se i vrednosti molekulske ksantana biosintetisanih prilikom kultivacije sojeva 12-2, Am i KELJ na medijumu sa glukozom, kao i prilikom kultivacije sojeva Xp 3-1 i Mn 7-2 na medijumu sa komercijalnim glicerolom, što potvrđuju  $p$ -vrednosti veće od 0,05.

Kod izolata sa listova paprika sojevi PAP LIST 5, PAP LIST 2 i PAP LIST 4 su na medijumu sa glukozom produkovali ksantan najlošijeg kvaliteta. Dobijeni rezultati nalaze se na istom nivou značajnosti, što potvrđuju  $p$ -vrednosti veće od 0,05. Rezultati ostvareni u okviru ovog istraživanja pokazuju veću vrednost molekulske mase biosintetisanih ksantana u poređenju sa

rezultatima ranijih istraživanja gde je prilikom kultivacije referentnog soja *X. campestris* ATCC 13951 na medijumu sa istom koncentracijom komercijalnog glicerolom produkovan ksantan molekulske mase od  $2,86 \cdot 10^5$  g/mol (Rončević i sar., 2014).

Tabela 5.6. Dankanov test višestrukih poređenja: molekulska masa ksantana koje na medijumima sa različitim izvorima ugljenika biosintetišu sojevi *Xanthomonas* spp.

Izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača			Izolati sa listova paprika		
Proizvodni soj	Izvor ugljenika	$M_w$ ( $10^5$ g/mol)*	Proizvodni soj	Izvor ugljenika	$M_w$ ( $10^5$ g/mol)*
Xp 3-1	Glukoza	0,88±0,02 <sup>a</sup>	PAP LIST 5	Glukoza	0,77±0,03 <sup>a</sup>
12-2	Glukoza	0,97±0,04 <sup>ab</sup>	PAP LIST 2	Glukoza	0,88±0,02 <sup>ab</sup>
Am	Glukoza	1,04±0,02 <sup>ab</sup>	PAP LIST 4	Glukoza	1,12±0,18 <sup>ab</sup>
Xp 3-1	Komercijalni glicerol	1,05±0,16 <sup>ab</sup>	PAP LIST 3	Glukoza	1,17±0,19 <sup>b</sup>
Mn 7-2	Komercijalni glicerol	1,08±0,18 <sup>abc</sup>	PAP LIST 1	Glukoza	1,22±0,18 <sup>b</sup>
KELJ	Glukoza	1,13±0,09 <sup>abcd</sup>	PAP LIST 2	Komercijalni glicerol	1,65±0,16 <sup>c</sup>
Mn 7-2	Glukoza	1,26±0,24 <sup>bcd</sup>	PAP LIST 4	Komercijalni glicerol	7,03±0,32 <sup>d</sup>
ATCC 13951	Glukoza	1,31±0,19 <sup>bcd</sup>	PAP LIST 5	Komercijalni glicerol	7,48±0,19 <sup>e</sup>
KUPUS	Glukoza	1,43±0,21 <sup>cde</sup>	PAP LIST 1	Komercijalni glicerol	8,31±0,20 <sup>f</sup>
ATCC 13951	Komercijalni glicerol	1,48±0,24 <sup>de</sup>	PAP LIST 3	Komercijalni glicerol	8,75±0,29 <sup>g</sup>
KARFIOL	Glukoza	1,68±0,24 <sup>ef</sup>			
KARFIOL	Komercijalni glicerol	1,73±0,20 <sup>efg</sup>			
Xp 7-2	Komercijalni glicerol	1,9±0,16 <sup>fg</sup>			
12-2	Komercijalni glicerol	1,92±0,28 <sup>fg</sup>			
KELJ	Komercijalni glicerol	1,96±0,31 <sup>fg</sup>			
Xp 7-2	Glukoza	2,06±0,27 <sup>g</sup>			
Am	Komercijalni glicerol	3,15±0,20 <sup>h</sup>			
KUPUS	Komercijalni glicerol	6,16±0,18 <sup>i</sup>			

$M_w$ -srednja molekulska masa ksantana;

\* Vrednosti u jednoj koloni obeležene istim slovima nalaze se na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja od 95%.

Na osnovu diskutovanih grafičkih i tabelarno prikazanih rezultata može se zaključiti da odabir proizvodnog soja i izvora ugljenika u kultivacionom medijumu za biosintezu ksantana direktno diktira strukturne karakteristike, odnosno kvalitet ksantana, što se podudara sa rezultatima prethodnih istraživanja (Moreira i sar., 2001; Psomas i sar., 2007; Habibi i Khosravi-Darani, 2017). Rezultati dobijeni u ovom istraživanju ukazuju na potencijalnu zamenu glukoze, kao najčešće korišćenog izvora ugljenika, glicerolom u cilju dobijanja ksantana boljeg kvaliteta.

Analizirajući sve prethodno diskutovane rezultate (poglavljja 5.1.1. i 5.1.2) može se zaključiti da je prilikom kultivacije ispitivanih izolata roda *Xanthomonas* na medijumu sa komercijalnim

glicerolom ostvarena veoma dobra produkcija ksantana koji su, prema srednjim vrednostima molekulskih masa, boljeg kvaliteta u odnosu na ksantane koje su isti proizvodni sojevi, u primenjenim eksperimentalnim uslovima, biosintetisali na medijumu sa glukozom. Iz ovog razloga, u narednoj fazi istraživanja ispitivanja su vršena na medijumu sa komercijalnim glicerolom kao jednim izvorom ugljenika.

### 5.1.3. Uticaj selekcije proizvodnog soja i vremena kultivacije na količinu ksantana

Poznato je da pored proizvodnog soja, sastava kultivacionog medijuma i procesnih uslova, i vreme trajanja kultivacije u velikoj meri utiče na količinu ksantana i njegova svojstva (Psomas i sar., 2007). Uobičajeno vreme trajanja biosinteze ksantana je od 72 h do 120 h (Psomas i sar., 2007, Reis i sar., 2010, Bajić i sar., 2015b), a u nekim istraživanjima je proizvodnja ksantana na medijumu sa glicerolom izvedena i u trajanju od 168 h (Rončević i sar., 2014). Rezultati iz dostupne literature, gde je biosinteza ksantana vršena na medijumima sa glicerolom, pokazuju da primenjeni sojevi za vreme trajanja kultivacije od 96 h (Reis i sar., 2010) i 120 h (Bajić i sar., 2015b) nisu metabolisali svu raspoloživu količinu glicerola. Navedeno je da je konverzija glicerola iznosila oko 50% i manje, što sa stanovišta industrijske proizvodnje ksantana nije prihvatljivo (Rosalam i England, 2006). Uzimajući u obzir da različite vrste roda *Xanthomonas* poseduju različite metaboličke puteve i cikluse (Saddler i Bradbury, 2004), kao i to da je različitim sojevima potrebno različito vreme da se adaptiraju na uslove sredine u medijumu sa glicerolom (Crosse i sar., 2020), može se pretpostaviti da je do ovakvih rezultata najverovatnije došlo usled nedovoljno vremena da se primenjeni sojevi adaptiraju na glicerol i produkuju ksantan u zadovoljavajućoj količini. Stoga je u ovoj fazi istraživanja vreme trajanja kultivacije sojeva *Xanthomonas* spp. na medijumu sa komercijalnim glicerolom povećano, odnosno ispitivan je uticaj selekcije proizvodnog soja i vremena trajanja njihove kultivacije na proizvodnju ksantana. Kultivacija 14 sojeva roda *Xanthomonas* (poglavlje 4.1) izvedena je na medijumu čiji je sastav definisan u poglavlju 4.2.1, a pod uslovima opisanim u poglavlju 4.4. u trajanju od 168 h i 240 h. Mogućnost biosinteze ksantana procenjena je na osnovu rezultata reoloških merenja (poglavlje 4.6.2), a uspešnost bioprocasa procenjena je prema sadržaju biosintetisanog ksantana na osnovu čije vrednosti je izračunat i stepen konverzije izvora ugljenika u proizvod (poglavlje 4.5). Uzorci dobijenih medijuma analizirani su i u pogledu vrednosti pH i sadržaja ukupnih rastvorenih soli (poglavlje 4.6.2).

Reološke karakteristike medijuma za biosintezu sa komercijalnim glicerolom po završetku kultivacije sojeva *Xanthomonas* spp. u trajanju od 168 h i 240 h, u primenjenim eksperimentalnim uslovima, prikazane su u tabeli 5.7.

Pseudoplastične karakteristike medijuma za biosintezu sa komercijalnim glicerolom po završetku kultivacije ispitivanih proizvodnih sojeva u trajanju od 168 h i 240 h potvrđene su vrednostima indeksa toka ( $n$ ) datih u tabeli 5.7. Vrednosti indeksa toka analiziranih uzoraka kretale su se u intervalu od 0,4457 do 0,6568 i od 0,4552 do 0,5723 prilikom kultivacije izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača u trajanju od 168 h i 240 h, redom. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa prethodno publikovanim, gde su vrednosti indeksa toka proizvodnih medijuma sa komercijalnim glicerolom, dobijenih po završetku kultivacije sojeva *Xanthomonas* spp. izolovanih sa listova biljaka iz porodice kupusnjača na medijumu sa komercijalnim glicerolom,

bile u opsegu od 0,4338 do 0,5246 (Bajić i sar., 2015b). Kod izolata sa listova paprika ove vrednosti nisu bile mnogo drugačije prilikom njihove kultivacije na medijumu sa komercijalnim glicerolom u trajanju od 168 h i kretale su se u intervalu od 0,4285 do 0,5045, dok su se prilikom kultivacije u trajanju od 240 h vrednosti ovog reološkog parametra kretale od 0,3849 do 0,5908. Vrednosti faktora konzistencije medijuma dobijenog po završetku kultivacije sojeva *Xanthomonas* izolovanih sa listova biljaka iz porodice kupusnjača na medijumu sa komercijalnim glicerolom u trajanju od 168 h i 240 h bile su u opsegu od 0,0560 Pa·s<sup>n</sup> do 0,4093 Pa·s<sup>n</sup> i od 0,0717 Pa·s<sup>n</sup> do 0,4887 Pa·s<sup>n</sup>, redom (tabela 5.7). Sa druge strane, vrednosti faktora konzistencije medijuma dobijenog po završetku kultivacije sojeva *Xanthomonas* izolovanih sa listova paprika na medijumu sa komercijalnim glicerolom u trajanju od 168 h i 240 h bile su u opsegu od 0,2408 Pa·s<sup>n</sup> do 0,4637 Pa·s<sup>n</sup> i od 0,1975 Pa·s<sup>n</sup> do 0,9412 Pa·s<sup>n</sup>, redom (tabela 5.7). Različite vrednosti faktora konzistencije prikazane u tabeli 5.7. ukazuju na razliku u količini i kvalitetu ksantana dobijenog u primenjenim eksperimentalnim uslovima prilikom kultivacije ispitivanih sojeva roda *Xanthomonas* na medijumu sa komercijalnim glicerolom u trajanju od 168 h i 240 h. Na osnovu vrednosti indeksa toka i faktora konzistencije izračunati su prividni viskoziteti medijuma sa komercijalnim glicerolom dobijenih po završetku kultivacije ispitivanih sojeva roda *Xanthomonas* u trajanju od 168 h i 240 h.

Tabela 5.7. Reološke karakteristike medijuma za biosintezu sa komercijalnim glicerolom po završetku kultivacije sojeva *Xanthomonas* spp. u trajanju od 168 h i 240 h

<i>Xanthomonas</i> sojevi	Kultivacija u trajanju od 168 h			Kultivacija u trajanju od 240 h			
	K (Pa·s <sup>n</sup> )	n (1)	η <sub>a</sub> (mPa·s)	K (Pa·s <sup>n</sup> )	n (1)	η <sub>a</sub> (mPa·s)	
ATCC13951	0,4093	0,4457	31,85±0,15	0,4479	0,5054	48,82±3,97	
Am	0,0560	0,6512	7,46±3,03	0,0974	0,5487	11,13±2,61	
KARFIOL	0,0573	0,6568	8,19±3,07	0,0953	0,5723	12,04±2,70	
<b>Izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača</b>	KUPUS	0,2398	0,5233	24,94±4,67	0,4887	0,5017	49,11±0,50
	KELJ	0,0627	0,6047	6,73±3,62	0,1125	0,4919	10,10±3,28
	Xp 3-1	0,0645	0,4702	4,23±3,38	0,0717	0,4556	5,78±3,50
	Xp 7-2	0,0560	0,5570	4,97±2,14	0,0995	0,4552	7,32±1,87
	Mn 7-2	0,0817	0,5430	6,24±3,42	0,1143	0,4563	8,89±2,52
	12-2	0,0628	0,6378	7,71±3,84	0,0969	0,5345	10,00±2,47
<b>Izolati sa listova paprika</b>	PAP LIST 1	0,4391	0,4285	31,38±3,10	0,5457	0,4702	47,46±3,28
	PAP LIST 2	0,2408	0,5045	24,29±2,34	0,1975	0,5908	29,06±2,74
	PAP LIST 3	0,4474	0,4358	32,89±4,38	0,4544	0,4893	42,19±0,75
	PAP LIST 4	0,4637	0,4354	34,43±1,25	0,9412	0,3849	55,39±0,29
	PAP LIST 5	0,4119	0,4586	30,50±7,48	0,4711	0,4847	43,51±4,61

K – faktor konzistencije; n – indeks toka; η<sub>a</sub> – prividni viskozitet.

Rezultati prikazani u tabeli 5.7. ukazuju na to da su se vrednosti prividnog viskoziteta proizvodnih medijuma sa komercijalnim glicerolom nakon kultivacije izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača u trajanju od 168 h kretale od 4,23±3,38 mPa·s do 31,85±0,15 mPa·s, dok su se vrednosti prividnog viskoziteta istog medijuma nakon biosinteze ksantana primenom navedenih izolata u trajanju od 240 h kretale od 5,78±3,50 mPa·s do 49,11±0,50 mPa·s. Evidentno je da su prilikom kultivacije referentnog soja i soja KUPUS u trajanju od 240 h ostvarene najveće vrednosti prividnog viskoziteta, a koje iznose 48,82±3,97 mPa·s i 49,11±0,50 mPa·s, redom. Za medijume dobijene kultivacijom ostalih sojeva iz ove grupe

izolata u trajanju od 168 h i 240 h zabeležene su dosta niže vrednosti prividnog viskoziteta od prethodno pomenutih. Dobijeni rezultati sugerišu da se prilikom kultivacije izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača na medijumu sa komercijalnim glicerolom u trajanju od 240 h dobija kultivaciona tečnost većeg viskoziteta u poređenju sa kultivacijom istih sojeva u trajanju od 168 h. Pozivajući se na rezultate istraživanja Zhong-a i saradnika iz 2013. godine, gde je utvrđeno da prilikom porasta koncentracije ksantana u rastvoru dolazi do porasta viskoziteta tog rastvora, može se pretpostaviti da se prilikom kultivacije izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača na medijumu sa komercijalnim glicerolom u trajanju od 240 h dobija veća količina ksantana u poređenju sa kultivacijom istih sojeva na istom medijumu u trajanju od 168 h. Ipak, za izvođenje konačnih zaključaka neophodno je pored sadržaja ksantana odrediti i njegov kvalitet.

Vrednosti prividnog viskoziteta medijuma za biosintezu sa komercijalnim glicerolom nakon kultivacije izolata sa listova paprika u trajanju od 168 h kretale su se u opsegu od  $24,29 \pm 2,34$  mPa·s do  $34,43 \pm 1,25$  mPa·s, dok su se vrednosti prividnog viskoziteta medijuma za biosintezu sa komercijalnim glicerolom po završetku kultivacije istih izolata u trajanju od 240 h kretale od  $29,06 \pm 2,74$  mPa·s do  $55,39 \pm 0,29$  mPa·s. Dobijeni rezultati sugerišu da je veći viskozitet proizvodnih medijuma dobijen nakon kultivacije ove grupe izolata roda *Xanthomonas* u trajanju od 240 h. Iz prethodno navedenog se može zaključiti da se i prilikom kultivacije izolata sa listova paprika na medijumu sa komercijalnim glicerolom u trajanju od 240 h produkuje ksantan u većoj količini nego prilikom kultivacije istih izolata na istom medijumu u trajanju od 168 h. Međutim, za izvođenje konačnih zaključaka trebalo bi pored određivanja sadržaja biosintetisanog ksantana odrediti i njegov kvalitet.

Po završetku biosinteze ksantana, u okviru ovog istraživanja, vršeno je merenje vrednosti pH proizvodnih medijuma, a dobijene vrednosti date su u tabeli 8.5. (Prilog 1). Izmerene vrednosti pH medijuma za biosintezu sa komercijalnim glicerolom nakon biosinteze ksantana u trajanju od 168 h kretale su se od  $5,11 \pm 0,04$  do  $7,52 \pm 0,04$  kada su primenjeni izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača, odnosno od  $6,62 \pm 0,04$  do  $6,94 \pm 0,03$  kada su korišćeni izolati sa listova paprika. Vrednosti pH medijuma za biosintezu sa komercijalnim glicerolom nakon biosinteze ksantana u trajanju od 240 h kretale su se od  $5,08 \pm 0,02$  do  $7,46 \pm 0,05$  kada su primenjeni izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača, i od  $6,28 \pm 0,04$  do  $6,48 \pm 0,04$  kada su korišćeni izolati sa listova paprika, što se može videti iz tabele 8.5. (Prilog 1). Prilikom kultivacije manjeg broja ispitivanih izolata dolazi do blagog porasta vrednosti pH medijuma, što je u saglasnosti sa rezultatima ranijih istraživanja gde je takođe zabeležen rast vrednosti pH medijuma nakon biosinteze ksantana u primenjenim eksperimentalnim uslovima (Psomas i sar., 2007). Razlike u vrednostima pH medijuma po završetku biosinteze ksantana, i u ovom slučaju, najverovatnije su uzrokovane razlikama u fiziološkim karakteristikama među primenjenim proizvodnim sojevima (Nitschke i Thomas, 1995).

Po završetku biosinteze ksantana u okviru ovog istraživanja izvršeno je i merenje sadržaja TDS u proizvodnim medijumima, a dobijene vrednosti date su u tabeli 8.6. (Prilog 1). Izmerene vrednosti sadržaja TDS u medijumu za biosintezu sa komercijalnim glicerolom nakon biosinteze ksantana u trajanju od 168 h kretale su se od 2,61 g/l do 2,80 g/l kada su korišćeni izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača, i od 2,67 g/l do 2,77 g/l kada su primenjeni izolati sa listova paprika. Sa druge strane, po završetku kultivacije izolata sa listova biljaka iz porodice



kupusnjača na proizvodnom medijumu sa komercijalnim glicerolom u trajanju od 240 h izmerene vrednosti sadržaja TDS kretale su se od 2,79 g/l do 3,15 g/l, dok su primenom izolata sa listova paprika u medijumima detektovane vrednosti sadržaja TDS od 2,68 g/l do 2,75 g/l. Dobijeni rezultati sugerišu da nema značajne razlike u vrednostima sadržaja TDS u proizvodnim medijumima sa komercijalnim glicerolom prilikom kultivacije navedene dve grupe izolata roda *Xanthomonas* u trajanju od 168 h i 240 h, što ukazuje na to da se u sadržaj TDS u medijumima dobijenim u primenjenim eksperimentalnim uslovima nalazio u granicama potrebnim za nesmetanu metaboličku aktivnost proizvodnog mikroorganizma.

Dvofaktorijalna analiza varijanse uticaja različitih proizvodnih sojeva i vremena trajanja kultivacije na sadržaj biosintetisanog ksantana izvršena je sa ciljem utvrđivanja statističke značajnosti uticaja ispitivanih faktora, kao i njihove kombinacije na količinu produkovanog ksantana. Rezultati ove statističke analize sumarno su prikazani u tabeli 5.8.

Tabela 5.8. Dvofaktorijalna analiza varijanse uticaja različitih proizvodnih sojeva i vremena trajanja kultivacije na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa komercijalnim glicerolom

<i>Xanthomonas</i> sojevi	Izvor varijabiliteta	SS	DF	MS	F-odnos	<i>p</i> -vrednost
<b>Izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača</b>	Proizvodni soj	222,491	8	27,811	129,98	< 0,000001
	Vreme kultivacije	35,785	1	35,785	167,24	< 0,000001
	Proizvodni soj i vreme kultivacije	26,645	8	3,331	15,57	< 0,000001
	Greška	7,703	36	0,214		
<b>Izolati sa listova paprika</b>	Proizvodni soj	49,262	4	12,315	40,102	< 0,000001
	Vreme kultivacije	0,643	1	0,643	2,094	0,163398
	Proizvodni soj i vreme kultivacije	0,160	4	0,040	0,130	0,969717
	Greška	6,142	20	0,307		

*SS* – suma kvadrata; *DF* – stepen slobode; *MS* – srednja vrednost kvadrata.

Rezultati dvofaktorijalne analize varijanse za izolate sa listova biljaka iz porodice kupusnjača pokazali su da proizvodni soj, vreme kultivacije, kao i njihova kombinacija imaju statistički značajan uticaj na sadržaj produkovanog ksantana, što potvrđuju *p*-vrednosti manje od 0,05 u sva tri slučaja (tabela 5.8). Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima ranijih istraživanja koji sugerišu da proizvodni soj, sastav kultivacionog medijuma i vreme kultivacije značajno utiču na prinos ksantana, ali i na njegov kvalitet (Moreira i sar., 2001; Kurbanoglu i Kurbanoglu, 2007; Moosavi-Nasab i sar., 2010; Miranda i sar., 2020). Posmatrajući srednje vrednosti kvadrata može se primetiti da vreme kultivacije (35,785) ima najveći uticaj na sadržaj biosintetisanog ksantana. Uticaj proizvodnog soja (27,811) je nešto manji, dok kombinacija proizvodnog soja i vremena kultivacije (3,331) ima najmanji uticaj na količinu ksantana produkovanog u primenjenim eksperimentalnim uslovima.

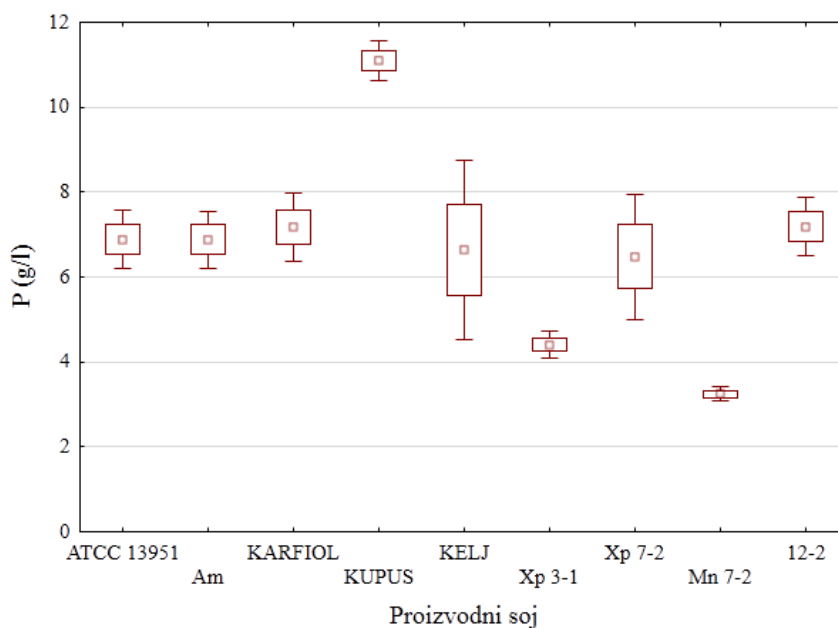
Sa druge strane, *p*-vrednosti za analizirane parametre i njihove interakcije dobijene prilikom kultivacije izolata sa listova paprika na medijumu sa komercijalnim glicerolom u trajanju od 168 h i 240 h pokazuju drugačije ponašanje u poređenju sa prethodnom grupom izolata. Iz tabele 5.8. može se uočiti da jedino odabir proizvodnog soja ima statistički značajan uticaj na sadržaj

biosintetisanog ksantana ( $p < 0,05$ ), dok vreme kultivacije i kombinacija proizvodnog soja i vremena kultivacije nemaju značajan uticaj na sadržaj ksantana u medijumu, što potvrđuju  $p$ -vrednosti 0,163398 i 0,969717, redom). Uzimajući u obzir prethodno navedeno, može se konstatovati da sojevi roda *Xanthomonas*, izolovani sa listova paprika, u velikoj meri utiču na proizvodnju ksantana u primenjenim eksperimentalnim uslovima, što se podudara sa prethodno objavljenom publikacijom gde je ustanovljeno da izolati sa listova paprika značajno utiču na sadržaj biosintetisanog ksantana u medijumu (Rončević i sar., 2019).

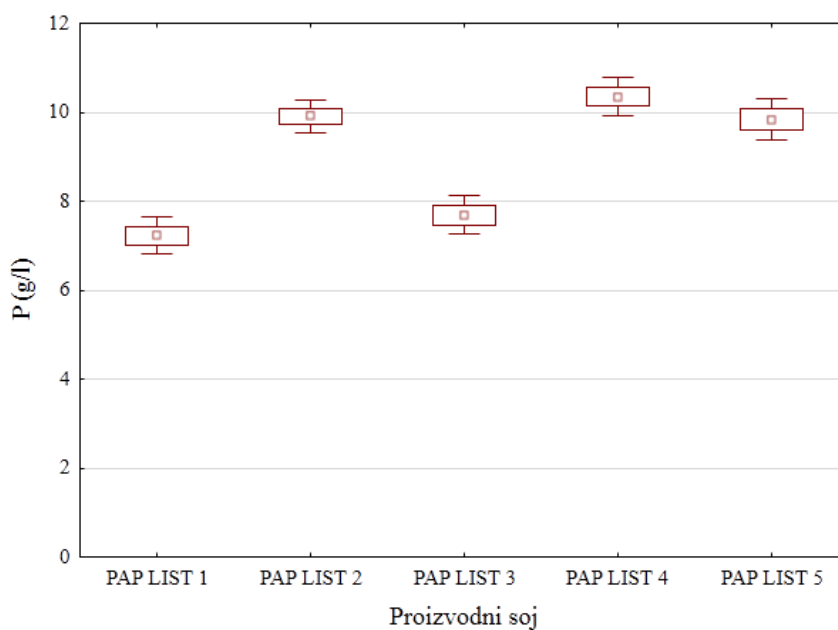
Rezultati statističke analize prikazani su i grafički na slikama 5.9-5.12, a kako bi se odabrala kombinacija proizvodnog soja i vremena kultivacije pri kojoj se ostvaruje najveća produkcija ksantana eksperimentalni podaci su analizirani i primenom Dankanovog testa višestrukih poređenja čiji su rezultati dati u tabeli 5.7.

Na slici 5.9. prikazani su rezultati statističke analize uticaja selekcije proizvodnog soja na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa komercijalnim glicerolom za različito vreme trajanja kultivacije izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača. Grafički predstavljeni rezultati ukazuju na to da postoji značajna razlika u sadržaju biosintetisanog ksantana kada su primenjeni različiti sojevi iz navedene grupe izolata roda *Xanthomonas*, a bez obzira na dužinu trajanja kultivacije. Prema rezultatima prikazanim na slici 5.9, kao najproduktivniji pokazao se soj KUPUS koji je biosintetisao ksantan u najvećoj koncentraciji u primenjenim eksperimentalnim uslovima. Takođe, evidentno je da ne postoji statistički značajna razlika u količini produkovanog ksantana kada se primenjuju sojevi ATCC 13951, Am, KARFIOL, KELJ, Xp 7-2 i 12-2. Kao najmanje produktivan soj pokazao se Mn 7-2, a za njim i Xp 3-1. Oba proizvodna soja su u primenjenim eksperimentalnim uslovima biosintetisala ksantan u minimalnoj koncentraciji. Sadržaj ksantana, koji je produkovan primenom sojeva roda *Xanthomonas* izolovanih sa listova biljaka iz porodice kupusnjača na medijumu sa komercijalnim glicerolom za različito vreme trajanja kultivacije, kretao se od oko 3 g/l do oko 12 g/l.

Rezultati statističke analize uticaja selekcije proizvodnog soja na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa komercijalnim glicerolom za različito vreme trajanja kultivacije izolata sa listova paprika dati su na slici 5.10. Posmatrajući ovako predstavljene rezultate može se primetiti da prilikom kultivacije različitih proizvodnih sojeva *Xanthomonas* izolovanih sa paprika na medijumu sa komercijalnim glicerolom, ne uzimajući u obzir vreme kultivacije, dolazi do produkcije ksantana u različitim koncentracijama. Dobijeni rezultati sugerišu da je soj PAP LIST 4 produkovao ksantan u najvećoj koncentraciji. Međutim, kao što se može videti iz grafički prikazanih rezultata, ne postoji statistički značajna razlika u pogledu sadržaja ksantana u proizvodnom medijumu kada se kultiviše soj PAP LIST 4 i kada su u tu svrhu primenjeni sojevi PAP LIST 2 i PAP LIST 5. Prema rezultatima prikazanim na istoj slici, evidentno je da je najniža koncentracija ksantana u medijumu za biosintezupostignuta upotrebom sojeva PAP LIST 1 i PAP LIST 3, te da ne postoji statistički značajna razlika između te dve grupe podataka. Sa slike 5.10. se takođe može primetiti da se sadržaj ksantana, produkovan primenom sojeva roda *Xanthomonas* izolovanih sa listova paprika na medijumu sa komercijalnim glicerolom za različito vreme trajanja kultivacije, kretao od oko 7 g/l do oko 11 g/l.



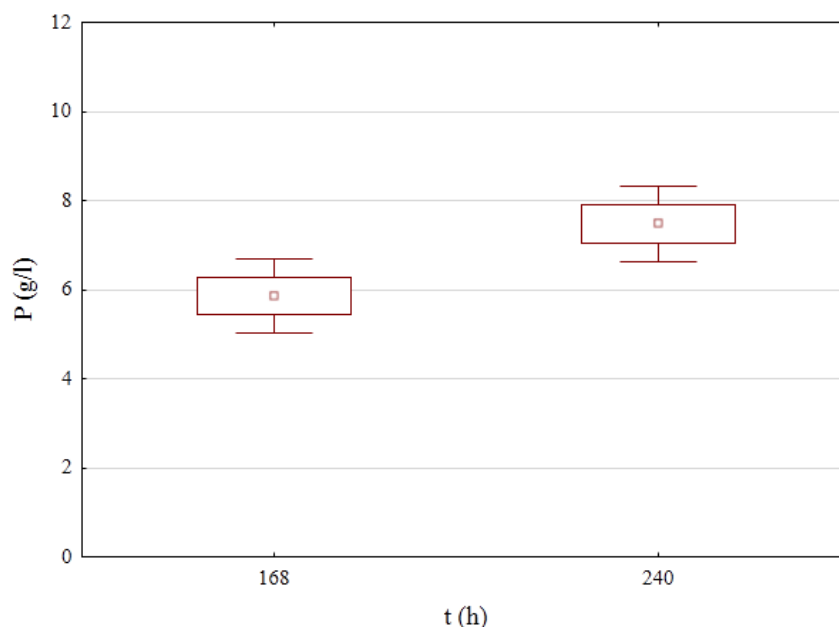
Slika 5.9. Uticaj selekcije proizvodnog soja na sadržaj ksantana (P) u medijumu za biosintezu sa komercijalnim glicerolom za različito vreme trajanja kultivacije: izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača



Slika 5.10. Uticaj selekcije proizvodnog soja na sadržaj ksantana (P) u medijumu za biosintezu sa komercijalnim glicerolom za različito vreme trajanja kultivacije: izolati sa listova paprika

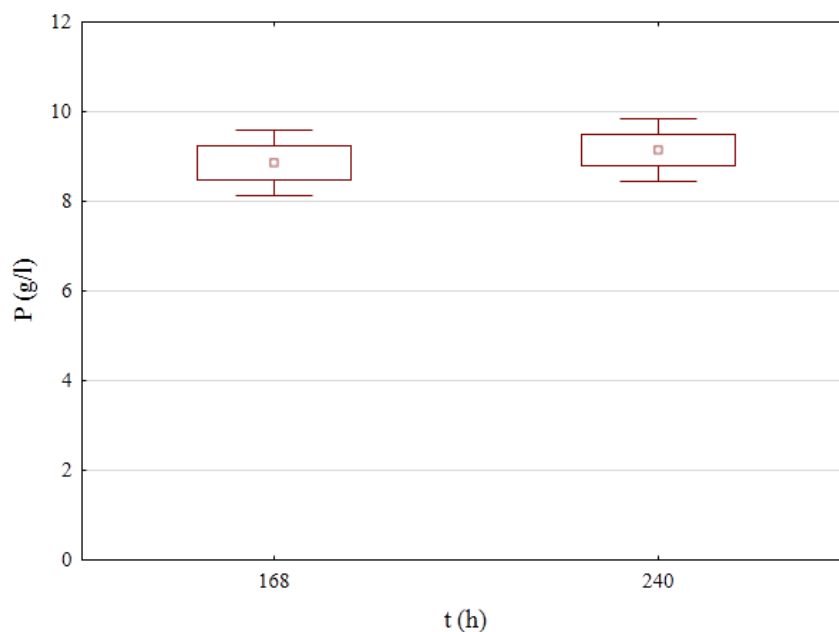
Slika 5.11. ilustruje rezultate statističke analize uticaja selekcije vremena trajanja kultivacije izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa komercijalnim glicerolom, bez obzira na primenjeni soj iz posmatrane grupe izolata. Dobijeni rezultati ukazuju da postoji značajna razlika u produkciji ksantana prilikom kultivacije izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača u trajanju od 168 h i 240 h. Evidentno je da ispitivani

proizvodni sojevi produkuju više ksantana ako se kultivišu u dužem vremenskom periodu. Do razlike u koncentraciji ksantana najverovatnije je došlo jer je proizvodnim mikroorganizmima potrebno određeno vreme da se adaptiraju na glicerol kao jedini izvor ugljenika u medijumu (Crosse i sar., 2020). Sadržaj ksantana, koje su sojevi roda *Xanthomonas* izolovani sa listova biljaka iz porodice kupusnjača biosintetisali na proizvodnom medijumu sa komercijalnim glicerolom za različito vreme trajanja kultivacije, kretao se od oko 5 g/l do oko 9 g/l.



Slika 5.11. Uticaj vremena trajanja kultivacije na sadržaj ksantana (P) u medijumu za biosintezu sa komercijalnim glicerolom: izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača

Na slici 5.12. prikazani su rezultati statističke analize uticaja vremena trajanja kultivacije izolata sa listova paprika na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa komercijalnim glicerolom, bez obzira na primenjeni soj iz posmatrane grupe izolata. Dobijeni rezultati sugerišu na to da se količine ksantana u proizvodnim medijumima sa komercijalnim glicerolom koje su produkovane za različito vreme kultivacije ne razlikuju značajno, odnosno može se primetiti da sadržaj ksantana koji je određen nakon 240 h nije značajno veći od sadržaja ksantana koji je detektovan nakon 168 h kultivacije ispitivanih sojeva. Koncentracija ksantana u medijumu za biosintezu sa komercijalnim glicerolom po završetku kultivacije sojeva roda *Xanthomonas* izolovanih sa listova paprika u trajanju od 168 h i 240 h kretala se od oko 8 g/l do oko 10 g/l. Upoređujući ove rezultate sa prethodno diskutovanim (slika 5.11) može se pretpostaviti da se lokalni izolati sa listova paprika adaptiraju na glicerol za kraće vreme.



Slika 5.12. Uticaj vremena trajanja kultivacije na sadržaj ksantana (P) u medijumu za biosintezu sa komercijalnim glicerolom: izolati sa listova paprika

U tabeli 5.9. su predstavljeni rezultati Dankanovog testa višestrukih poređenja za sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa komercijalnim glicerolom po završetku kultivacije ispitivanih sojeva roda *Xanthomonas* u trajanju od 168 h i 240 h.

Rezultati prikazani u tabeli 5.9. ukazuju da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji ksantana u proizvodnom medijumu sa komercijalnim glicerolom po završetku kultivacije ispitivanih izolata roda *Xanthomonas* u trajanju od 168 h i 240 h. Sadržaj biosintetisanog ksantana kretao se od  $3,13 \pm 0,12$  g/l do  $11,98 \pm 0,60$  g/l kada su, u primenjenim eksperimentalnim uslovima, kultivisani izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača. Dobijeni rezultati pokazuju veliku uspešnost u poređenju sa rezultatima prethodnih istraživanja gde je prilikom kultivacije izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača na medijumima sa 20 g/l glicerola u trajanju od 120 h ostvaren sadržaj ksantana od 1,68 g/l do 7,44 g/l (Bajić i sar., 2015b). Analizom rezultata prikazanih u tabeli 5.9. može se uočiti da je soj KUPUS pokazao najbolju produktivnost iz grupe izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača u ovoj fazi istraživanja jer je prilikom kultivacije na medijumu sa komercijalnim glicerolom u trajanju od 240 h produkovao ksantan u najvećoj koncentraciji, koja je iznosila  $11,18 \pm 0,60$  g/l. Proizvodni soj KUPUS je, za razliku od većine ostalih izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača, veoma dobru produktivnost ostvario i prilikom kultivacije na medijumu sa komercijalnim glicerolom u trajanju od 168 h, kada je produkovao ksantan u koncentraciji od  $11,01 \pm 0,61$  g/l. Između ovih vrednosti ne postoji statistički značajna razlika, što potvrđuje  $p$ -vrednost od 0,660510. Posmatrajući rezultate prikazane u tabeli 5.9. može se primetiti da je ostalim sojevima iz grupe izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača potrebno više vremena za proizvodnju većeg sadržaja ksantana. Najmanji sadržaj ksantana ostvaren je prilikom kultivacije soja Mn 7-2 na medijumu sa komercijalnim glicerolom u trajanju od 168 h. Prema istim rezultatima, ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji ksantana u proizvodnom medijumu dobijenom prilikom kultivacije soja Mn 7-2 tokom 168 h i 240 h, što potvrđuje  $p$ -vrednost od 0,546502.

Tabela 5.9. Dankanov test višestrukih poređenja: sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa komercijalnim glicerolom po završetku kultivacije sojeva *Xanthomonas* spp. u trajanju od 168 h i 240 h

Izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača			Izolati sa listova paprika		
Proizvodni soj	t (h)	P (g/l)	Proizvodni soj	t (h)	P (g/l)
Mn 7-2	168	3,13±0,12 <sup>a</sup>	PAP LIST 1	168	7,04±0,55 <sup>a</sup>
Mn 7-2	240	3,36±0,23 <sup>ab</sup>	PAP LIST 1	240	7,41±0,51 <sup>a</sup>
Xp 3-1	168	4,11±0,29 <sup>bc</sup>	PAP LIST 3	168	7,42±0,36 <sup>a</sup>
KELJ	168	4,28±0,28 <sup>c</sup>	PAP LIST 3	240	7,95±0,64 <sup>a</sup>
Xp 3-1	240	4,71±0,24 <sup>c</sup>	PAP LIST 5	168	9,73±0,56 <sup>b</sup>
Xp 7-2	168	4,83±0,18 <sup>c</sup>	PAP LIST 2	168	9,86±0,51 <sup>b</sup>
ATCC 13951	168	6,19±0,32 <sup>d</sup>	PAP LIST 5	240	9,94±0,71 <sup>b</sup>
Am	168	6,25±0,54 <sup>d</sup>	PAP LIST 2	240	9,96±0,49 <sup>b</sup>
KARFIOL	168	6,36±0,35 <sup>d</sup>	PAP LIST 4	168	10,22±0,63 <sup>b</sup>
12-2	168	6,51±0,44 <sup>d</sup>	PAP LIST 4	240	10,48±0,51 <sup>b</sup>
Am	240	7,53±0,49 <sup>e</sup>			
ATCC 13951	240	7,58±0,48 <sup>e</sup>			
12-2	240	7,87±0,43 <sup>e</sup>			
KARFIOL	240	7,97±0,64 <sup>e</sup>			
Xp 7-2	240	8,11±0,65 <sup>e</sup>			
KELJ	240	9,02±0,72 <sup>f</sup>			
KUPUS	168	11,01±0,61 <sup>g</sup>			
KUPUS	240	11,18±0,60 <sup>g</sup>			

*P*-sadržaj biosintetisanog ksantana; *t*-vreme trajanja bioprocesa;

\* Vrednosti u jednoj koloni obeležene istim slovima nalaze se na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja od 95%.

Prilikom kultivacije izolata sa listova paprika na medijumu za biosintezu sa komercijalnim glicerolom, u primenjenim eksperimentalnim uslovima, a u trajanju od 168 h i 240 h, sadržaj biosintetisanog ksantana kretao se od 7,04±0,55 g/l do 10,22±0,63 g/l (tabela 5.9). Prema rezultatima prikazanim u tabeli 5.9. evidentno je da je soj PAP LIST 4 pokazao najbolju produktivnost iz grupe izolata sa listova paprika u ovom istraživanju jer je prilikom kultivacije na medijumu sa komercijalnim glicerolom u trajanju od 240 h proizveo ksantan u najvećoj koncentraciji. Međutim, ova količina ksantana ne razlikuje se značajno od količine ksantana koju je isti soj proizveo tokom kultivacije u trajanju od 168 h, ali ni od količine ksantana koju su sojevi PAP LIST 2 i PAP LIST 5 proizveo za 240 h i 168 h, redom, što potvrđuju *p*-vrednosti veće od 0,05. Rezultati prikazani u tabeli 5.9. ukazuju na to da je najmanji sadržaj ksantana postignut prilikom kultivacije sojeva PAP LIST 1 i PAP LIST 3. Dobijeni rezultati pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika između vrednosti sadržaja ksantana proizvedenog kada je kultivacija sojeva PAP LIST 1 i PAP LIST 3 vršena u trajanju od 168 h i 240 h, što potvrđuju *p*-vrednosti veće od 0,05. Uzimajući u obzir prethodno diskutovane rezultate može se zaključiti da se kao najpogodniji soj za proizvodnju ksantana primenom izolata sa listova paprika ističe soj PAP LIST 4 koji u ispitivanim eksperimentalnim uslovima proizvodi ksantan u najvećoj koncentraciji bez obzira na vreme trajanja kultivacije. Posmatrajući dobijene rezultate može se konstatovati da prilikom kultivacije sojeva PAP LIST 2, PAP LIST 4 i PAP LIST 5 na medijumu sa komercijalnim glicerolom u primenjenim eksperimentalnim uslovima, povećanjem vremena

kultivacije sa 168 h na 240 h ne dolazi do značajnog povećanja sadržaja biosintetisanog ksantana. Rezultati dobijeni u ovoj fazi istraživanja su u saglasnosti sa rezultatima ranijih istraživanja gde je prilikom kultivacije referentnog soja *X. campestris* ATCC 13951 u trajanju od 168 h na medijumu sa različitim koncentracijama komercijalnog glicerola (15-45 g/l) biosintetisan ksantan u koncentraciji od 7,98-12,94 g/l (Rončević i sar., 2020a). U poređenju sa prethodno razmatranom grupom izolata roda *Xanthomonas*, može se primetiti da sojevi izolovani sa listova paprika proizvode ksantan u velikoj koncentraciji za kraće vreme kultivacije (168 h).

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 5.9. može se zaključiti da je različitim izolatima potreban različit vremenski period za biosintezu veće količine ksantana. Razlika u produktivnosti izolata roda *Xanthomonas* korišćenih u ovom istraživanju verovatno je posledica činjenice da različite vrste roda *Xanthomonas* poseduju različite metaboličke puteve i cikluse (Saddler i Bradbury, 2004) i da je različitim sojevima potrebno različito vremena da se adaptiraju na medijum sa glicerolom (Crosse i sar., 2020).

Kao što je već navedeno, konverzija izvora ugljenika u proizvod predstavlja značajan pokazatelj uspešnosti bioprocasa. Shodno tome, vrednosti konverzije izvora ugljenika u ksantan u medijumu sa komercijalnim glicerolom po završetku kultivacije sojeva *Xanthomonas* spp. u trajanju od 168 h i 240 h prikazane su u tabeli 5.10.

Tabela 5.10. Konverzija izvora ugljenika u ksantan u medijumu za biosintezu sa komercijalnim glicerolom po završetku kultivacije sojeva *Xanthomonas* spp. u trajanju od 168 h i 240 h

Izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača			Izolati sa listova paprika		
Proizvodni soj	t (h)	K <sub>P/S</sub> (%)	Proizvodni soj	t (h)	K <sub>P/S</sub> (%)
Mn 7-2	168	15,64±0,62	PAP LIST 1	168	32,92±2,25
Mn 7-2	240	16,79±1,16	PAP LIST 1	240	35,22±1,73
Xp 3-1	168	20,55±1,43	PAP LIST 3	168	36,92±1,11
KELJ	168	21,41±1,40	PAP LIST 3	240	37,07±1,05
Xp 3-1	240	23,54±1,19	PAP LIST 5	168	39,50±2,33
Xp 7-2	168	24,17±0,88	PAP LIST 2	168	39,74±1,49
ATCC 13951	168	30,86±0,77	PAP LIST 5	240	41,78±1,32
Am	168	31,23±2,70	PAP LIST 2	240	48,49±0,76
KARFIOL	168	31,82±1,75	PAP LIST 4	168	48,80±0,54
12-2	168	32,37±1,46	PAP LIST 4	240	51,11±2,15
Am	240	37,73±1,18			
ATCC 13951	240	37,76±1,11			
12-2	240	39,18±0,92			
KARFIOL	240	39,70±1,43			
Xp 7-2	240	40,39±1,47			
KELJ	240	45,42±1,10			
KUPUS	168	53,73±1,04			
KUPUS	240	55,06±1,01			

K<sub>P/S</sub>-stepen konverzije izvora ugljenika u ksantan; t-vreme trajanja bioprocasa.

Rezultati dati u tabeli 5.10. ukazuju na to da se stepen konverzije inicijalnog sadržaja komercijalnog glicerola u ksantan u medijumu za biosintezu, u primenjenim eksperimentalnim uslovima, kretao od  $15,64 \pm 0,62\%$  do  $55,06 \pm 1,01\%$  za izolate sa listova biljaka iz porodice kupusnjača. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa prethodno objavljenim rezultatima gde se, prilikom kultivacije referentnog soja *X. campestris* ATCC 13951 i sojeva roda *Xanthomonas* izolovanih sa listova biljaka iz porodice kupusnjača na medijumima sa komercijalnim glicerolom (20 g/l), ostvarena konverzija glicerola u ksantan u medijumu za biosintezu kretala u opsegu od 14,90% do 68,70% (Bajić i sar., 2015b). Proizvodni soj KUPUS se izdvaja u ovoj grupi izolata kao soj koji veoma dobro konvertuje komercijalni glicerol u ksantan, i to u vrednosti većoj od 50% za oba ispitivana vremena trajanja kultivacije. Dakle, posmatrajući rezultate prikazane u tabeli 5.10. može se zaključiti da soj KUPUS za kraće vreme konvertuje neznatno manju količinu glicerola u ksantan. U istoj grupi izolata soj Mn 7-2 izdvaja se po najmanjoj konverziji glicerola u ksantan prilikom kultivacije u trajanju od 168 h u primenjenim eksperimentalnim uslovima. Kada su u pitanju izolati sa listova paprika, ostvareni stepen konverzije izvora ugljenika u ksantan, u primenjenim eksperimentalnim uslovima, kretao se od  $32,92 \pm 2,25\%$  do  $51,11 \pm 2,15\%$ . U poređenju sa rezultatima prethodne grupe izolata, *Xanthomonas* sojevi izolovani sa listova paprika konvertuju komercijalni glicerol u ksantan u nešto manjoj meri za isto vreme trajanja kultivacije. Prema rezultatima prikazanim u tabeli 5.10. može se primetiti da proizvodni soj PAP LIST 4 u ovoj grupi izolata konvertuje komercijalni glicerol u ksantan u najvećoj meri za vreme od 240 h. U ovoj grupi izolata, soj PAP LIST 1 se izdvaja kao soj koji za vreme od 168 h u najmanjoj meri konvertuje glicerol u ksantan.

Imajući u vidu da se u industrijskim uslovima stepen konverzije izvora ugljenika u ksantan kreće u intervalu od 50-85% (Rosalam i England, 2006), može se konstatovati da, unutar grupe izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača, soj KUPUS pokazuje najbolji potencijal za primenu u biotehnološkoj proizvodnji ksantana na medijumu sa glicerolom jer jedini konvertuje ovaj izvor ugljenika u ksantan u vrednosti većoj od 50%. Kod izolata sa listova paprika soj PAP LIST 4 se izdvaja kao najpogodniji za primenu u biotehnološkoj proizvodnji ksantana na medijumu sa glicerolom, s obzirom da predstavlja jedini soj unutar ove grupe izolata koji konvertuje glicerol u ksantan u vrednosti većoj od 50%.

#### **5.1.4. Uticaj selekcije proizvodnog soja i vremena kultivacije na kvalitet ksantana**

Po završetku bioprocasa ksantan je izdvojen iz kultivacionog medijuma (poglavlje 4.5), a zatim je izvršena njegova kvalitativna karakterizacija. Kao pokazatelj kvaliteta ksantana biosintetisanog u primenjenim eksperimentalnim uslovima određivana je srednja vrednost molekulske mase (poglavlje 4.6.3). Dvofaktorijalna analiza varijanse uticaja različitih proizvodnih sojeva i vremena kultivacije na molekulsku masu ksantana biosintetisanih na medijumu sa komercijalnim glicerolom izvršena je sa ciljem utvrđivanja statističke značajnosti uticaja variranih parametara, kao i njihove kombinacije na posmatrani indikator kvaliteta biopolimera. Dobijeni rezultati sumirani su u tabeli 5.11.

Rezultati dati u tabeli 5.11. pokazali su da proizvodni soj, vreme kultivacije, kao i njihova kombinacija imaju statistički značajan uticaj na molekulsku masu ksantana biosintetisanog primenom izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača na medijumu sa komercijalnim



glicerolom, što potvrđuju izuzetno niske *p*-vrednosti prikazane u tabeli 5.11. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima ranijih naučnih istraživanja koji takođe potvrđuju da molekulska masa ksantana, između ostalog, zavisi i od primenjenog proizvodnog soja i vremena kultivacije (García-Ochoa i sar., 2000; Casas i sar., 2000). Ukoliko se obrati pažnja na srednje vrednosti kvadrata za pomenutu grupu izolata, koje su prikazane u istoj tabeli, može se zaključiti da selekcija proizvodnog soja ( $1,454 \cdot 10^{11}$ ) ima najveći, vreme kultivacije ( $3,543 \cdot 10^{10}$ ) nešto manji, a njihova kombinacija ( $2,882 \cdot 10^9$ ) najmanji uticaj na kvalitet biopolimera.

Sa druge strane, iz rezultata predstavljenih u tabeli 5.11. može se videti da se *p*-vrednosti za analizirane parametre kod sojeva roda *Xanthomonas* izolovanih sa listova paprika značajno razlikuju. Prema dobijenim rezultatima *p*-vrednost za primenjene proizvodne sojeve je manja od 0,05 što znači da oni statistički značajno utiču na molekulsku masu biosintetisanog ksantana, dok vreme kultivacije i kombinacija proizvodnih sojeva i vremena kultivacije nemaju značajan uticaj na ovaj pokazatelj kvaliteta biopolimera jer su *p*-vrednosti za ove parametre 0,137150 i 0,826987, redom. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima koji sugerišu da pored uticaja na prinos ksantana, proizvodni sojevi *Xanthomonas* imaju značajan uticaj i na njegovu molekulsku masu (Demirci i sar., 2017). Rezultati statističke analize prikazani su i grafički, a dati su na slikama 5.13-5.16.

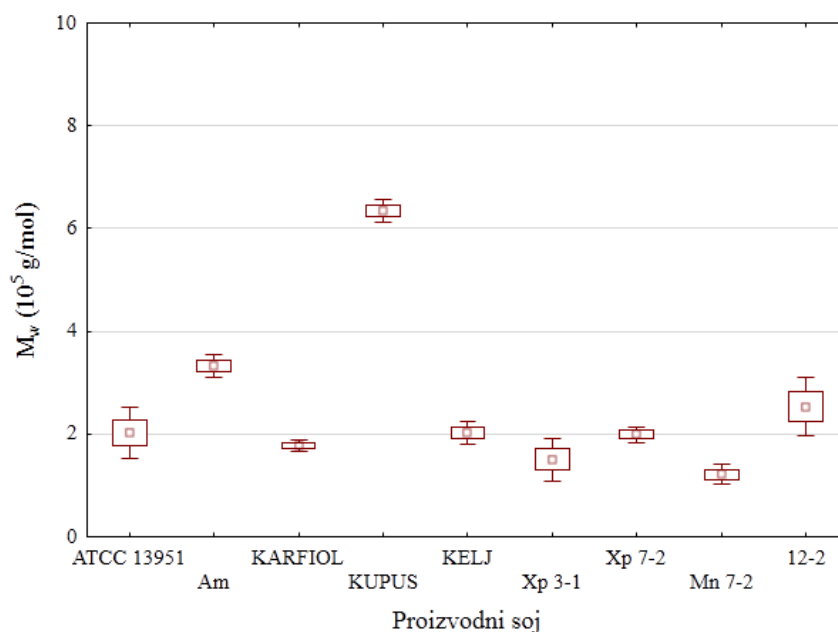
Tabela 5.11. Dvofaktorijalna analiza varijanse uticaja različitih proizvodnih sojeva i vremena trajanja kultivacije na molekulsku masu ksantana biosintetisanih na medijumu sa komercijalnim glicerolom

<i>Xanthomonas</i> sojevi	Izvor varijabiliteta	SS	DF	MS	F-odnos	<i>p</i> -vrednost
<b>Izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača</b>	Proizvodni soj	$1,163 \cdot 10^{12}$	8	$1,454 \cdot 10^{11}$	327,081	< 0,000001
	Vreme kultivacije	$3,543 \cdot 10^{10}$	1	$3,543 \cdot 10^{10}$	79,692	< 0,000001
	Proizvodni soj i vreme kultivacije	$2,306 \cdot 10^{10}$	8	$2,882 \cdot 10^9$	6,484	0,000032
	Greška	$1,600 \cdot 10^{10}$	36	$4,446 \cdot 10^8$		
<b>Izolati sa listova paprika</b>	Proizvodni soj	$1,977 \cdot 10^{12}$	4	$4,942 \cdot 10^{11}$	825,22	< 0,000001
	Vreme kultivacije	$1,436 \cdot 10^9$	1	$1,436 \cdot 10^9$	2,40	0,137150
	Proizvodni soj i vreme kultivacije	$8,869 \cdot 10^8$	4	$2,217 \cdot 10^8$	0,37	0,826987
	Greška	$1,198 \cdot 10^{10}$	20	$5,988 \cdot 10^8$		

SS – suma kvadrata; DF – stepen slobode; MS – srednja vrednost kvadrata.

Na slici 5.13. predstavljeni su rezultati statističke analize uticaja selekcije proizvodnog soja iz grupe izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača na molekulsku masu ksantana biosintetisanih na medijumu sa komercijalnim glicerolom za različito vreme trajanja kultivacije. Grafički predstavljeni rezultati ukazuju da se vrednost molekulske mase ksantana biosintetisanih u ispitivanim eksperimentalnim uslovima kretala od oko  $1 \cdot 10^5$  g/mol do oko  $7 \cdot 10^5$  g/mol, pri čemu je evidentno da soj KUPUS proizvodi ksantan najboljeg kvaliteta, bez obzira na vreme trajanja kultivacije. Takođe se može primetiti da ostali ispitivani izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača proizvode ksantan znatno manje molekulske mase i da među njima ne postoji značajne razlike. Na osnovu dobijenih rezultata može se konstatovati da se unutar grupe

izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača soj KUPUS izdvaja kao najpogodniji za biosintezu ksantana najboljeg kvaliteta.

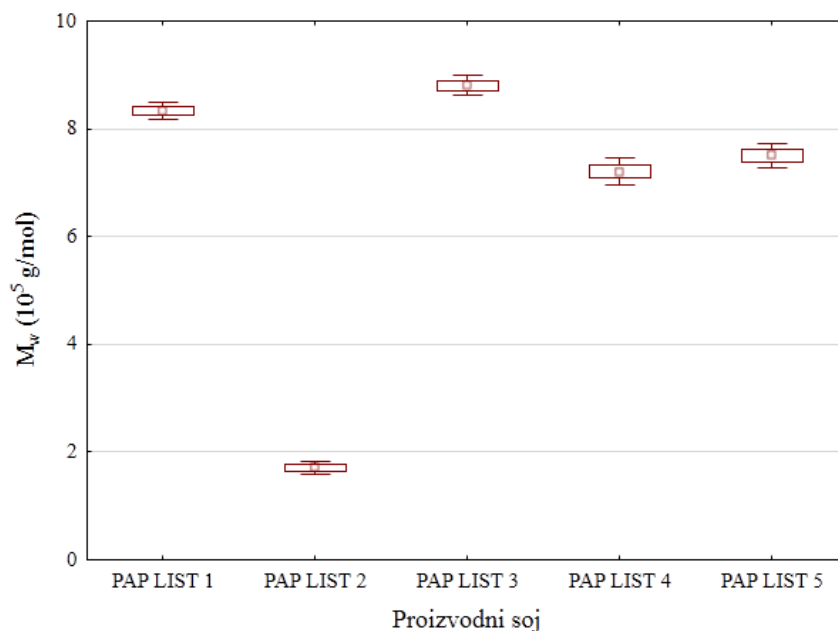


Slika 5.13. Uticaj selekcije proizvodnog soja na molekulsku masu ksantana ( $M_w$ ) biosintetisanih na medijumu sa komercijalnim glicerolom za različito vreme trajanja kultivacije: izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača

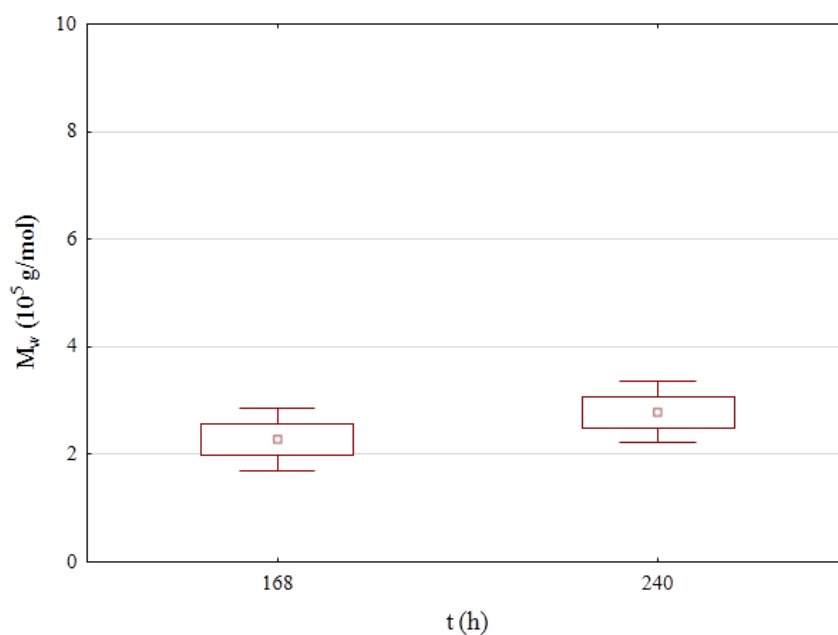
Slika 5.14. ilustruje rezultate statističke analize uticaja selekcije proizvodnog soja iz grupe izolata sa listova paprika na molekulsku masu ksantana biosintetisanih na medijumu sa komercijalnim glicerolom za različito vreme trajanja kultivacije. Prikazani rezultati ukazuju da se vrednost molekulske mase ksantana biosintetisanih u ispitivanim eksperimentalnim uslovima kretala od oko  $2 \cdot 10^5$  g/mol do oko  $9 \cdot 10^5$  g/mol. Ksantan najveće molekulske mase a samim tim i najboljeg kvaliteta, dobijen je prilikom kultivacije soja PAP LIST 3. Ksantan nešto slabijeg kvaliteta dobijen je kada su primenjeni sojevi PAP LIST 1, PAP LIST 4 i PAP LIST 5, dok je soj PAP LIST 2 produkovao ksantan najslabijeg kvaliteta u primenjenim eksperimentalnim uslovima, bez obzira na vreme kultivacije. Ukoliko se uporede vrednosti prosečnih molekulskih masa ksantana dobijenih prilikom kultivacije sojeva iz navedenih grupa izolata može se uočiti da izolati sa listova paprika produkujku ksantan veće molekulske mase od izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača u primenjenim eksperimentalnim uslovima.

Slika 5.15 prikazuje rezultate statističke analize uticaja selekcije vremena trajanja kultivacije na molekulsku masu ksantana biosintetisanih na medijumu sa komercijalnim glicerolom primenom izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača, bez obzira na primenjeni soj iz ove grupe izolata. Dobijeni rezultati ukazuju na to da je ksantan veće molekulske mase produkovan prilikom kultivacije ispitivanih izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača u trajanju od 240 h. Na osnovu svih prethodno diskutovanih rezultata može se pretpostaviti da je izolatom sa listova biljaka iz porodice kupusnjača potrebno više vremena da na medijumu sa komercijalnim glicerolom u primenjenim uslovima produkujku ksantan veće molekulske mase

usled činjenice da je različitim sojevima potrebno duže vreme da se adaptiraju na medijum sa glicerolom kao jedinom izvorom ugljenika i produkuju ksantan (Crosse i sar., 2020). Osim toga, dobijeni rezultati mogu biti posledica umrežavanja molekula ksantana tokom vremena trajanja bioprocasa i formiranja molekula veće molekulske mase, što je eksperimentalno potvrđeno u prethodnim istraživanjima (Rončević, 2016).

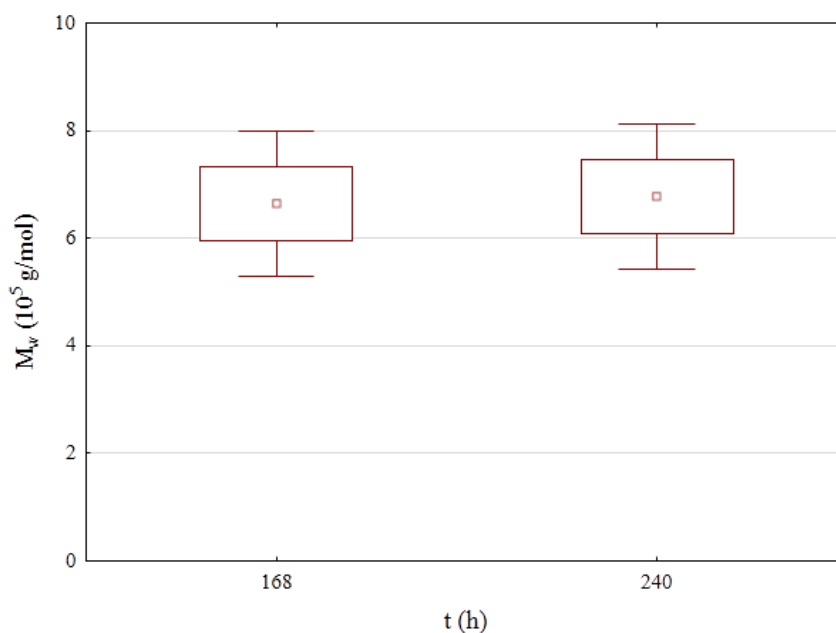


Slika 5.14. Uticaj selekcije proizvodnog soja na molekulsku masu ksantana ( $M_w$ ) biosintetisanih na medijumu sa komercijalnim glicerolom za različito vreme trajanja kultivacije: izolati sa listova paprika



Slika 5.15. Uticaj vremena trajanja kultivacije na molekulsku masu ksantana ( $M_w$ ) biosintetisanih na medijumu sa komercijalnim glicerolom: izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača

Na slici 5.16. prikazani su rezultati statističke analize uticaja selekcije vremena trajanja kultivacije na molekulsku masu ksantana biosintetisanih na medijumu sa komercijalnim glicerolom primenom izolata sa listova paprika, bez obzira na primenjeni soj iz ove grupe izolata. Prema prikazanim rezultatima je evidentno da ne postoji značajna razlika u vrednostima prosečne molekulske mase ksantana dobijene prilikom kultivacije izolata sa listova paprika u trajanju od 168 h i 240 h. Dobijeni rezultati ukazuju da duže trajanje kultivacije sojeva izolovanih sa listova paprika ne utiče na promenu kvaliteta biopolimera produkovanog u primenjenim eksperimentalnim uslovima.



Slika 5.16. Uticaj vremena trajanja kultivacije na molekulsku masu ksantana ( $M_w$ ) biosintetisanih na medijumu sa komercijalnim glicerolom: izolati sa listova paprika

Kako bi se odabrala kombinacija proizvodnog soja i vremena trajanja kultivacije pri kojoj se biosintetiše ksantan najveće molekulske mase, eksperimentalni podaci su analizirani i primenom Dankanovog testa višestrukih poređenja čiji su rezultati dati u tabeli 5.12.

Rezultati prikazani u tabeli 5.12. ukazuju na to da se prosečna molekulska masa biosintetisanih ksantana kretala od  $1,05 \pm 0,16 \cdot 10^5$  g/mol do  $6,54 \pm 0,2 \cdot 10^5$  g/mol prilikom kultivacije izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača, odnosno od  $1,65 \pm 0,16 \cdot 10^5$  g/mol do  $8,87 \pm 0,29 \cdot 10^5$  g/mol prilikom kultivacije izolata sa listova paprika. Dobijeni rezultati pokazuju da su vrednosti molekulske mase ksantana biosintetisanih na medijumu sa komercijalnim glicerolom za vreme trajanja kultivacije od 168 h i 240 h veće u poređenju sa prethodno objavljenim rezultatima gde je prilikom kultivacije referentnog soja *X. campestris* ATCC 13951 u trajanju od 168 h na medijumu sa 15 g/l komercijalnog glicerola biosintetisan ksantan molekulske mase od  $2,86 \cdot 10^5$  g/mol (Rončević i sar., 2014).

Tabela 5.12. Dankanov test višestrukih poređenja: molekulska masa ksantana koje na medijumu sa komercijalnim glicerolom biosintetišu sojevi *Xanthomonas* spp. za vreme trajanja kultivacije od 168 h i 240 h

Izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača			Izolati sa listova paprika		
Proizvodni soj	t (h)	$M_w$ ( $10^5$ g/mol)*	Proizvodni soj	t (h)	$M_w$ ( $10^5$ g/mol)*
Xp 3-1	168	1,05±0,16 <sup>a</sup>	PAP LIST 2	168	1,65±0,16 <sup>a</sup>
Mn 7-2	168	1,08±0,18 <sup>a</sup>	PAP LIST 2	240	1,76±0,14 <sup>a</sup>
Mn 7-2	240	1,36±0,21 <sup>ab</sup>	PAP LIST 4	168	7,03±0,32 <sup>b</sup>
ATCC 13951	168	1,48±0,24 <sup>bc</sup>	PAP LIST 4	240	7,38±0,22 <sup>bc</sup>
KARFIOL	168	1,73±0,2 <sup>cd</sup>	PAP LIST 5	168	7,48±0,19 <sup>c</sup>
KARFIOL	240	1,81±0,1 <sup>cd</sup>	PAP LIST 5	240	7,54±0,4 <sup>c</sup>
Xp 7-2	168	1,9±0,16 <sup>d</sup>	PAP LIST 1	168	8,31±0,2 <sup>d</sup>
12-2	168	1,92±0,28 <sup>d</sup>	PAP LIST 1	240	8,36±0,21 <sup>de</sup>
KELJ	168	1,96±0,31 <sup>d</sup>	PAP LIST 3	168	8,75±0,29 <sup>ef</sup>
Xp 3-1	240	1,96±0,21 <sup>d</sup>	PAP LIST 3	240	8,87±0,29 <sup>f</sup>
KELJ	240	2,08±0,3 <sup>d</sup>			
Xp 7-2	240	2,08±0,2 <sup>d</sup>			
ATCC 13951	240	2,55±0,16 <sup>e</sup>			
Am	168	3,15±0,2 <sup>fg</sup>			
12-2	240	3,15±0,2 <sup>f</sup>			
Am	240	3,5±0,2 <sup>g</sup>			
KUPUS	168	6,16±0,18 <sup>h</sup>			
KUPUS	240	6,54±0,2 <sup>i</sup>			

$M_w$  - srednja molekulska masa ksantana; t - vreme trajanja bioprocesa;

\* Vrednosti u jednoj koloni obeležene istim slovima nalaze se na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja od 95%.

Dobijeni rezultati prikazani u tabeli 5.12. ukazuju na to da se kao najpogodniji soj iz grupe izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača pokazao soj KUPUS koji je tokom kultivacije u trajanju od 240 h proizvodio ksantan molekulske mase od  $6,54 \pm 0,2 \cdot 10^5$  g/mol, dok je nešto manja vrednost molekulske mase ksantana ( $6,16 \pm 0,18 \cdot 10^5$  g/mol) ostvarena prilikom kultivacije istog soja u trajanju od 168 h. Rezultati prikazani u tabeli 5.12. ukazuju da se vrednost molekulske mase ksantana dobijenih prilikom kultivacije soja KUPUS u trajanju od 168 h i 240 h ne nalaze na istom nivou značajnosti, što potvrđuje i *p*-vrednost od 0,032521. Proizvodni soj Xp 3-1 je prilikom 168 h kultivacije proizvodio ksantan najlošijeg kvaliteta u ovoj grupi izolata, na šta ukazuje najmanja vrednost molekulske mase od  $1,05 \pm 0,16 \cdot 10^5$  g/mol. Dobijena vrednost se nalazi na istom nivou značajnosti kao i vrednosti molekulskih masa dobijenih prilikom kultivacije soja Mn 7-2 u trajanju od 168 h i 240 h, što potvrđuju *p*-vrednosti veće od 0,05. Među sojevima izolovanim sa listova paprika kao najpogodniji pokazao se soj PAP LIST 3 koji je prilikom kultivacije u trajanju od 240 h proizvodio ksantan prosečne molekulske mase od  $8,87 \pm 0,29 \cdot 10^5$  g/mol. Pored toga, bitno je spomenuti i to da je ovaj soj za 168 h kultivacije proizvodio ksantan statistički neznatno manje molekulske mase (*p*=0,569389). Dobijeni rezultati ukazuju na to da povećanje vremena trajanja kultivacije soja PAP LIST 3, u primenjenim eksperimentalnim uslovima, ne rezultuje značajnim povećanjem molekulske mase separisanog biopolimera. Soj PAP LIST 2 se pokazao kao soj koji proizvodi ksantan najlošijeg kvaliteta među sojevima iz ove grupe izolata, na šta ukazuju najmanje srednje vrednosti molekulske mase ksantana dobijenih prilikom kultivacije ovog soja u trajanju od 168 h i 240 h.

Na osnovu  $p$ -vrednosti od 0,582609 može se konstatovati da ne postoji značajna razlika u kvalitetu ksantana dobijenog primenom soja PAP LIST 2 u različitom vremenu trajanja kultivacije.

Prema dobijenim rezultatima, izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača produkuju ksantan boljeg kvaliteta ako se kultivacija izvodi u trajanju od 240 h. Kod izolata sa listova paprika ne dolazi do značajne promene u kvalitetu biosintetisanog ksantana prilikom povećanja vremena trajanja kultivacije sa 168 h na 240 h. Poređenjem dobijenih rezultata za obe grupe ispitivanih izolata može se zaključiti da prilikom kultivacije izolata sa listova paprika na medijumu sa komercijalnim glicerolom, u primenjenim eksperimentalnim uslovima, za kraće vreme (168 h) dolazi do produkcije ksantana boljeg kvaliteta, ako se kao indikator kvaliteta biopolimera uzme srednja vrednost molekulskih masa. Ovo ukazuje na odličan potencijal primene sojeva roda *Xanthomonas* izolovanih sa listova paprika u ekonomski isplativoj proizvodnji ksantana visokog kvaliteta na medijumu sa glicerolom.

## **5.2. KARAKTERIZACIJA SIROVOG GLICEROLA IZ PROIZVODNJE BIODIZELA U REPUBLICI SRBIJI**

Sirovi glicerol predstavlja glavni nusproizvod industrije biodizela, a obzirom da se proizvodni kapaciteti biodizela iz dana u dan povećavaju širom sveta dolazi do generisanja sve značajnijih količina ovog efluenta. Glicerol koji se generiše prilikom proizvodnje biodizela obično je čistoće 15-90%. Međutim sastav sirovog glicerola zavisi od više faktora zbog čega ga je teško precizno definisati (Nanda i sar., 2014; Trindade i sar., 2015). Pored glicerola, sirovi glicerol iz industrije biodizela može da sadrži vodu, organske i neorganske soli, sapune, alkohol, tragove glicerida, bojene materije, slobodne masne kiseline i druge organske neglicerolske materije (Ueoka i Katayama, 2001; Hajek i Skopal, 2010).

U okviru ove doktorske disertacije sirovi glicerol iz proizvodnje biodizela korišćen je kao izvor ugljenika u medijumima za različite faze biotehnoške proizvodnje ksantana. Sirovi glicerol korišćen u eksperimentalnim ispitivanjima dobijen je iz domaće fabrike za proizvodnju biodizela (Beograd, Srbija), gde su kao sirovine korišćena otpadna ulja i masti. Njegov sastav i parametri kvaliteta definisani su posredstvom kompanije Mol d.o.o. (Beograd, Srbija) a dodatne analize, u pogledu vrednosti pH, sadržaja TDS, sadržaja glicerola, sadržaja ukupnog i asimilabilnog azota, sadržaja suve materije i sadržaja pepela, odrađene su u okviru ovog istraživanja (poglavlje 4.6.1). Objedinjeni parametri kvaliteta sirovog glicerola korišćenog u okviru ove doktorske disertacije prikazani su u tabeli 5.13.

S obzirom da glicerol predstavlja pogodan izvor ugljenika za različite proizvodne mikroorganizme (Taccari i sar., 2012), njegov sadržaj u sirovom glicerolu je od velikog značaja za primenu ovog efluenta industrije biodizela kao sirovine u biotehnoškim postupcima proizvodnje visokovrednih proizvoda. Prema dobijenim rezultatima, sadržaj glicerola u sirovom glicerolu, koji je korišćen u okviru ovog istraživanja, iznosio je 47,60%(w/v), što je u skladu sa prethodno iznetim literaturnim navodima da se sadržaj glicerola u sirovom glicerolu kreće od 15%(w/w) do 90%(w/w) (Nanda i sar., 2014; Trindade i sar., 2015). Hu i saradnici (2012) su u svom istraživanju ispitivali sastav pet različitih uzoraka sirovog glicerola dobijenih iz

proizvodnje biodizela gde su kao sirovine korišćena sojina ulja i različita otpadna ulja. Prema rezultatima ovog istraživanja sadržaj glicerola u uzorcima sirovog glicerola kretao se od 22,9%(w/w) do 63,0%(w/w). Pored toga, bitno je napomenuti da glicerol korišćen u okviru ove doktorske disertacije poseduje veću čistoću u poređenju sa uzorcima sirovog glicerola iz proizvodnje biodizela korišćenih u istraživanjima kanadskih stručnjaka gde je sadržaj glicerola iznosio 15,4%(w/w) i 30,2%(w/w) (Valerio i sar., 2015).

Tabela 5.13. Parametri kvaliteta sirovog glicerola

Parametar	Jedinica	Vrednost
Sadržaj glicerola	% (w/v)	47,60
Gustina	g/cm <sup>3</sup>	1,12
Kinematska viskoznost	mm <sup>2</sup> /s	74,97
Sadržaj mehaničkih nečistoća	% (w/w)	0,03
Vrednost pH	1	9,29
Sadržaj pepela	% (w/w)	81,75
Sadržaj suve materije	% (w/w)	4,83
Sadržaj organskih materija	% (w/w)	95,12
Sadržaj metanola	% (w/w)	0,45
Sadržaj natrijuma	mg/kg	199,83
Sadržaj kalijuma	% (w/w)	3,73
Sadržaj kalcijuma	mg/kg	6,76
Sadržaj magnezijuma	mg/kg	2,31
Sadržaj sumpora	mg/kg	1,58
Sadržaj fosfora	% (w/w)	0,02
Sadržaj ukupnog azota	mg/l	n.d.
Sadržaj asimilabilnog azota	mg/l	n.d.
Sadržaj ukupnih rastvorenih soli	mg/l	421,50

*n.d. - nije detektovano*

Gustina čistog glicerola na temperaturi od 20°C iznosi 1,261 g/cm<sup>3</sup> (Kong i sar., 2016). Vrednost gustine sirovog glicerola korišćenog u ovom istraživanju nešto je manja od gustine čistog glicerola i iznosi 1,120 g/cm<sup>3</sup>. Ova vrednost je u saglasnosti sa rezultatima istraživanja gde se gustina uzoraka sirovog glicerola iz proizvodnje biodizela kretala od 1,01 g/cm<sup>3</sup> do 1,20 g/cm<sup>3</sup> (Hu i sar., 2012).

Vrednost pH se u okviru prethodno pomenutog istraživanja sa pet uzoraka sirovog glicerola kretala u opsegu od 6,50 do 10,00 (Hu i sar., 2012), što se takođe podudara sa vrednošću pH sirovog glicerola korišćenog u ovom istraživanju koja iznosi 9,29. Povišen nivo alkalnosti zabeležen u sirovom glicerolu posledica je prisustva ostataka katalizatora, kao što je NaOH, iz procesa transesterifikacije ulja (Rodrigues i sar., 2016).

U okviru karakterizacije sirovog glicerola korišćenog u ovom istraživanju odrađena je i analiza sadržaja pepela. Sadržaj pepela pruža informacije o katalizatoru koji je korišćen u procesu transesterifikacije, pri čemu najveći deo prelazi u sastav sirovog glicerola, dok drugi deo ostaje u obliku natrijumove ili kalijumove soli. Dakle, vrednost pepela od 4,83%(w/w) (tabela 5.13) potvrđuje prisustvo ostataka katalizatora u sirovom glicerolu, kao što je već navedeno u dostupnoj naučnoj literaturi (Kumar i sar., 2019). Prema rezultatima ranijih istraživanja sadržaj pepela u sirovom glicerolu dobijenom iz proizvodnje biodizela kreće se od 2,70% (w/w) (Hu i sar., 2012) do 6,34%(w/w) (Kumar i sar., 2019).

Sadržaj suve materije u sirovom glicerolu korišćenom u ovom istraživanju iznosi 81,75%(w/w) (tabela 5.13) i veoma dobro se podudara sa rezultatima karakterizacije različitih uzoraka sirovog glicerola dobijenog iz industrije biodizela iz ranijih istraživanja gde se ova vrednost kretala od 56,58%(w/w) do 99%(w/w) (Hu i sar., 2012; Kumar i sar., 2019).

Sadržaj organskih materija u sirovom glicerolu, koji je korišćen u ovom istraživanju, iznosi 95,12%(w/w) (tabela 5.13). Organske materije potiču od triglicerida koji su zaostali iz procesa transesterifikacije, ali mogu biti i ostaci slobodnih masnih kiselina iz ulja (Rodrigues i sar., 2016).

Niži alkoholi, kao što su metanol i etanol, uobičajeno se koriste u proizvodnji biodizela, ali se u fazi odvajanja biodizela od glicerola uklanjaju. Sadržaj metanola od 0,45%(w/w) u sirovom glicerolu korišćenom u ovom istraživanju ukazuje na dobro uklanjanje metanola od glicerola. U poređenju sa rezultatima ranijih istraživanja, gde se sadržaj metanola kretao u opsegu od 6,20%(w/w) do 15,84%(w/w) (Hu i sar., 2012; Rodrigues i sar., 2016), ova vrednost je značajno manja.

Prema podacima iz naučne literature, sirovi glicerol iz industrije biodizela sadrži određenu količinu metala poput natrijuma, kalcijuma, kalijuma, magnezijuma, ali i nemetali, kao što su fosfor i sumpor, takođe mogu biti prisutni. Količine navedenih metala, izuzev natrijuma, obično se kreću u rasponu od 4 ppm do 163 ppm, dok sadržaj natrijuma prelazi 1%(w/w) (Ayoub i Abdullah, 2012). Sadržaj kalijuma, kalcijuma, magnezijuma i natrijuma u sirovom glicerolu korišćenom u ovom istraživanju iznosio je: 3,73%(w/w), 6,76 mg/kg (0,000676%(w/w)), 2,31 mg/kg (0,000231%(w/w)) i 199,83 mg/kg (0,019983%(w/w)), redom. Dobijene vrednosti ukazuju na to da je natrijum najzastupljeniji metal prisutan u analiziranom sirovom glicerolu. Dobijene vrednosti u saglasnosti su sa rezultatima istraživanja koje su vršili Hu i saradnici (2012) prilikom karakterizacije pet uzoraka sirovog glicerola gde se takođe ispostavilo da je natrijum prisutan u najvećoj koncentraciji u poređenju sa ostalim metalima prisutnim u uzorcima. Sadržaj natrijuma u sirovom glicerolu korišćenom u okviru ove doktorske disertacije u saglasnosti je sa sadržajem natrijuma u ispitivanim uzorcima prethodno pomenutog istraživanja, koji se kretao od 0,00906%(w/w) do 1,931%(w/w), dok je sadržaj kalijuma, kalcijuma i magnezijuma u uzorcima bio nešto veći i kretao se u opsegu od 0,01188%(w/w) do 3,939%(w/w), 0,0004-0,00205%(w/w) i 0,00037-0,00142%(w/w), redom. Pored navedenih metala, u sastavu sirovog glicerola može se naći i gvožđe. Prema podacima iz ranijeg istraživanja sadržaj gvožđa u sirovom glicerolu iz proizvodnje biodizela kreće se od 0,00316%(w/w) do 0,00921%(w/w) (Hu i sar., 2012).

Nemetali takođe mogu zaostati u sirovom glicerolu iz proizvodnje biodizela. Analiziranjem sadržaja sirovog glicerola korišćenog u ovom istraživanju ustanovljeno je da su od nemetala prisutni sumpor i fosfor, i to u koncentracijama od 1,58 mg/kg (0,000158%(w/w)) i 0,015%(w/w), redom. Sadržaj fosfora u sirovom glicerolu u skladu je sa rezultatima ranijih istraživanja gde je prilikom karakterizacije uzoraka sirovog glicerola ustanovljeno da se sadržaj fosfora kretao od 0,00247%(w/w) do 0,02338%(w/w) (Hu i sar., 2012).

Karakterizacija sirovog glicerola korišćenog u istraživanjima u okviru ove doktorske disertacije podrazumevala je i analiziranje sadržaja ukupnog i asimilabilnog azota. Međutim, u analiziranim uzorcima nije detektovano prisustvo ovog elementa ili je njegov sadržaj ispod granice detekcije



primenjenih metoda. Prema rezultatima jednog od ranijih istraživanja, azot je prisutan u uzorcima sirovog glicerola i to u koncentraciji od 0,3%(w/w) do 1,2%(w/w) (Hu i sa., 2012), dok prema rezultatima ostalih istraživanja nije zabeleženo prisustvo azota u sirovom glicerolu (Valerio i sar., 2015; Rodrigues i sar., 2016;).

Sadržaj ukupnih rastvorenih soli u sirovom glicerolu korišćenom u okviru ove doktorske disertacije iznosi 421,50 mg/l. Soli koje zaostaju u sirovom glicerolu poreklom su iz procesa transesterifikacije, tačnije, od katalizatora korišćenih u ovom procesu. Najčešće se kao katalizatori prilikom procesa transesterifikacije koriste NaOH, CH<sub>3</sub>KO ili KOH (Kumar i sar., 2019). U zavisnosti od korišćenog katalizatora u procesu transesterifikacije dobija se sirovi glicerol različitog sastava u pogledu sadržaja soli, ali i metala čiji je sadržaj ranije diskutovan.

Uzimajući u obzir prethodno diskutovane vrednosti parametara kvaliteta sirovog glicerola može se zaključiti da sastav sirovog glicerola koji generiše industrija biodizela zavisi od sirovina korišćenih za proizvodnju biodizela, njihovog sastava, tehnologije dobijanja biodizela, ali i od korišćenih katalizatora. Sve navedeno veoma utiče na krajnji sastav sirovog glicerola. Kao što je već rečeno, pored glicerola u sirovom materijalu prisutni su i određeni metali, nemetali, soli, ostaci katalizatora, mineralne materije i slično (Hu i sar., 2012). Sirovi glicerol potencijalno može biti značajan supstrat u mnogim biotehnološkim procesima i zbog niske cene. Poznato je da sastav kultivacionog medijuma zavisi od potreba proizvodnog mikroorganizma za određenim nutrijentima koji omogućavaju njegov rast i biosintezu željenih proizvoda, te da su najznačajniji nutrijenti u kultivacionom medijumu izvori ugljenika, azota, fosfora i mineralnih materija (Brandão i sar., 2013). S obzirom da sirovi glicerol, koji je korišćen u okviru ove doktorske disertacije, sadrži izvore ugljenika i fosfora, kao i različite mineralne materije, pre upotrebe u biotehnološkim procesima neophodno ga je obogatiti organskim i/ili neorganskim izvorima azota. Rezultati prethodno sprovedenih istraživanja, gde je eksperimentalno dokazana metabolička aktivnost svih ispitivanih izolata roda *Xanthomonas* na medijumu sa glicerolom kao jedinim izvorom ugljenika (poglavlje 5.1), ukazuju na obećavajući potencijal iskorišćenja sirovog glicerola u biotehnološkoj proizvodnji ksantana.

### **5.3. SKRINING MOGUĆNOSTI BIOSINTEZE KSANTANA PRIMENOM SOJEVA *Xanthomonas* spp. NA MEDIJUMU SA SIROVIM GLICEROLOM**

Sledeća faza istraživanja u okviru ove doktorske disertacije izvedena je u nekoliko koraka, a imala je za cilj skrining mogućnosti biosinteze ksantana primenom sojeva *Xanthomonas* spp. na medijumu sa sirovim glicerolom. Dobijeni rezultati su podeljeni i prikazani u tri dela. Prvi deo obuhvata rezultate ispitivanja uticaja selekcije proizvodnog soja i vremena trajanja kultivacije na količinu ksantana u medijumu sa sirovim glicerolom. U drugom delu predstavljeni su rezultati ispitivanja uticaja selekcije proizvodnog soja i vremena trajanja kultivacije na kvalitet ksantana biosintetisanog na medijumu sa sirovim glicerolom. Treći deo se odnosi na odabir najpogodnijeg soja za proizvodnju ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom u primenjenim eksperimentalnim uslovima.

### 5.3.1. Uticaj selekcije proizvodnog soja i vremena kultivacije na količinu ksantana u medijumu sa sirovim glicerolom

Poznato je da različite vrste roda *Xanthomonas* poseduju različite metaboličke puteve i cikluse (Saddler i Bradbury, 2004) i da je različitim sojevima potrebno različito vreme da se adaptiraju na prisustvo glicerola kao jedinog izvora ugljenika u medijumu (Crosse i sar., 2020). Rezultati prikazani u okviru poglavlja 5.1. ukazuju na to da svi ispitivani sojevi *Xanthomonas* spp. uspešno metabolišu glicerol kao izvor ugljenika u medijumu za biosintezu ksantana. U ovoj fazi istraživanja ispitivana je mogućnost biosinteze ksantana različitim izolatima roda *Xanthomonas* na medijumu sa sirovim glicerolom. Rezultati karakterizacije sirovog glicerola, predstavljeni u okviru poglavlja 5.2, pokazuju da sirovi glicerol predstavlja kompleksan supstrat i da pored glicerola kao izvora ugljenika, sadrži i druge komponente. Kada se sirovine kompleksnog i nestandardnog sastava koriste u biotehnološkoj proizvodnji jedino je eksperimentalnim putem moguće dokazati njihovu primenu jer se na taj način utvrđuje da li neke od prisutnih komponenti deluju inhibitorno na metabolizam proizvodnog mikroorganizma (Savić, 2007). U skladu sa tim, postoje indicije da je vreme za koje proizvodni mikroorganizam metaboliše ovaj izvor ugljenika i biosintetiše željeni proizvod duže nego što je to slučaj kod primene jednostavnijih supstrata. Iz navedenog razloga, u ovom koraku je ispitivana mogućnosti biosinteze ksantana različitim izolatima roda *Xanthomonas* na medijumu sa sirovim glicerolom za različito vreme trajanja bioprocasa. Kako bi se realizovao postavljeni cilj ove faze istraživanja, kultivisano je ukupno 14 sojeva roda *Xanthomonas*, i to referentni soj *X. campestris* ATCC 13951 i 13 lokalnih izolata *Xanthomonas* spp. (poglavlje 4.1). Kultivacioni medijumi korišćeni u ovoj fazi istraživanja opisani su u poglavlju 4.2, dok su priprema inokuluma i uslovi biosinteze navedeni u poglavljima 4.3. i 4.4. ovog rada. Po završetku zadatog vremena kultivacije ispitivanih sojeva izvršena je analiza medijuma kako bi se potvrdila mogućnost biosinteze ksantana i procenila uspešnost izvođenja bioprocasa u primenjenim eksperimentalnim uslovima. Kako bi se utvrdilo da li je došlo do produkcije ksantana vršena su reološka meranja (poglavlje 4.6.2), a kao pokazatelj uspešnosti bioprocasa određivan je sadržaj biosintetisanog ksantana na osnovu čije vrednosti je izračunat i stepen konverzije izvora ugljenika u proizvod (poglavlje 4.5). Dobijeni medijumi analizirani su i u pogledu vrednosti pH i sadržaja TDS (poglavlje 4.6.2).

Reološke karakteristike medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom, dobijenih primenom ispitivanih sojeva roda *Xanthomonas* koji su u zadatim eksperimentalnim uslovima kultivisani u različitom trajanju, prikazane su u tabeli 5.14.

Pseudoplastične karakteristike medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom, dobijenih kultivacijom ispitivanih proizvodnih sojeva u različitom trajanju, potvrđene su vrednostima indeksa toka ( $n$ ) datih u tabeli 5.14. Vrednosti indeksa toka medijuma analiziranih u ovoj fazi istraživanja kretale su se od 0,4792 do 0,8355 i od 0,5522 do 0,7129 pri kultivaciji izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača u trajanju od 168 h i 240 h, redom. Kod izolata sa listova paprika ove vrednosti nalazile su se u intervalu od 0,4471 do 0,7158, prilikom kultivacije u trajanju od 168 h, dok su se prilikom kultivacije u trajanju od 240 h kretale od 0,4522 do 0,6619. Vrednosti faktora konzistencije medijuma za biosintezu dobijenog po završetku kultivacije sojeva *Xanthomonas* izolovanih sa listova biljaka iz porodice kupusnjača na medijumu sa sirovim glicerolom u trajanju od 168 h i 240 h bile su u opsegu od 0,0139 Pa·s<sup>n</sup> do 0,0961 Pa·s<sup>n</sup> i od 0,0432 Pa·s<sup>n</sup> do 0,1655 Pa·s<sup>n</sup>, redom (tabela 5.14). Sa druge strane, vrednosti faktora

konzistencije medijuma za biosintezu dobijenog po završetku kultivacije sojeva *Xanthomonas* izolovanih sa listova paprika na medijumu sa sirovim glicerolom u trajanju od 168 h i 240 h kretale su se od 0,0405 Pa·s<sup>n</sup> do 0,1646 Pa·s<sup>n</sup> i od 0,243 Pa·s<sup>n</sup> do 0,4246 Pa·s<sup>n</sup>, redom (tabela 5.14). Faktor konzistencije je proporcionalan viskozitetu, a različite vrednosti ovog parametra prikazane u tabeli 5.14. ukazuju na razliku u količini i kvalitetu ksantana proizvedenog u primenjenim eksperimentalnim uslovima prilikom kultivacije različitih izolata roda *Xanthomonas* na medijumima sa sirovim glicerolom u trajanju od 168 h i 240 h.

Tabela 5.14. Reološke karakteristike medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije sojeva *Xanthomonas* spp. u trajanju od 168 h i 240 h

<i>Xanthomonas</i> sojevi	Kultivacija u trajanju od 168 h			Kultivacija u trajanju od 240 h			
	K [Pa·s <sup>n</sup> ]	n [1]	η <sub>a</sub> [mPa·s]	K [Pa·s <sup>n</sup> ]	n [1]	η <sub>a</sub> [mPa·s]	
Izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača	ATCC 13951	0,0139	0,8355	4,98±1,48	0,0633	0,6769	13,11±2,39
	Am	0,056	0,6512	7,46±3,03	0,0463	0,6836	10,67±0,40
	KARFIOL	0,0573	0,6568	8,19±3,07	0,0432	0,7129	9,71±6,30
	KUPUS	0,0961	0,5170	10,30±0,15	0,1655	0,6232	21,16±7,11
	KELJ	0,0627	0,6047	6,73±3,62	0,0731	0,6735	14,11±3,22
	Xp 3-1	0,0643	0,4792	4,28±3,33	0,0473	0,7029	11,40±1,70
	Xp 7-2	0,056	0,5570	4,97±2,14	0,0376	0,6996	7,66±2,25
	Mn 7-2	0,0817	0,5430	6,24±3,42	0,0862	0,5522	6,98±3,56
	12-2	0,0473	0,5715	4,86±2,45	0,0628	0,6378	7,71±3,84
Izolati sa listova paprika	PAP LIST 1	0,1646	0,4471	11,87±2,95	0,243	0,4893	23,06±2,11
	PAP LIST 2	0,1398	0,4908	11,72±3,24	0,2408	0,5045	24,29±2,34
	PAP LIST 3	0,0854	0,5537	10,41±2,86	0,3174	0,4653	26,80±1,05
	PAP LIST 4	0,0864	0,5438	10,04±1,39	0,4246	0,4522	29,23±6,18
	PAP LIST 5	0,0405	0,7158	10,84±0,69	0,1742	0,6619	22,37±8,78

K – faktor konzistencije; n – indeks toka; η<sub>a</sub> – prividni viskozitet.

Na osnovu prethodno diskutovanih vrednosti indeksa toka i faktora konzistencije izračunati su prividni viskoziteti medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom dobijenih nakon kultivacije različitih izolata roda *Xanthomonas* u trajanju od 168 h i 240 h. Dobijeni rezultati takođe su prikazani u tabeli 5.14, a pokazuju da su se vrednosti prividnog viskoziteta medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača u trajanju od 168 h kretale od 4,28±3,33 mPa·s do 10,30±0,15 mPa·s, dok su se vrednosti ovog parametra izračunate nakon kultivacije istih sojeva u trajanju od 240 h kretale od 6,98±3,56 mPa·s do 21,16±7,11 mPa·s. Analizom tabelarno prikazanih rezultata može se uočiti da je prividni viskozitet medijuma sa glicerolom po završetku kultivacije soja KUPUS veći u poređenju sa prividnim viskozitetom medijuma dobijenih delovanjem ostalih ispitivanih sojeva iz grupe izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača. Dobijeni rezultati sugerišu da prilikom povećanja vremena trajanja kultivacije ispitivanih sojeva sa 168 h na 240 h dolazi do porasta viskoziteta medijuma za biosintezu, što je u saglasnosti sa rezultatima ranijih istraživanja gde je ustanovljeno da povećanjem vremena trajanja bioprocasa dolazi do porasta viskoziteta kultivacione tečnosti ksantana (Gilani i sar., 2011). U ranijim istraživanjima je ustanovljeno da prilikom porasta koncentracije ksantana u rastvoru dolazi do porasta prividnog viskoziteta tog rastvora. Stoga se može zaključiti da se prilikom kultivacije izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača na medijumu sa sirovim glicerolom u trajanju od 240 h produkuje veća količina

ksantana u poređenju sa kultivacijom istih sojeva u trajanju od 168 h. Međutim, za izvođenje konačnih zaključaka potrebno je odrediti sadržaj ksantana, ali i njegov kvalitet.

Prilikom biosinteze ksantana primenom izolata sa listova paprika na medijumu sa sirovim glicerolom dolazi do sličnog ponašanja kao kod prethodno diskutovane grupe izolata (tabela 5.14). Naime, vrednosti prividnog viskoziteta medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom, izračunate nakon kultivacije izolata sa listova paprika u trajanju od 168 h kretale su se u opsegu od  $10,04 \pm 1,39$  mPa·s do  $11,87 \pm 2,95$  mPa·s, dok su se vrednosti prividnog viskoziteta medijuma sa sirovim glicerolom dobijenih delovanjem istih izolata u trajanju od 240 h nalazile u opsegu od  $22,37 \pm 8,78$  mPa·s do  $29,23 \pm 6,18$  mPa·s. Može se primetiti da je i u ovom slučaju veći viskozitet medijuma sa sirovim glicerolom postignut nakon kultivacije u trajanju od 240 h. Rezultati prikazani u tabeli 5.14. sugerišu da je najveća vrednost prividnog viskoziteta medijuma za biosintezu zabeležena prilikom kultivacije izolata PAP LIST 4 u trajanju od 240 h.

Kao što je već navedeno, vrednost pH predstavlja važan parametar za uspešno izvođenje biotehnološkog postupka proizvodnje ksantana, te su po završetku kultivacije ispitivanih izolata u trajanju od 168 h i 240 h dobijeni medijumi za biosintezu sa sirovim glicerolom podvrgnuti merenju vrednosti pH. Zabeležene vrednosti date su u tabeli 8.7. (Prilog 1). Vrednosti pH medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom dobijenih po završetku kultivacije izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača u trajanju od 168 h kretale su se od  $5,55 \pm 0,04$  do  $7,48 \pm 0,03$ , a vrednosti izmerene nakon kultivacije istih izolata u trajanju od 240 h iznosile su od  $5,54 \pm 0,05$  do  $7,37 \pm 0,06$ . Sa druge strane, vrednosti pH medijuma sa sirovim glicerolom nakon biosinteze ksantana primenom izolata sa listova paprika u trajanju od 168 h kretale su se od  $6,35 \pm 0,05$  do  $6,44 \pm 0,03$ , odnosno od  $5,66 \pm 0,03$  do  $5,72 \pm 0,03$  kada je kultivacija trajala 240 h. Iako je niža od 7,00, vrednost pH medijuma sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije svih ispitivanih izolata bila je iznad kritične vrednosti, što je važno iz ugla ekonomske isplativosti bioprocasa, jer ukazuje na potencijalnu proizvodnju ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom bez potrebe i troškova korigovanja vrednosti pH tokom izvođenja samog bioprocasa.

Po završetku kultivacije izolata roda *Xanthomonas* na medijumu sa sirovim glicerolom u trajanju od 168 h i 240 h izvršeno je merenje vrednosti sadržaja TDS, a dobijene vrednosti date su u tabeli 8.8. (Prilog 1). Izmerene vrednosti sadržaja TDS u medijumima sa sirovim glicerolom koji su dobijeni po završetku kultivacije izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača u trajanju od 168 h kretale su se od  $2,94 \pm 0,04$  g/l do  $3,14 \pm 0,06$  g/l i od  $2,97 \pm 0,04$  g/l do  $3,13 \pm 0,03$  g/l prilikom kultivacije navedenih sojeva u trajanju od 240 h. Nakon kultivacije izolata sa listova paprika u trajanju od 168 h zabeležene su vrednosti sadržaja TDS u medijumu za biosintezu od  $2,86 \pm 0,03$  g/l do  $2,92 \pm 0,03$  g/l, odnosno od  $2,73 \pm 0,02$  g/l do  $2,89 \pm 0,03$  g/l kada je kultivacija istih sojeva trajala 240 h. Analizom tabelarno prikazanih rezultata može se uočiti da je vrednost sadržaja TDS u proizvodnim medijumima sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije ispitivanih izolata u primenjenim uslovima bila u granicama potrebnim za nesmetanu metaboličku aktivnost proizvodnog mikroorganizma.

Utvrđivanje statističke značajnosti uticaja ispitivanih proizvodnih sojeva i vremena kultivacije, kao i njihove kombinacije na sadržaj ksantana, biosintetisanog u primenjenim eksperimentalnim uslovima na medijumu sa sirovim glicerolom, izvršeno je primenom dvofaktorijske analize varijanse. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 5.15.

Rezultati dvofaktorijske analize varijanse pokazali su da kod izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača vreme kultivacije i kombinacija proizvodnog soja i vremena kultivacije imaju statistički značajan uticaj na sadržaj ksantana, dok proizvodni soj ne utiče značajno na njegovu biosintezu, što potvrđuju  $p$ -vrednosti od 0,000029, 0,023529 i 0,116252, redom (tabela 5.15). Posmatrajući srednje vrednosti kvadrata može se primetiti da vreme kultivacije (32,328) ima značajniji uticaj na produkciju ksantana od kombinacije proizvodnog soja i vremena kultivacije (3,673). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima istraživanja vršenih u Brazilu gde je utvrđeno da vreme kultivacije utiče na sadržaj ksantana biosintetisanog primenom izolata *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* 645, *X. axonopodis* pv. *manihotis* 290 i *X. campestris* pv. *campestris* 1155 (Miranda i sar., 2020).

Tabela 5.15. Dvofaktorijska analiza varijanse uticaja različitih proizvodnih sojeva i vremena trajanja kultivacije na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom

<i>Xanthomonas</i> sojevi	Izvor varijabiliteta	SS	DF	MS	F-odnos	$p$ -vrednost
<b>Izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača</b>	Proizvodni soj	19,973	8	2,497	1,768	0,116252
	Vreme kultivacije	32,328	1	32,328	22,891	0,000029
	Proizvodni soj i vreme kultivacije	29,383	8	3,673	2,601	0,023529
	Greška	50,841	36	1,412	-	-
<b>Izolati sa listova paprika</b>	Proizvodni soj	11,016	4	2,754	3,668	0,021343
	Vreme kultivacije	2,391	1	2,391	3,185	0,089501
	Proizvodni soj i vreme kultivacije	13,554	4	3,388	4,513	0,009243
	Greška	15,017	20	0,751	-	-

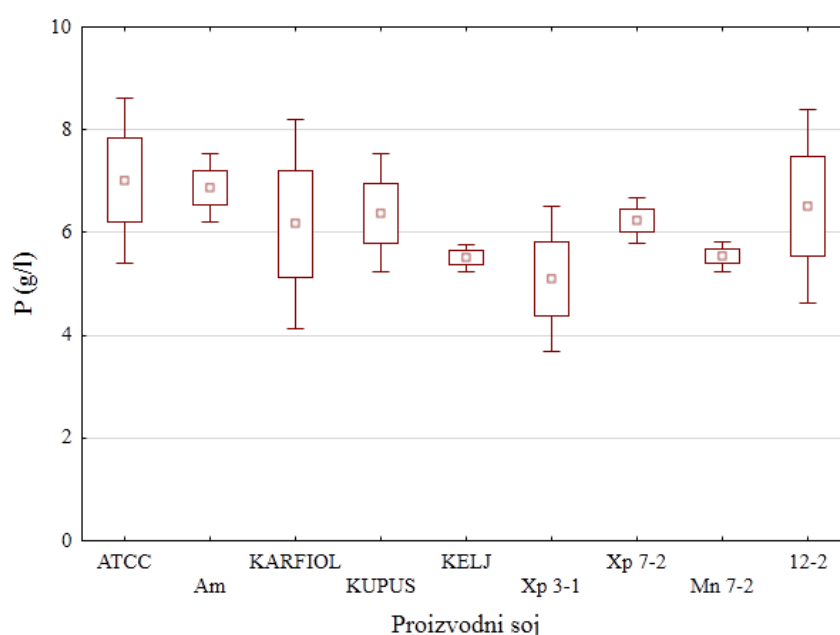
*SS* – suma kvadrata; *DF* – stepen slobode; *MS* – srednja vrednost kvadrata.

Posmatrajući rezultate za izolate sa listova paprika prikazane u tabeli 5.15. može se uočiti drugačije ponašanje u poređenju sa prethodnom grupom izolata. Prema dobijenim rezultatima, proizvodni soj i kombinacija proizvodnog soja i vremena kultivacije imaju značajan uticaj na sadržaj biosintetisanog ksantana, što potvrđuju  $p$ -vrednosti 0,021343 i 0,009243, redom. Sa druge strane, vreme trajanja kultivacije nema statistički značajan uticaj na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom, a to dokazuje  $p$ -vrednost od 0,089501. Srednje vrednosti kvadrata date u istoj tabeli pokazuju da kombinacija proizvodnog soja i vremena kultivacije (3,388) značajnije utiče na sadržaj ksantana produkovanog primenom izolata sa listova paprika od samog odabira proizvodnog soja (2,754).

Rezultati statističke analize prikazani su i grafički na slikama 5.17-5.20, a kako bi se odabrala kombinacija proizvodnog soja i vremena kultivacije pri kojoj se ostvaruje najveća produkcija ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom eksperimentalni podaci su analizirani i primenom Dankanovog testa višestrukih poređenja čiji su rezultati dati u tabeli 5.16.

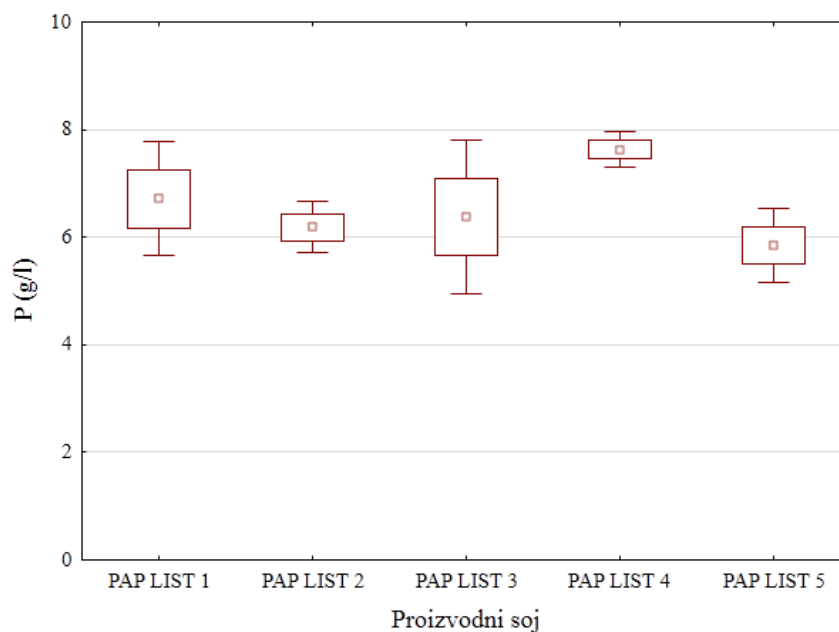
Na slici 5.17. prikazani su rezultati statističke analize uticaja selekcije proizvodnog soja iz grupe izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom za različito vreme trajanja kultivacije. Ako se uzme u obzir srednja vrednost sadržaja biosintetisanog ksantana za sve proizvodne sojeve, kao najproduktivniji pokazao se soj ATCC 13951, bez obzira na vreme trajanja kultivacije. Analizom grafički predstavljenih

rezultata se može primetiti da su, pored referentnog soja, izolati Am, KARFIOL, KUPUS i 12-2 takođe pokazali dobru produktivnost. Bitno je naglasiti su i drugi ispitivani sojevi proizvodili ksantan, ali u manjoj količini u poređenju sa navedenim sojevima. Razlike u izdvojenim količinama ksantana najverovatnije su uzrokovane razlikama u fiziološkim karakteristikama među korišćenim sojevima iz grupe izolata sa biljaka iz porodice kupusnjača (Moreira i sar., 2001). Najmanju količinu ksantana u primenjenim eksperimentalnim uslovima produkovao je soj Xp 3-1. Sadržaj ksantana biosintetisanih primenom ispitivanih izolata roda *Xanthomonas* u okviru ovog ispitivanja kretao se od oko 2 g/l do 9 g/l. Ostvarene vrednosti sadržaja ksantana su nešto veće u poređenju sa rezultatima dobijenim u okviru ranijih istraživanja gde je prilikom kultivacije soja ATCC 13951 na medijumu sa sirovim glicerolom (15 g/l) produkovan ksantan u koncentraciji od 6,77 g/l do 7,22 g/l (Rončević i sar., 2020a).



Slika 5.17. Uticaj selekcije proizvodnog soja na sadržaj ksantana (P) u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom za različito vreme trajanja kultivacije: izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača

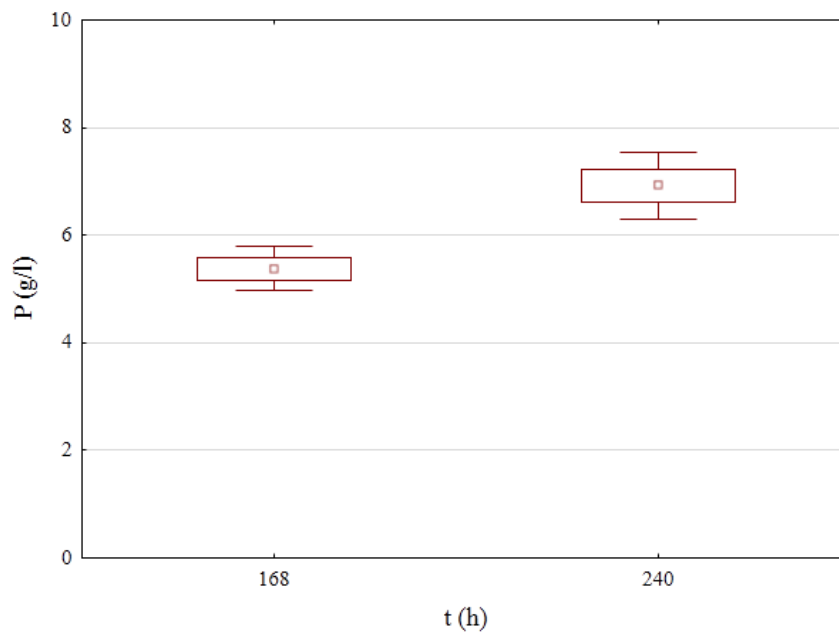
Slika 5.18. predstavlja grafički prikaz rezultata statističke analize uticaja selekcije proizvodnog soja iz grupe izolata sa listova paprika na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom za različito vreme trajanja kultivacije. Rezultati prikazani na pomenutoj slici ukazuju na to da prilikom kultivacije različitih proizvodnih sojeva roda *Xanthomonas* izolovanih sa listova paprika na medijumu sa sirovim glicerolom, ne uzimajući u obzir vreme kultivacije, dolazi do produkcije ksantana u prilično ujednačenim koncentracijama. Dobijeni rezultati sugerišu da proizvodni soj PAP LIST 4, među ispitivanim izolatima roda *Xanthomonas*, produkuje ksantan u najvećoj količini. Na osnovu grafički predstavljenih rezultata je evidentno da je najmanji sadržaj ksantana ostvaren prilikom kultivacije soja PAP LIST 5. Takođe, može se primetiti da se sadržaj ksantana u proizvodnom medijumu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije izolata sa listova paprika u okviru ovog ispitivanja kretao od oko 5 g/l do oko 8 g/l.



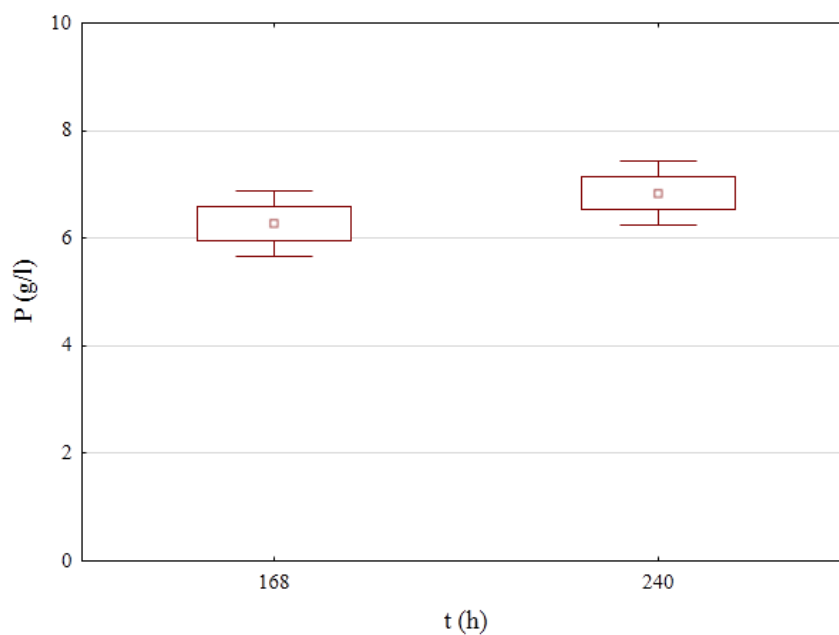
Slika 5.18. Uticaj selekcije proizvodnog soja na sadržaj ksantana (P) u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom za različito vreme trajanja kultivacije: izolati sa listova paprika

Rezultati statističke analize uticaja selekcije vremena trajanja kultivacije izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom, bez obzira na primenjeni soj iz posmatrane grupe izolata, prikazani su na slici 5.19. Grafički predstavljeni rezultati ukazuju da je prilikom kultivacije sojeva iz ove grupe izolata roda *Xanthomonas* na medijumu sa sirovim glicerolom veći sadržaj ksantana ostvaren kada je biosinteza trajala 240 h. Dobijeni rezultati sugerišu da je izolatima sa listova biljaka iz porodice kupusnjača prilikom kultivacije na medijumu sa sirovim glicerolom potrebno duže vreme za biosintezu ksantana u većoj koncentraciji.

Na slici 5.20. prikazani su rezultati statističke analize uticaja selekcije vremena trajanja kultivacije izolata sa listova paprika na sadržaj ksantana u proizvodnom medijumu sa sirovim glicerolom, bez obzira na primenjeni soj iz posmatrane grupe izolata. Evidentno je da ne postoji velika razlika u sadržaju biosintetisanog ksantana za obe vrednosti ispitivanog vremena kultivacije, odnosno da količina ksantana koja je produkovana tokom 240 h nije značajno veća od količine ksantana koja je biosintetisana tokom 168 h. U poređenju sa prethodno diskutovanim rezultatima može se zaključiti da se izolati sa listova paprika adaptiraju na sirovi glicerol u za kraće vreme.



Slika 5.19. Uticaj vremena trajanja kultivacije na sadržaj ksantana (P) u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom: izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača



Slika 5.20. Uticaj vremena trajanja kultivacije na sadržaj ksantana (P) u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom: izolati sa listova paprika

U tabeli 5.16. prikazani su rezultati Dankanovog testa višestrukih poređenja za sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije ispitivanih sojeva roda *Xanthomonas* u trajanju od 168 h i 240 h.



Tabela 5.16. Dankanov test višestrukih poređenja: sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije sojeva *Xanthomonas* spp. u trajanju od 168 h i 240 h

Izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača			Izolati sa listova paprike		
Proizvodni soj	t (h)	P (g/l)*	Proizvodni soj	t (h)	P (g/l)*
Xp 3-1	168	4,28±1,34 <sup>a</sup>	PAP LIST 3	168	5,16±1,83 <sup>a</sup>
KARFIOL	168	4,52±1,05 <sup>a</sup>	PAP LIST 5	240	5,45±1,01 <sup>a</sup>
12-2	168	4,74±0,37 <sup>a</sup>	PAP LIST 2	240	5,72±0,10 <sup>a</sup>
Mn 7-2	168	5,34±0,07 <sup>ab</sup>	PAP LIST 1	168	5,85±1,21 <sup>ab</sup>
KELJ	168	5,38±0,39 <sup>ab</sup>	PAP LIST 5	168	6,25±0,55 <sup>abc</sup>
KUPUS	168	5,39±0,57 <sup>ab</sup>	PAP LIST 2	168	6,65±0,50 <sup>abc</sup>
ATCC 13951	168	5,41±0,82 <sup>ab</sup>	PAP LIST 4	168	7,44±0,42 <sup>bc</sup>
KELJ	240	5,65±0,25 <sup>abc</sup>	PAP LIST 1	240	7,59±0,82 <sup>c</sup>
Mn 7-2	240	5,74±0,45 <sup>abc</sup>	PAP LIST 3	240	7,59±0,31 <sup>c</sup>
Xp 3-1	240	5,93±1,99 <sup>abc</sup>	PAP LIST 4	240	7,81±0,39 <sup>c</sup>
Xp 7-2	168	6,07±0,72 <sup>abcd</sup>			
Xp 7-2	240	6,40±0,44 <sup>abcde</sup>			
Am	240	6,51±0,13 <sup>abcde</sup>			
Am	168	7,23±1,16 <sup>bcde</sup>			
KUPUS	240	7,36±1,38 <sup>bcde</sup>			
KARFIOL	240	7,82±2,63 <sup>cde</sup>			
12-2	240	8,28±2,10 <sup>de</sup>			
ATCC 13951	240	8,62±1,29 <sup>e</sup>			

*P*-sadržaj biosintetisanog ksantana; *t*-vreme trajanja bioprocesa;

\* Vrednosti u jednoj koloni obeležene istim slovima nalaze se na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja od 95%.

Analizom rezultata prikazanih u tabeli 5.16. može se primetiti da je kultivacija svih ispitivanih izolata roda *Xanthomonas* na medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom u ispitivanim eksperimentalnim uslovima rezultovala produkcijom ksantana i da se sadržaj željenog biopolimera u ovom delu istraživanja kretao od 4,28±1,34 g/l do 8,62±1,29 g/l kada su primenjeni izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača. Kao najproduktivniji soj, iz ove grupe ispitivanih izolata roda *Xanthomonas*, pokazao se ATCC 13951 koji je prilikom izvođenja kultivacije u trajanju od 240 h proizveo ksantan u koncentraciji od 8,62±1,29 g/l. Prema dostupnim literaturnim podacima, ova vrednost je u saglasnosti sa sadržajem ksantana produkovanog primenom istog soja na medijumu sa sirovim glicerolom (15 g/l) gde je za vreme trajanja kultivacije od 168 h biosintetisano od 6,77 g/l do 7,22g/l ksantana (Rončević i sar., 2020a). Sadržaj biosintetisanog ksantana koji je ostvaren u ovoj fazi istraživanja u saglasnosti je i sa rezultatima brazilskih naučnika, koji su u svom istraživanju prilikom kultivacije soja *X. campestris mangiferaeindicae* 2103 na medijumu sa sirovim glicerolom (20 g/l) dobili ksantan u koncentraciji od 7,29 g/l (Brandão i sar., 2014). Rezultati prikazani u tabeli 5.16. ukazuju da ne postoji statistički značajna razlika u količini produkovanog ksantana prilikom kultivacije sojeva ATCC 13951, 12-2, KARFIOL, KUPUS, Am i Xp u trajanju od 240 h i soja

Am u trajanju od 168 h, što pokazuju *p*-vrednosti veće od 0,05. Najmanji sadržaj ksantana od  $4,28 \pm 1,34$  g/l ostvaren je prilikom kultivacije soja Xp 3-1 u trajanju od 168 h. Dobijeni rezultati sugerišu da su vrednosti sadržaja biosintetisanog ksantana ostvarene prilikom kultivacije ispitivanih sojeva iz navedene grupe izolata roda *Xanthomonas* u trajanju od 168 h niske i da se, izuzev prilikom kultivacije soja Am, nalaze na istom nivou značajnosti, što potvrđuju *p*-vrednosti veće od 0,05.

Prilikom kultivacije izolata sa listova paprika na medijumu sa sirovim glicerolom, u primenjenim eksperimentalnim uslovima, a u trajanju od 168 h i 240 h, sadržaj biosintetisanog ksantana kretao se od  $5,16 \pm 1,83$  g/l do  $7,81 \pm 0,39$  g/l (tabela 5.16). Kao najproduktivniji soj iz ove grupe izolata pokazao se soj PAP LIST 4 koji je prilikom kultivacije na medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom u trajanju od 240 h proizveo ksantan u koncentraciji od  $7,81 \pm 0,39$  g/l. Rezultati dati u tabeli 5.16. pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika u sadržaju ksantana produkovanog prilikom kultivacije sojeva PAP LIST 4 i sojeva PAP LIST 3 i PAP LIST 1 u trajanju od 240 h i sojeva PAP LIST 4, PAP LIST 2, PAP LIST 1 i PAP LIST 5 u trajanju od 168 h, što potvrđuju *p*-vrednosti veće od 0,05. Sa druge strane, najmanji sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu koji iznosi  $5,16 \pm 1,83$  g/l ostvaren je prilikom kultivacije soja PAP LIST 3 u trajanju od 168 h. Ova vrednost sadržaja ksantana nalazi se na istom nivou značajnosti kao i vrednosti količine ksantana dobijene prilikom kultivacije sojeva PAP LIST 5 i PAP LIST 2 u trajanju od 240 h i sojeva PAP LIST 5, PAP LIST 1 i PAP LIST 2 u trajanju od 168 h, što potvrđuju *p*-vrednosti veće od 0,05.

Na osnovu svih rezultata prikazanih u tabeli 5.16. može se zaključiti da izolati sa listova paprika za 168 h proizvode više ksantana nego što izolati sa listova biljaka kupusnjača proizvode za 240 h. Drugim rečima, izolatima sa listova biljaka iz porodice kupusnjača potrebno je duže vreme za biosintezu veće količine ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom nego što je to slučaj kod izolata sa listova paprika. Do ove razlike među ispitivanim izolatima verovatno dolazi usled činjenice da različite vrste roda *Xanthomonas* poseduju različite metaboličke puteve i cikluse (Saddler i Bradbury, 2004), te je različitim sojevima potrebno različito vreme da se adaptiraju na sirovi glicerol koji u medijumu za biosintezu predstavlja jedini izvor ugljenika (Crosse i sar., 2020).

Konverzija supstrata u proizvod predstavlja značajan pokazatelj uspešnosti izvođenja bioprocesa. Stoga su po završetku kultivacije ispitivanih sojeva na medijumu sa sirovim glicerolom u trajanju od 168 h i 240 h izračunate vrednosti stepena konverzije izvora ugljenika u ksantan. Dobijeni rezultati dati su u tabeli 5.17.

Rezultati prikazani u tabeli 5.17. ukazuju na to da se konverzija izvora ugljenika u željeni metabolit, u primenjenim eksperimentalnim uslovima, kretala od  $21,41 \pm 6,72\%$  do  $43,11 \pm 6,44\%$  za izolate sa listova biljaka iz porodice kupusnjača. Dobijene vrednosti veće su od vrednosti stepena konverzije komercijalnog glicerola u ksantan ( $8,40\text{--}37,20\%$ ) dobijenih u okviru ranijih istraživanja prilikom kultivacije sojeva roda *Xanthomonas* izolovanih sa listova biljaka iz porodice kupusnjača, na medijumu sa komercijalnim glicerolom koncentracije 20 g/l, a u trajanju od 120 h (Bajić i sar., 2015b). Soj ATCC 13951 se izdvaja u ovoj grupi izolata kao soj koji, u primenjenim eksperimentalnim uslovima, konvertuje sirovi glicerol u ksantan u najvećoj meri za šta je potrebno da se bioproces izvodi u trajanju od 240 h. Soj Xp 3-1 se pokazao kao izolat sa listova biljaka iz porodice kupusnjača koji prilikom kultivacije na medijumu sa sirovim

glicerolom u trajanju od 168 h konvertuje izvor ugljenika u ksantan u najmanjoj meri. Kada su u pitanju izolati sa listova paprika, stepen konverzije sirovog glicerola u ksantan, u primenjenim eksperimentalnim uslovima, kretao se od  $25,79 \pm 9,15\%$  do  $39,07 \pm 1,93\%$ . U poređenju sa rezultatima prethodne grupe izolata, *Xanthomonas* sojevi izolovani sa listova paprika konvertuju sirovi glicerol u ksantan u nešto manjoj meri, za isto vreme trajanja kultivacije. Soj PAP LIST 4 se ističe u ovoj grupi izolata kao soj koji za vreme kultivacije od 240 h, u primenjenim eksperimentalnim uslovima, konvertuje sirovi glicerol u ksantan u najvećoj meri. Posmatranjem rezultata iz tabele 5.17. može se primetiti da soj PAP LIST 3 prilikom kultivacije na medijumu sa sirovim glicerolom u trajanju od 168 h konvertuje izvor ugljenika u ksantan u najmanjoj meri.

Tabela 5.17. Konverzija izvora ugljenika u ksantan u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije sojeva *Xanthomonas* spp. u trajanju od 168 h i 240 h

Izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača			Izolati listova sa paprike		
Proizvodni soj	t (h)	$K_{p/S}$ (%)	Proizvodni soj	t (h)	$K_{p/S}$ (%)
Xp 3-1	168	$21,41 \pm 6,72$	PAP LIST 3	168	$25,79 \pm 9,15$
KARFIOL	168	$22,60 \pm 5,25$	PAP LIST 5	240	$27,25 \pm 5,06$
12-2	168	$23,70 \pm 1,86$	PAP LIST 2	240	$28,61 \pm 0,50$
Mn 7-2	168	$26,70 \pm 0,35$	PAP LIST 1	168	$29,23 \pm 6,07$
KELJ	168	$26,90 \pm 1,97$	PAP LIST 5	168	$31,27 \pm 2,75$
KUPUS	168	$26,96 \pm 2,84$	PAP LIST 2	168	$33,25 \pm 2,48$
ATCC 13951	168	$27,05 \pm 4,10$	PAP LIST 4	168	$37,19 \pm 2,12$
KELJ	240	$28,23 \pm 1,23$	PAP LIST 1	240	$37,96 \pm 4,10$
Mn 7-2	240	$28,68 \pm 2,24$	PAP LIST 3	240	$37,97 \pm 1,57$
Xp 3-1	240	$29,65 \pm 9,97$	PAP LIST 4	240	$39,07 \pm 1,93$
Xp 7-2	168	$30,37 \pm 3,61$			
Xp 7-2	240	$31,99 \pm 2,18$			
Am	240	$32,55 \pm 0,65$			
Am	168	$36,17 \pm 5,80$			
KUPUS	240	$36,82 \pm 6,90$			
KARFIOL	240	$39,08 \pm 13,16$			
12-2	240	$41,38 \pm 10,52$			
ATCC 13951	240	$43,11 \pm 6,44$			

$K_{p/S}$ -stepen konverzije izvora ugljenika u ksantan; t-vreme trajanja bioprocesa.

Na osnovu prethodno diskutovanih rezultata može se zaključiti da vrednost stepena konverzije sirovog glicerola u ksantan, u primenjenim eksperimentalnim uslovima, zavisi od vremena trajanja kultivacije, ali i od odabira proizvodnog soja. Do razlike u stepenu konverzije sirovog glicerola u ksantan najverovatnije dolazi usled razlika u fiziološkim karakteristikama među primenjenim sojevima roda *Xanthomonas* (Nitschke i Thomas, 1995) i činjenice da je različitim sojevima potrebno različito vreme da se adaptiraju prisustvo sirovog glicerola u medijumu i konvertuju ga u ksantan (Crosse i sar., 2020). Posmatrajući rezultate predstavljene u tabeli 5.17.

može se konstatovati da nijedan izolat roda *Xanthomonas* u ovoj fazi istraživanja nije konvertovao izvor ugljenika u ksantan u vrednosti većoj od 50%. Dobijeni rezultati sugerisu da je neophodno izvršiti optimizaciju biosinteze ksantana, pre svega u pogledu sastava kultivacionih medijuma koji se koriste u svim segmentima proizvodnog postupka, a sve u cilju postizanja visokih prinosa i uspešnog izvođenja biotehnoške proizvodnje ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom kao jedinim izvorom ugljenika.

### 5.3.2. Uticaj selekcije proizvodnog soja i vremena kultivacije na kvalitet ksantana biosintetisanog na medijumu sa sirovim glicerolom

Nakon završene kultivacije ksantan je izdvojen iz proizvodnog medijuma (poglavlje 4.5), a zatim je izvršena njegova kvalitativna karakterizacija. Kao indikator kvaliteta ksantana, biosintetisanog u primenjenim eksperimentalnim uslovima, određivana je srednja vrednost molekulskih masa (poglavlje 4.6.3). Dvofaktorijalna analiza varijanse uticaja selekcije različitih proizvodnih sojeva i vremena trajanja kultivacije na molekulsku masu ksantana biosintetisanih na medijumu sa sirovim glicerolom izvršena je sa ciljem utvrđivanja statističke značajnosti uticaja variranih parametara, kao i njihove kombinacije na odabrani pokazatelj kvaliteta biopolimera. Rezultati sprovedene statističke analize prikazani su u tabeli 5.18.

Tabela 5.18. Dvofaktorijalna analiza varijanse uticaja različitih proizvodnih sojeva i vremena trajanja kultivacije na molekulsku masu ksantana biosintetisanih na medijumu sa sirovim glicerolom

<i>Xanthomonas</i> sojevi	Izvor varijabiliteta	SS	DF	MS	F-odnos	<i>p</i> -vrednost
<b>Izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača</b>	Proizvodni soj	$4,740 \cdot 10^{10}$	8	$5,925 \cdot 10^9$	5,501	0,000144
	Vreme kultivacije	$1,976 \cdot 10^{10}$	1	$1,976 \cdot 10^{10}$	18,343	0,000131
	Proizvodni soj i vreme kultivacije	$4,453 \cdot 10^{10}$	8	$5,566 \cdot 10^9$	5,167	0,000246
	Greška	$3,878 \cdot 10^{10}$	36	$1,077 \cdot 10^9$	-	-
<b>Izolati sa listova paprike</b>	Proizvodni soj	$3,173 \cdot 10^{10}$	4	$7,932 \cdot 10^9$	10,672	0,000004
	Vreme kultivacije	$4,964 \cdot 10^{10}$	1	$4,964 \cdot 10^{10}$	104,393	0,000000
	Proizvodni soj i vreme kultivacije	$1,992 \cdot 10^{10}$	4	$4,981 \cdot 10^9$	10,475	0,000096
	Greška	$9,511 \cdot 10^9$	20	$4,755 \cdot 10^8$	-	-

*SS* – suma kvadrata; *DF* – stepen slobode; *MS* – srednja vrednost kvadrata.

Rezultati dvofaktorijalne analize varijanse dati u tabeli 5.18. pokazuju da proizvodni soj, vreme trajanja kultivacije, kao i njihova kombinacija imaju statistički značajan uticaj na vrednost molekulske mase ksantana biosintetisanih prilikom kultivacije izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača na medijumu sa sirovim glicerolom, što potvrđuju *p*-vrednosti 0,000144, 0,000131 i 0,000246, redom. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima ranijih istraživanja gde je takođe potvrđeno da molekulska masa ksantana zavisi od primenjenog proizvodnog soja i vremena kultivacije (Casas i sar., 2000; Moreira i sar., 2001). Srednje vrednosti kvadrata za izolate sa listova biljaka iz porodice kupusnjača prikazane u tabeli 5.18. ukazuju na to da vreme

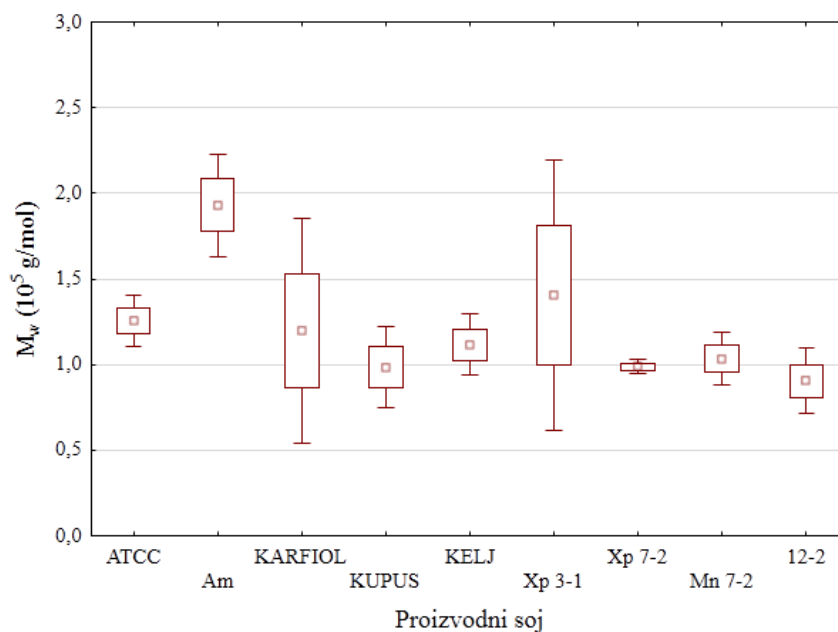
kultivacije ( $1,976 \cdot 10^{10}$ ) ima najznačajniji uticaj na vrednost molekulske mase biosintetisanih ksantana. Proizvodni soj ( $5,925 \cdot 10^9$ ) i vremena kultivacije ( $5,566 \cdot 10^9$ ) dosta manje utiču na kvalitet produkovanog ksantana.

Kada su u pitanju sojevi roda *Xanthomonas* izolovani sa listova paprika, rezultati predstavljeni u tabeli 5.18. ukazuju da se *p*-vrednosti za analizirane parametre ne razlikuju mnogo od prethodno analizirane grupe izolata i da proizvodni soj, vreme kultivacije i njihova kombinacija značajno utiču na srednju vrednost molekulske mase ksantana produkovanih u primenjenim eksperimentalnim uslovima. Prema srednjim vrednostima kvadrata uočava se da vreme kultivacije ( $4,964 \cdot 10^{10}$ ) i kod ovih izolata ima najznačajniji uticaj na vrednost molekulske mase biosintetisanih ksantana. Proizvodni soj ( $7,932 \cdot 10^9$ ) u manjoj meri utiče na ovu grupu rezultata, dok kombinacija proizvodnog soja i vremena kultivacije ( $4,981 \cdot 10^9$ ) ima najmanji uticaj na kvalitet ksantana produkovanih u primenjenim eksperimentalnim uslovima. I ovi rezultati, kao i prethodno diskutovani, ukazuju na to da molekulska masa ksantana zavisi od primenjenog proizvodnog soja i vremena kultivacije, što je u saglasnosti sa rezultatima ranijih istraživanja (Casas i sar., 2000; Moreira i sar., 2001).

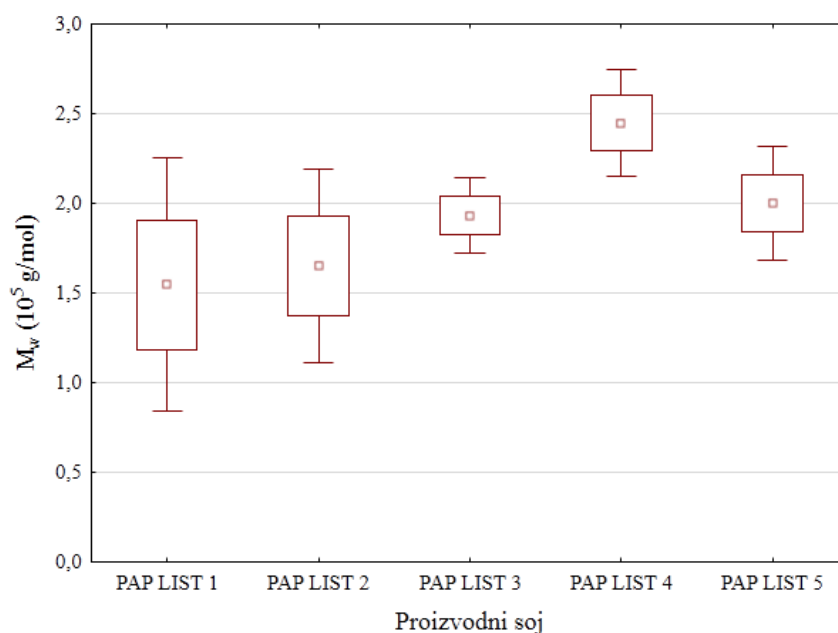
Rezultati statističke analize uticaja selekcije proizvodnog soja na molekulsku masu ksantana biosintetisanih na medijumu sa sirovim glicerolom za različito vreme trajanja kultivacije primenom ispitivanih izolata roda *Xanthomonas* prikazani su i grafički na slikama 5.21-5.24, a kako bi se odabrala kombinacija proizvodnog soja i vremena kultivacije pri kojoj se proizvodi ksantan najveće molekulske mase na medijumu sa sirovim glicerolom, eksperimentalni podaci su analizirani i primenom Dankanovog testa višestrukih poređenja čiji su rezultati dati u tabeli 5.19.

Na slici 5.21. predstavljeni su rezultati statističke analize uticaja selekcije proizvodnog soja iz grupe izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača na molekulsku masu ksantana biosintetisanih na medijumu sa sirovim glicerolom za različito vreme trajanja kultivacije. Prema prikazanim rezultatima, kultivacija soja Am na medijumu sa sirovim glicerolom rezultuje biosintezom ksantana najveće molekulske mase, bez obzira na vreme trajanja bioprocasa. Rezultati prikazani na slici 5.21. sugerišu i da referentni soj, kao i izolati KARFIOL i Xp 3-1 takođe proizvode ksantan velike molekulske mase. Prema istim rezultatima, prilikom kultivacije soja 12-2 na medijumu sa sirovim glicerolom proizvodi se ksantan najmanje molekulske mase. Generalno gledano, rezultatima prikazani na slici 5.21. ukazuju da se srednja vrednost molekulske mase ksantana biosintetisanih u ispitivanim eksperimentalnim uslovima kretala od oko  $0,5 \cdot 10^5$  g/mol do oko  $2,3 \cdot 10^5$  g/mol.

Slika 5.22. ilustruje rezultate statističke analize uticaja proizvodnog soja iz grupe izolata sa listova paprika na molekulsku masu ksantana biosintetisanih na medijumu sa sirovim glicerolom za različito vreme trajanja kultivacije. Dobijeni rezultati sugerišu da je ksantan najveće molekulske mase biosintetisan prilikom kultivacije soja PAP LIST 4, bez obzira na vreme trajanja bioprocasa. Pored toga, može se primetiti da među ksantanima koje su biosintetisali ostali proizvodni sojevi nema značajne razlike u kvalitetu, a evidentno je i da je soj PAP LIST 1 proizveo ksantan najmanje molekulske mase u primenjenim eksperimentalnim uslovima. Srednja vrednost molekulske mase ksantana biosintetisanih prilikom kultivacije izolata sa listova paprika na medijumu sa sirovim glicerolom kretala od oko  $0,5 \cdot 10^5$  g/mol do oko  $2,8 \cdot 10^5$  g/mol.



Slika 5.21. Uticaj selekcije proizvodnog soja na molekulsku masu ksantana ( $M_w$ ) biosintetisanih na medijumu sa sirovim glicerolom za različito vreme trajanja kultivacije: izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača

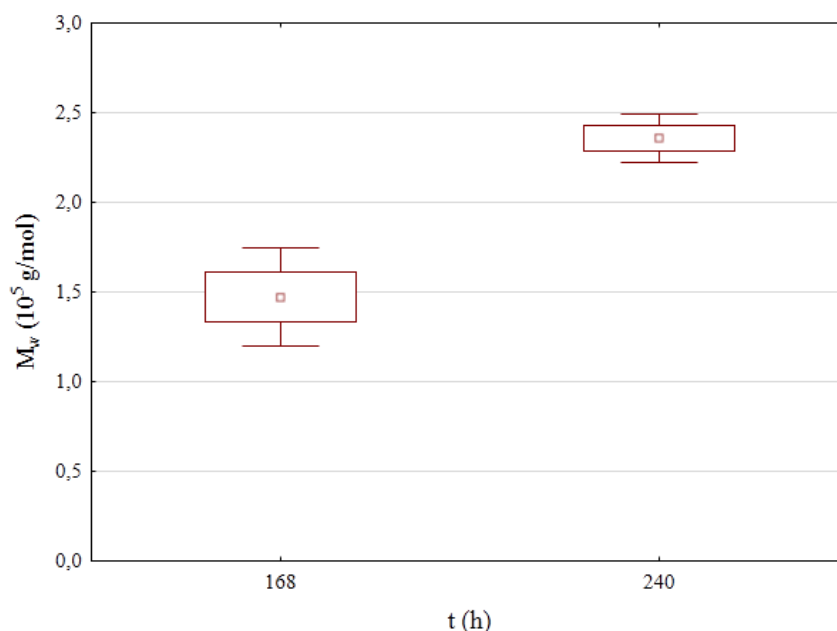


Slika 5.22. Uticaj selekcije proizvodnog soja na molekulsku masu ksantana ( $M_w$ ) biosintetisanih na medijumu sa sirovim glicerolom za različito vreme trajanja kultivacije: izolati sa listova paprika

Poređenjem vrednosti prosečnih molekulskih masa ksantana dobijenih prilikom kultivacije izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača (slika 5.21) i listova paprika (slika 5.22) se uočava da izolati sa listova paprika na medijumu sa sirovim glicerolom produkuju ksantane veće

molekulske mase od izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača u primenjenim eksperimentalnim uslovima.

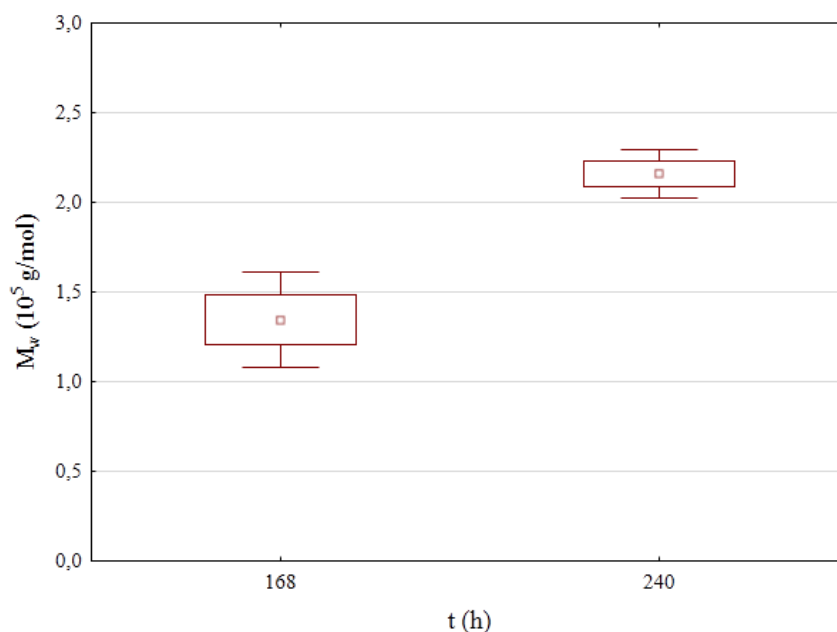
Slika 5.23. predstavlja grafički prikaz rezultata statističke analize uticaja selekcije vremena trajanja kultivacije izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača na sadržaj ksantana u medijumu sa sirovim glicerolom, bez obzira na primenjeni soj iz ove grupe izolata. Dobijeni rezultati ukazuju da postoji statistički značajna razlika u vrednostima prosečne molekulske mase ksantana dobijenih prilikom kultivacije izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača u trajanju od 168 h i 240 h te da je ksantan veće molekulske mase biosintetisan prilikom kultivacije ovih izolata u trajanju od 240 h. Na osnovu navedenih rezultata, kao i rezultata prikazanih na slici 5.19, može se zaključiti da je izolatima sa listova biljaka iz porodice kupusnjača potrebno više vremena da na medijumu sa sirovim glicerolom, u primenjenim eksperimentalnim uslovima, produkuju što više ksantana što boljeg kvaliteta.



Slika 5.23. Uticaj vremena trajanja kultivacije na sadržaj ksantana (P) u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom: izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača

Na slici 5.24. prikazani su rezultati statističke analize uticaja selekcije vremena trajanja kultivacije izolata sa listova paprika na sadržaj ksantana u medijumu sa sirovim glicerolom, bez obzira na primenjeni soj iz ove grupe izolata. Prema dobijenim rezultatima postoji značajna razlika u vrednostima prosečne molekulske mase ksantana dobijenih prilikom kultivacije izolata sa listova paprika u trajanju od 168 h i 240 h. Ksantan veće molekulske mase produkuje se nakon kultivacije u trajanju od 240. Ukoliko se uporede ovi rezultati sa rezultatima prikazanim na slici 5.20. gde se jasno vidi da produženje vremena izvođenja bioprocasa ne utiče na povećanje količine produkovanog ksantana, može se pretpostaviti da je pozitivan uticaj povećanja vremena trajanja kultivacije na kvalitet biopolimera posledica povećanja srednjih vrednosti molekularnih

masa zbog umrežavanja makromolekula. Ovakav uticaj vremena trajanja kultivacije na molekulska masu ksantana dokazan je tokom ranijih istraživanja (Rončević, 2016).



Slika 5.24. Uticaj vremena trajanja kultivacije na sadržaj ksantana (P) u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom: izolati sa listova paprika

Rezultati Dankanovog testa višestrukih poređenja prikazani u tabeli 5.19. ukazuju na to da se prosečna molekulska masa biosintetisanih ksantana kretala od  $0,51 \pm 0,08 \cdot 10^5$  g/mol do  $2,29 \pm 0,26 \cdot 10^5$  g/mol kada su primenjeni izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača i od  $0,76 \pm 0,27 \cdot 10^5$  g/mol do  $2,75 \pm 0,07 \cdot 10^5$  g/mol kada su korišćeni izolati sa listova paprika. Dobijeni rezultati se veoma dobro podudaraju sa prethodno objavljenim rezultatima gde je prilikom kultivacije referentnog soja *X. campestris* ATCC 13951 u trajanju od 168 h na medijumu sa sirovim glicerolom (15 g/l) biosintetisan ksantan molekulske mase od  $2,81 \cdot 10^5$  g/mol do  $2,85 \cdot 10^5$  g/mol (Rončević i sar., 2020a). Kao soj koji produkuje ksantan najboljeg kvaliteta iz grupe izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača pokazao se Xp 3-1 koji je pri kultivaciji na medijumu sa sirovim glicerolom u trajanju od 240 h biosintetisao ksantan molekulske mase od  $2,29 \pm 0,26 \cdot 10^5$  g/mol. Nešto manja vrednost molekulske mase ksantana ostvarena je prilikom kultivacije soja Am u trajanju od 240 h i 168 h. Ovi rezultati sugerišu da se kvalitet ksantana produkovanog prilikom kultivacije soja Xp 3-1 u trajanju od 240 h ne razlikuje značajno od kvaliteta ksantana koji soj Am produkuje za 168 h i 240 h, što potvrđuju *p*-vrednosti veće od 0,05. Vrednosti molekulske mase ksantana dobijenih prilikom kultivacije sojeva Xp 3-1, 12-2, KUPUS, KARFIOL, Xp 7-2, KELJ, Mn 7-2 u trajanju od 168 h, kao i vrednosti molekulske mase ksantana dobijenih prilikom kultivacije sojeva 12-2, Mn 7-2 i Xp 7-2 u trajanju od 240 h predstavljaju najmanje vrednosti molekulske mase ksantana ostvarene u primenjenim eksperimentalnim uslovima. Ove vrednosti nalaze se na istom nivou značajnosti što potvrđuju *p*-vrednosti veće od 0,05. Iz dobijenih rezultata je evidentno da kvalitet ksantana



značajno raste prilikom povećanja vremena kultivacije izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača na medijumu sa sirovim glicerolom.

Tabela 5.19. Dankanov test višestrukih poređenja: molekulska masa ksantana koje na medijumu sa sirovim glicerolom biosintetišu sojevi *Xanthomonas* spp. za vreme trajanja kultivacije od 168 h i 240 h

Izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača			Izolati sa listova paprike		
Proizvodni soj	t (h)	$M_w$ ( $10^5$ g/mol)*	Proizvodni soj	t (h)	$M_w$ ( $10^5$ g/mol)*
Xp 3-1	168	0,51±0,08 <sup>a</sup>	PAP LIST 1	168	0,76±0,27 <sup>a</sup>
12-2	168	0,71±0,03 <sup>ab</sup>	PAP LIST 2	168	1,05±0,22 <sup>a</sup>
KUPUS	168	0,77±0,13 <sup>ab</sup>	PAP LIST 5	168	1,70±0,03 <sup>b</sup>
KARFIOL	168	0,79±0,05 <sup>ab</sup>	PAP LIST 3	168	2,07±0,32 <sup>c</sup>
Mn 7-2	240	1,15±0,17 <sup>ab</sup>	PAP LIST 4	168	2,14±0,25 <sup>c</sup>
Xp 7-2	240	0,96±0,04 <sup>ab</sup>	PAP LIST 3	240	2,16±0,11 <sup>c</sup>
Xp 7-2	168	1,02±0,06 <sup>ab</sup>	PAP LIST 2	240	2,25±0,13 <sup>c</sup>
KELJ	168	1,09±0,17 <sup>abc</sup>	PAP LIST 5	240	2,30±0,34 <sup>c</sup>
12-2	240	1,10±0,15 <sup>abc</sup>	PAP LIST 1	240	2,33±0,19 <sup>c</sup>
KELJ	240	1,15±0,31 <sup>abc</sup>	PAP LIST 4	240	2,75±0,07 <sup>d</sup>
Mn 7-2	168	1,15±0,17 <sup>abc</sup>			
ATCC 13951	168	1,16±0,16 <sup>bc</sup>			
KUPUS	240	1,20±0,24 <sup>bc</sup>			
ATCC 13951	240	1,35±0,19 <sup>bcd</sup>			
KARFIOL	240	1,60±1,08 <sup>cde</sup>			
Am	168	1,90±0,58 <sup>def</sup>			
Am	240	1,96±0,58 <sup>ef</sup>			
Xp 3-1	240	2,29±0,26 <sup>f</sup>			

*M<sub>w</sub>*-srednja molekulska masa ksantana; *t*-vreme trajanja bioprocesa.

Kao soj koji produkuje ksantan najveće molekulske mase iz grupe izolata sa listova paprika izdvojio se PAP LIST 4 koji je prilikom kultivacije na medijumu sa sirovim glicerolom u trajanju od 240 h biosintetisao ksantan prosečne molekulske mase od  $2,75 \pm 0,07 \cdot 10^5$  g/mol. Sojevi PAP LIST 1 i PAP LIST 2 su tokom kultivacije na istom medijumu u trajanju od 168 h produkovali ksantan najmanje molekulske mase. Ove vrednosti nalaze se na istom nivou značajnosti, što potvrđuje *p*-vrednost od 0,081183. Međutim, ukoliko se vreme kultivacije poveća sa 168 h na 240 h, može se primetiti da dolazi do značajnog porasta molekulske mase ksantana dobijenog primenom pomenutih sojeva. Poređenjem dobijenih rezultata za obe grupe ispitivanih izolata može se zaključiti da prilikom kultivacije izolata sa listova paprika na medijumu sa sirovim glicerolom, u primenjenim eksperimentalnim uslovima, dolazi do produkcije ksantana veće molekulske mase u odnosu na izolate sa listova biljaka iz porodice kupusnjača za isto vreme trajanja kultivacije.

Posmatranjem rezultata dobijenih u ovoj fazi istraživanja može se zaključiti da je i sojevima izolovanim sa listova biljaka iz porodice kupusnjača i sojevima izolovanim sa listova paprika, prilikom kultivacije na medijumu sa sirovim glicerolom u primenjenim eksperimentalnim uslovima, potrebno više vremena za biosintezu ksantana najveće molekulske mase, odnosno, najboljeg kvaliteta. Ovaj zaključak može se opravdati činjenicom da je pojedinim sojevima roda *Xanthomonas* potrebno više vremena da se adaptiraju na medijum sa glicerolom i samim tim proizvode ksantan (Crosse i sar., 2020), kao i eksperimentalno dokazanom tvrdnjom da tokom trajanja kultivacije dolazi do umrežavanja molekula ksantana čak i kada je biosinteza stopirana (Rončević, 2016).

### **5.3.3. Odabir proizvodnog soja za biosintezu ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom**

Rezultati prethodno sprovedene faze istraživanja, koja je za cilj imala skrining mogućnosti biosinteze ksantana primenom sojeva *Xanthomonas* spp. na polusintetičkim medijumima sa različitim izvorima ugljenika (poglavlje 5.1), ukazuju da svi ispitivani lokalni izolati poseduju sposobnost produkcije ksantana na medijumu sa komercijalnim glicerolom. Proizvodni sojevi koji su se u primenjenim eksperimentalnim uslovima pokazali kao najproduktivniji su KUPUS iz grupe izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača, kao i PAP LIST 4 iz grupe izolata sa listova paprika (tabele 5.3. i 8.4). Pored toga, pomenuti sojevi su jedini konvertovali glicerol u ksantan u vrednosti većoj od 50% (tabela 5.4). Prema rezultatima iste faze istraživanja, ksantan najboljeg kvaliteta produkovao je soj KUPUS ispred grupe izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača, dok je kod izolata sa listova paprika to bio soj PAP LIST 3 (tabela 5.6). Rezultati dobijeni prilikom skrininga mogućnosti biosinteze ksantana primenom sojeva *Xanthomonas* spp. na medijumu sa sirovim glicerolom (poglavlja 5.3.1. i 5.3.2) ne razlikuju se mnogo od prethodno diskutovanih rezultata kada su u pitanju izolati sa listova paprika. U primenjenim eksperimentalnim uslovima, ksantan u najvećoj količini biosintetisao je soj PAP LIST 4 (tabela 5.16), dok su ksantan najboljeg kvaliteta produkovali sojevi PAP LIST 3 i PAP LIST 4 (tabela 5.19). Kao najproduktivniji sojevi iz grupe izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača na medijumu sa sirovim glicerolom pokazali su se referentni soj ATCC 13951 i izolati 12-2, KARFIOL, KUPUS, Am i Xp 7-2 (tabela 5.16), dok su ksantan najboljeg kvaliteta biosintetisali sojevi Xp 3-1, Am i KARFIOL (tabela 5.19). Uzimajući u obzir sve navedeno može se zaključiti da se nijedan od pomenutih sojeva ne izdvaja značajno od ostalih. Kako bi se između navedenih sojeva odabrao onaj koji će se koristiti u nastavku istraživanja za unapređenje ispitivanog biotehnološkog procesa, u ovom delu istraživanja izvršeno je poređenje uspešnosti izvođenja bioprocesa u uvećanim razmerama primenom proizvodnih sojeva koji su se u prethodno sprovedenim ogledima pokazali kao najpogodniji u pogledu produktivnosti, ali i biosinteze ksantana najboljeg kvaliteta. Stoga je u ovoj fazi istraživanja biosinteza ksantana vršena referentnim sojem ATCC 13951, kao i izolatima KUPUS, KARFIOL, PAP LIST 3 i PAP LIST 4 u trajanju od 168 h (Zahović i sar., 2019; Rončević i sar., 2020b; Zahović i Trivunović, 2021). S obzirom da su se ispitivani proizvodni sojevi ranije pokazali kao sojevi koji proizvode ksantan podjednako dobrog kvaliteta, u ovom delu istraživanja uspešnost bioprocesa procenjena je na osnovu količine produkovanog ksantana, stepena konverzije izvora ugljenika u ksantan, kao i stepena konverzije važnih nutrijenata. Mogućnost biosinteze ksantana potvrđena je

na osnovu promene reologije medijuma, a vršeno je i merenje vrednosti pH i sadržaja TDS (poglavljje 4.6.2).

Kako bi se utvrdilo da li je u primenjenim eksperimentalnim uslovima došlo do produkcije ksantana određena su reološka svojstva medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom (poglavljje 4.6.2) dobijenih po završetku kultivacije ispitivanih proizvodnih sojeva. Dobijene vrednosti reoloških parametara prikazane su u tabeli 5.20.

Vrednosti indeksa toka medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom analiziranih u ovim ogleđima u saglasnosti su sa vrednostima indeksa toka (0,5170-0,8355) iz prethodnog skriniga na medijumu sa istim izvorom ugljenika (tabela 5.14) i kretale su se u intervalu od 0,1706 do 0,6156 (tabela 5.20). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su proizvodni medijumi po završetku kultivacije odabranih sojeva u primenjenim eksperimentalnim uslovima posedovali pseudoplastične karakteristike što je siguran pokazatelj produkcije ksantana. Vrednosti faktora konzistencije medijuma dobijenog po završetku kultivacije odabranih sojeva *Xanthomonas* spp. na medijumu sa sirovim glicerolom u primenjenim eksperimentalnim uslovima kretale su se od 0,1742 Pa·s<sup>n</sup> do 1,3618 Pa·s<sup>n</sup>. Faktor konzistencije proporcionalan je viskozitetu, a različite vrednosti ovog parametra prikazane u tabeli 5.20. ukazuju na razliku u količini i kvalitetu ksantana proizvedenog u primenjenim eksperimentalnim uslovima primenom različitih izolata roda *Xanthomonas* na medijumu sa sirovim glicerolom. Na osnovu vrednosti indeksa toka i faktora konzistencije izračunati su prividni viskoziteti proizvodnih medijuma.

Tabela 5.20. Reološke karakteristike medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije odabranih sojeva *Xanthomonas* spp.

Proizvodni soj	K [Pa·sn]	n [1]	$\eta_a$ [mPa·s]
ATCC 13951	0,1742	0,6156	29,40±3,34
KUPUS	1,2005	0,1827	27,84±0,21
KARFIOL	1,3618	0,2305	39,35±0,13
PAP LIST 3	0,9272	0,1706	17,08±0,48
PAP LIST 4	0,8564	0,2824	24,36±1,54

*K* – faktor konzistencije; *n* – indeks toka;  $\eta_a$  – prividni viskozitet.

Vrednosti prividnog viskoziteta medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom izračunate nakon kultivacije odabranih sojeva roda *Xanthomonas* kretale su se od 17,08±0,48 mPa·s do 39,35±0,13 mPa·s (tabela 5.20). Ove vrednosti su veće u poređenju sa rezultatima prethodno izvedene biosinteze ksantana primenom istih proizvodnih sojeva u manjim razmerama (poglavljje 5.3.1) kada su za dobijene medijume izračunati viskoziteti bili u intervalu od 4,98±1,48 mPa·s do 10,41±2,86 mPa·s (tabela 5.14). Rezultati prikazani u tabeli 5.20. sugerišu da se prilikom kultivacije ispitivanih sojeva na medijumu sa sirovim glicerolom dobija proizvodni medijum najvećeg prividnog viskoziteta kada se kao proizvodni soj primeni KARFIOL, dok se medijum najmanjeg prividnog viskoziteta dobija kada se primeni soj PAP LIST 3.

Po završetku kultivacije odabranih izolata vršeno je merenje vrednosti pH dobijenih medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom, a dobijene vrednosti date su u tabeli 8.9. (Prilog 1).

Vrednosti pH medijuma sa sirovim glicerolom dobijenih nakon biosinteze ksantana kretale su se od  $6,91 \pm 0,02$  do  $7,37 \pm 0,07$ . Ove vrednosti se ne razlikuju mnogo od vrednosti pH medijuma sa sirovim glicerolom dobijenih prilikom biosinteze ksantana u okviru ranijeg ispitivanja (poglavlje 5.3.1) gde su se izmerene vrednosti istog parametra nalazile u opsegu od  $6,39 \pm 0,03$  do  $7,29 \pm 0,04$  (tabela 8.7, Prilog 1). Dobijeni rezultati pokazuju da ne dolazi do značajnog opadanja vrednosti pH medijuma te da je vrednost pH medijuma za biosintezu u svim ispitivanim uzorcima bila iznad kritične vrednosti (5,50). Pored toga, može se primetiti da kod određenih izolata dolazi do neznatnog porasta vrednosti pH medijuma prilikom biosinteze ksantana, što je u saglasnosti sa rezultatima istraživanja gde se vrednost pH kultivacionog medijuma dobijenog nakon uspešno izvedenog bioprocasa kretala u opsegu od 7,0 do 10,0 (Psomas i sar., 2007).

Po završetku kultivacije odabranih proizvodnih sojeva na medijumu sa sirovim glicerolom izvršeno je merenje sadržaja TDS, a dobijene vrednosti date su u tabeli 8.9. (Prilog 1). Vrednosti sadržaja TDS u medijumima sa sirovim glicerolom, izmerene nakon kultivacije odabranih sojeva u uvećanim razmerama, kretale su se od  $2,91 \pm 0,03$  g/l do  $3,16 \pm 0,04$  g/l. Dobijene vrednosti se podudaraju sa vrednostima sadržaja TDS u kultivacionim medijumima dobijenim prilikom biosinteze ksantana u okviru ranijeg ispitivanja (poglavlje 5.3.1) gde su po završetku kultivacije istih proizvodnih sojeva u manjim razmerama izmerene vrednosti sadržaja TDS od  $2,88 \pm 0,03$  do  $3,03 \pm 0,03$  (tabela 8.8, Prilog 1).

Najznačajniji indikator uspešnosti izvedenog bioprocasa predstavlja sadržaj željenog proizvoda. Međutim, pored biosinteze ksantana, konverzija važnih nutrijenata takođe je veoma značajan pokazatelj uspešnosti ovog bioprocasa. Shodno tome, po završetku kultivacije odabranih proizvodnih sojeva određivane su vrednosti svih pokazatelja uspešnosti biosinteze ksantana u primenjenim eksperimentalnim uslovima. Jednofaktorijalna analiza varijanse uticaja odabranih sojeva roda *Xanthomonas* na količinu produkovanog ksantana, stepen konverzije supstrata u željeni proizvod, kao i ukupne konverzije važnih nutrijenata izvršena je sa ciljem utvrđivanja statističke značajnosti uticaja primenjenih proizvodnih sojeva na posmatrane pokazatelje uspešnosti bioprocasa. Rezultati sprovedene statističke analize prikazani su u tabeli 8.10. (Prilog 1), a ukazuju da je odabir proizvodnog soja statistički značajno utiče na uspešnost izvođenja bioprocasa, što potvrđuju *p*-vrednosti niže od 0,05 u svih pet slučajeva. Eksperimentalni rezultati dodatno su obrađeni primenom Dankanovog testa višestrukih poređenja, a dobijeni podaci predstavljeni su u tabeli 5.21.

Tabela 5.21. Pokazatelji uspešnosti biosinteze ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom primenom odabranih sojeva *Xanthomonas* spp.

Proizvodni soj	P (g/l)	$K_{P/S}$ (%)	$K_S$ (%)	$K_N$ (%)	$K_{Puk}$ (%)
ATCC 13951	$6,68 \pm 0,09^b$	$66,46 \pm 0,04^c$	$48,22 \pm 0,60^b$	$30,44 \pm 0,12^d$	$26,09 \pm 0,16^d$
KUPUS	$6,61 \pm 0,39^b$	$33,07 \pm 0,48^b$	$48,75 \pm 0,67^b$	$23,04 \pm 0,37^a$	$19,81 \pm 0,54^b$
KARFIOL	$5,22 \pm 0,21^a$	$20,11 \pm 0,37^a$	$34,44 \pm 0,43^a$	$24,64 \pm 0,35^b$	$19,01 \pm 0,42^a$
PAP LIST 3	$7,22 \pm 0,08^c$	$57,20 \pm 0,16^c$	$57,20 \pm 0,53^c$	$33,07 \pm 0,20^e$	$21,77 \pm 0,18^c$
PAP LIST 4	$8,50 \pm 0,19^d$	$60,38 \pm 0,06^d$	$60,38 \pm 0,45^d$	$27,90 \pm 0,11^c$	$31,03 \pm 0,07^e$

*P*-sadržaj biosintetisanog ksantana;  $K_{P/S}$ -stepen konverzije izvora ugljenika u ksantan;

$K_S$ -stepen konverzije izvora ugljenika;  $K_N$ -stepen konverzije ukupnog azota;  $K_{Puk}$ -stepen konverzije ukupnog fosfora;

\* Vrednosti u jednoj koloni obeležene istim slovima nalaze se na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja od 95%.

Rezultati prikazani u tabeli 5.21. pokazuju da se sadržaj ksantana po završetku kultivacije ispitivanih sojeva na medijumu sa sirovim glicerolom u uvećanim razmerama kretao od  $5,22 \pm 0,21$  g/l do  $8,50 \pm 0,19$  g/l. U poređenju sa rezultatima iz prethodne faze istraživanja gde je biosinteza ksantana vršena kultivacijom istih sojeva na medijumu sa sirovim glicerolom u manjim razmerama (poglavlje 5.3.1), pri čemu je ostvaren sadržaj ksantana od  $4,52 \pm 1,05$  g/l do  $7,44 \pm 0,42$  g/l (tabela 5.16), može se primetiti da rezultati dobijeni prilikom kultivacije u uvećanim razmerama za isto vreme kultivacije ukazuju na bolju produktivnost ispitivanih sojeva. Najveći sadržaj ksantanu medijumu za biosintezu od  $8,50 \pm 0,19$  g/l ostvaren je prilikom kultivacije soja PAP LIST 4. Pomenuti soj se i prilikom biosinteze ksantana u manjim razmerama u okviru prethodne faze istraživanja (poglavlje 5.3.1) pokazao kao najproduktivniji među sojevima iz grupe izolata sa listova paprika i produkovao je ksantan u nešto manjoj koncentraciji. Sadržaj ksantana ostvaren kultivacijom soja PAP LIST 4 u primenjenim eksperimentalnim uslovima značajno je veći u poređenju sa rezultatima ranijih istraživanja brazilskih naučnika gde je prilikom kultivacije soja *X. campestris mangiferaeindicae* 2103 na medijumu sa sirovim glicerolom (20 g/l) u manjim razmerama biosintetisan ksantan u koncentraciji od 7,23 g/l (Brandão i sar., 2014). Posmatrajući rezultate prikazane u tabeli 5.21. može se primetiti da je dosta niži sadržaj ksantana biosintetisan prilikom kultivacije soja PAP LIST 3 ( $7,22 \pm 0,08$  g/l), slično kao u prethodno diskutovanom istraživanju brazilskih naučnika. Lokalni izolat KUPUS i referentni soj ATCC 13951 produkovali su ksantan u koncentracijama koje se statistički značajno ne razlikuju, na šta ukazuje *p*-vrednost od 0,690832. Najmanji sadržaj ksantana od  $5,22 \pm 0,21$  g/l produkovao je soj KARFIOL, što je nešto veća vrednost u poređenju sa vrednošću ( $4,52 \pm 1,05$  g/l) dobijenom prilikom kultivacije istog soja u okviru prethodne faze istraživanja (poglavlje 5.3.1). Ova vrednost se podudara sa rezultatima ranijih istraživanja gde je prilikom kultivacije soja *X. campestris mangiferaeindicae* 2103 na medijumu sa sirovim glicerolom (20 g/l) dobijen ksantan u koncentraciji od 5,36 g/l (Assis i sar., 2014).

Vrednosti stepena konverzije izvora ugljenika u ksantan, ostvarene u ovoj fazi istraživanja primenom sojeva ATCC 13951, KUPUS, KARFIOL, PAP LIST 3 i PAP LIST 4, kretale su se od  $20,11 \pm 0,37\%$  do  $66,46 \pm 0,04\%$ . U okviru prethodne faze istraživanja gde je biosinteza ksantana vršena primenom istih sojeva u manjim razmerama (poglavlje 5.3.1) ostvarene su vrednosti stepena konverzije supstrata u proizvod od  $22,60 \pm 60\%$  do  $37,19 \pm 2,12\%$  (tabela 5.17), što ukazuje na to da se prilikom kultivacije istih sojeva na medijumu identičnog sastava u uvećanim razmerama za isto vreme trajanja kultivacije ostvaruje bolja konverzija sirovog glicerola u ksantan. Najveći stepen konverzije izvora ugljenika u ksantan od  $66,46 \pm 0,04\%$  ostvaren je prilikom kultivacije referentnog soja ATCC 13951. Ukoliko se izvrši poređenje vrednosti stepena konverzije supstrata u proizvod ostvarenog u ovom istraživanju i vrednosti ovog pokazatelja uspešnosti bioprocasa iz prethodno publikovanog istraživanja, gde je prilikom kultivacije istog soja na medijumu sa komercijalnim glicerolom (20 g/l) ostvaren stepen konverzije glicerola u ksantan iznosio 66,22% (Bajić i sar., 2015b), može se zaključiti da primenjeni soj veoma dobro konvertuje glicerol u ksantan. Nešto manji stepen konverzije izvora ugljenika u ksantan ostvaren je prilikom kultivacije soja PAP LIST 4 u primenjenim eksperimentalnim uslovima, dok je najmanji stepen konverzije supstrata u proizvod ostvaren primenom soja KARFIOL. Ovaj soj je ujedno produkovao i najmanju količinu ksantana. Uzimajući u obzir da se u industrijskim uslovima stepen konverzije izvora ugljenika u biopolimer kreće u intervalu od 50% do 85% (Rosalam i England, 2006), može se konstantovati

da je u okviru ovih istraživanja postignuta relativno visoka uspešnost bioprocasa kada je u pitanju kultivacija sojeva ATCC 13951, PAP LIST 3 i PAP LIST 4. Do razlike u stepenu konverzije sirovog glicerola u ksantan među različitim sojevima najverovatnije dolazi usled razlika u fiziološkim karakteristikama među sojevima (Nitschke i Thomas, 1995) i činjenice da različitim sojevima potrebno različito vreme da se adaptiraju na medijum sa glicerolom i biosintetišu ksantan (Crosse i sar., 2020).

Tabelarno prikazani rezultati ukazuju da je sadržaj glicerola u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom redukovano tokom izvođenja bioprocasa pri čemu je ostvaren ukupan stepen konverzije izvora ugljenika od  $34,44 \pm 0,43\%$ , do  $60,38 \pm 0,45\%$  primenom odabranih proizvodnih sojeva (tabela 5.21). Dobijene vrednosti stepena konverzije su u saglasnosti sa rezultatima ranijih istraživanja gde se prilikom kultivacije izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača na medijumu sa glicerolom (20 g/l) ostvareni stepen konverzije glicerola kretao od 40,55% do 68,70% (Bajić i sar., 2015b). Najveća konverzija izvora ugljenika od  $60,38 \pm 0,45\%$  ostvarena je kultivacijom soja PAP LIST 4, što je u saglasnosti sa činjenicom da je ovaj soj u primenjenim eksperimentalnim uslovima proizveo ksantan u najvećoj količini (tabela 5.21). Nešto manji stepen konverzije izvora ugljenika ostvaren je primenom soja PAP LIST 3, dok se vrednosti stepena konverzije izvora ugljenika ostvareni delovanjem sojeva ATCC 13951 i KUPUS nisu međusobno značajno razlikovali, na šta ukazuje *p*-vrednost od 0,264906. Najmanji stepen ukupne konverzije sirovog glicerola od  $34,44 \pm 0,43\%$  ostvaren je prilikom kultivacije soja KARFIOL u primenjenim eksperimentalnim uslovima.

Prema dostupnim naučnim i stručnim literaturnim navodima, ne postoje podaci koji se odnose na konverziju ukupnog azota i ukupnog fosfora prilikom biosinteze ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom, izuzev onih koji su određeni tokom eksperimentalnih istraživanja u okviru ove doktorske disertacije (Zahović i Rončević, 2019; Rončević i sar., 2020b; Zahović i Trivunović, 2021). Stepenu konverzije ukupnog azota u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije odabranih sojeva roda *Xanthomonas*, u primenjenim eksperimentalnim uslovima, imao je vrednost od  $23,04 \pm 0,37\%$  do  $33,07 \pm 0,20\%$ . Najveći stepen konverzije ukupnog azota od  $33,07 \pm 0,20\%$  ostvaren je prilikom kultivacije soja PAP LIST 3. Nešto manji stepeni konverzije ukupnog azota ostvareni su kultivacijom referentnog soja ATCC 13951 i soja PAP LIST 4, redom, dok su najmanje vrednosti ovog pokazatelja uspešnosti bioprocasa ostvarene delovanjem sojeva KUPUS i KARFIOL. Varijacije u stepenu konverzije ukupnog azota među sojevima (tabela 5.21) uzrokovane su razlikama u fiziološkim karakteristikama sojeva (Nitschke i Thomas, 1995) usled činjenice da je različitim proizvodnim sojevima neophodna različita količina ovog nutrijenta za rast i biosintezu ksantana (Palaniraj i Jayaraman, 2011).

Konverzija ukupnog fosfora u ovom istraživanju ostvarena je u nešto manjem stepenu u odnosu na ostale nutrijente (tabela 5.21). Stepenu konverzije ukupnog fosfora, koji je izračunat po završetku kultivacije odabranih sojeva u primenjenim eksperimentalnim uslovima, iznosio je od  $19,01 \pm 0,42\%$  do  $31,03 \pm 0,07\%$ . Posmatrajući rezultate date u tabeli 5.21. evidentno je da je najveći stepen konverzije ukupnog fosfora od  $31,03 \pm 0,07\%$  ostvaren prilikom kultivacije soja PAP LIST 4. Sojevi ATCC 13951 i PAP LIST 3 konvertovali su ukupan fosfor u manjoj količini, dok su sojevi KARFIOL i KUPUS konvertovali ukupan sadržaj ovog nutrijenta u najmanjem stepenu. Dobijeni rezultati potvrđuju zaključke ranijih istraživanja koji ukazuju na to

da je razlika u stepenu konverzije ukupnog fosfora u medijumu sa sirovim glicerolom među različitim sojevima uzrokovana razlikama u fiziološkim karakteristikama (Nitschke i Thomas, 1995).

Rezultati dobijeni u okviru ove faze istraživanja ukazuju na to da kultivacijom različitih sojeva roda *Xanthomonas* na medijumu koji sadrži sirovi glicerol dolazi do produkcije ksantana, ali i istovremenog smanjenja sadržaja glicerola, ukupnog azota i ukupnog fosfora, što je od značaja za redukovanje negativnog uticaja na životnu sredinu koje ima neadekvatno odlaganje pomenutog efluenta industrije biodizela.

Posmatrajući rezultate dobijene u ovoj fazi istraživanja može se primetiti da se soj PAP LIST 4 izdvaja u pogledu produktivnosti, konverzije sirovog glicerola i konverzije ukupnog fosfora. Pomenuti soj je, u primenjenim eksperimentalnim uslovima, proizveo ksantan u najvećoj količini, pri čemu je došlo do povećanja sadržaja biosintetisanog ksantana u odnosu na prethodnu fazu istraživanja gde je biosinteza ksantana vršena kultivacijom istog soja na medijumu sa sirovim glicerolom, ali u manjim razmerama (poglavlje 5.3.1). Stepenn konverzije sirovog glicerola u ksantan koji je ostvaren primenom soja PAP LIST 4 je nešto manji u odnosu na stepenn konverzije ostvaren prilikom kultivacije referentnog soja ATCC 13951. Međutim, i pored toga ova vrednost stepena konverzije supstrata u željeni proizvod ukazuje na izvrsnu uspešnost bioprocasa u primenjenim eksperimentalnim uslovima (Rosalam i England, 2006). Stepenn konverzije ukupnog azota takođe nije bio značajno manji u poređenju sa najvećom vrednošću ovog parametra. Svi prethodno diskutovani rezultati ukazuju na značajan potencijal primene soja PAP LIST 4 u biotehnoškoj proizvodnji ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom kao jedinim izvorom ugljenika. Stoga je proizvodni soj PAP LIST 4 odabran kao najproduktivniji i najefikasniji u pogledu konverzije važnih nutrijenata prilikom kultivacije na medijumu sa sirovim glicerolom i korišćen je u daljim fazama istraživanja kao proizvodni soj (poglavlja 5.4-5.6).

#### **5.4. STANDARDIZACIJA PRIPREME INOKULUMA ZA BIOSINTEZU KSANTANA NA MEDIJUMU SA SIROVIM GLICEROLOM**

Nakon odabira proizvodnog soja, sledeći korak u razvoju biotehnoškog postupka proizvodnje ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom jeste standardizacija pripreme inokuluma, koja je u okviru ove doktorske disertacije izvedena u četiri faze pa su tako i dobijeni rezultati prikazani u četiri dela. Prvi deo sadrži rezultate definisanja odnosa glukoze i glicerola u medijumu za pripremu inokuluma, dok drugi deo obuhvata rezultate definisanja odnosa sastojaka sa azotom u istom medijumu. U trećem delu su dati rezultati optimizacije sadržaja nutrijenata u medijumu za pripremu inokuluma i koncentracije inokuluma koji se dodaje u medijum za biosintezu. Poslednji, odnosno četvrti deo ove faze istraživanja sadrži rezultate optimizacije vremena potrebnog za pripremu inokuluma.

### 5.4.1. Definisanje odnosa glukoze i glicerola u medijumu za pripremu inokuluma

Sastav kultivacionih medijuma veoma je značajan za uspešnost izvođenja svakog biotehnološkog procesa. Kada je u pitanju biosinteza sekundarnih metabolita, kakav je ksantan, različit sastav kultivacionih medijuma u različitim fazama proizvodnog postupka uslovljen je zahtevima metabolizma proizvodnog mikroorganizma u pogledu nutrijenata. Kao posledica toga, za pripremu inokuluma i za biosintezu željenog proizvoda primenjuju se medijumi različitog sastava (Pejin, 2003). Kultivacioni medijumi za pripremu inokuluma u proizvodnji ksantana imaju jasno definisan sastav, i to tako da obezbeđuju neophodne nutrijente za sintezu membrana, proteina, ćelijskog zida, hromozoma i ostalih komponenata od značaja za rast i umnožavanje proizvodnog mikroorganizma (Rosalam i England, 2006). Ovi medijumi sadrže fermentabilne šećere, kao što su glukoza, fruktoza, saharoza ili maltoza, pored drugih značajnih nutrijenata, odnosno izvora azota, kalijuma, fosfora, magnezijuma i sumpora (Dodić i Grahovac, 2013). Komercijalni medijum YMB<sup>®</sup> (HiMedia, Indija) je međunarodno prihvaćena formulacija medijuma koja je pogodna za rast i razmnožavanje bakterija *X. campestris*. U okviru ove doktorske disertacije priprema inokuluma za biosintezu ksantana izvedena je postupkom dvostrukog pasažiranja (poglavlje 4.3) pri čemu je u prethodnim fazama istraživanja za obe faze umnožavanja proizvodnog mikroorganizma primenjen pomenuti komercijalni medijum. Rezultati dobijeni prilikom ispitivanja mnogućnosti biosinteze ksantana na medijumima sa komercijalnim (poglavlje 5.1) i sirovim glicerolom (poglavlje 5.3) ukazuju da je pojedinim sojevima roda *Xanthomonas* potrebno duže vreme za adaptaciju na glicerol, koji je dodat kao jedini izvor ugljenika u medijume za biosintezu, kako bi proizveli ksantan odgovarajućeg kvaliteta u dovoljnoj količini, te da produženje vremena trajanja kultivacije nije uticalo na povećanje uspešnosti izvođenja bioprocasa. Pored toga, prilikom prenošenja tehnologije sa laboratorijskog na industrijski nivo teži se primeni jeftinijih supstrata zbog čega priprema industrijskog inokuluma na relativno skupim komercijalnim medijumima nije idealna i utiče na ekonomičnost čitavog proizvodnog postupka, a samim tim i na cenu konačnog proizvoda i njegovu konkurentnost na tržištu (Bajić i sar., 2017b). Imajući u vidu sve navedeno, a sa ciljem razvoja biotehnološkog postupka proizvodnje ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom primenom odabranog lokalnog izolata roda *Xanthomonas*, jasno je da je logičan korak u daljim ispitivanjima optimizacija sastava medijuma za pripremu inokuluma. Stoga je, u ovoj fazi istraživanja izvršena optimizacija sastava medijuma za drugu fazu pripreme inokuluma u pogledu izvora ugljenika koji se dodaju, a koji će omogućiti adaptaciju proizvodnog soja na sirovi glicerol koji se kao jedini izvor ugljenika nalazi u medijumu za biosintezu ksantana. Polazna tačka za formulaciju novog medijuma za drugu fazu pripreme inokuluma jeste sastav komercijalnog YMB<sup>®</sup> medijuma, koji od izvora ugljenika sadrži u najvećoj količini glukoza, ali i maltozu koja se donosi slanim ekstraktom. S obzirom da je čista glukoza relativno skup izvor ugljenika, jedan od ciljeva ove faze istraživanja bio je i da se izvrši supstitucija dela glukoze glicerolom. Stoga su, pored glukoze kao izvori ugljenika dodavani i komercijalni i sirovi glicerol pri čemu je planirano da se priprema inokuluma izvodi na medijumima koji sadrže različite udele ovih komponenti kako bi se definisao odnos variranih izvora ugljenika koji je najpogodniji za umnožavanje ćelija proizvodnog soja, a koje će nakon inokulacije medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom omogućiti uspešno izvođenje bioprocasa sa predvidivim ishodom. Budući da definisanje idealnog odnosa tri različite komponente medijuma zahteva izvođenje velikog broja eksperimenata, a u cilju smanjenja obima eksperimentalnih ispitivanja, u okviru ove faze istraživanja primenjen je eksperimentalni plan za dizajn smeše (tabela 4.2). Veoma je važno



napomenuti da su dosadašnja naučna istraživanja iz oblasti razvoja biotehnoške proizvodnje ksantana u kojima je korišćeno statističko planiranje izvođenja oglada za cilj imali optimizaciju sastava medijuma za biosintezu (Demirici i sar., 2017; Rončević i sar., 2019), dok se ne sreću literaturni navodi koji se odnose na definisanje optimalnog sastava medijuma za pripremu inokuluma.

#### **5.4.1.1. Eksperimentalni rezultati oglada izvedenih sa ciljem definisanja odnosa glukoze i glicerola u medijumu za pripremu inokuluma**

Sa ciljem pripreme inokuluma, umnožavanje prethodno odabranog proizvodnog soja PAP LIST 4 izvedeno je u dva koraka, pod identičnim uslovima (poglavlje 4.3), ali na različitim medijumima. U prvom koraku umnožavanja korišćen je komercijalni medijum YMB<sup>®</sup> (HiMedia, Indija), dok je u drugom koraku primenjeno više medijuma u kojima je variran odnos glukoze i glicerola (tabela 4.2), pri čemu je sadržaj ostalih nutrijenata bio nepromenjen (poglavlje 4.2.1). Pripremljeni inokulumi dodati su u jednakim koncentracijama u medijume za biosintezu na bazi sirovog glicerola (poglavlje 4.3), a zatim je vršena njihova inkubacija.

Ogledi dizajnirani prema eksperimentalnom planu za dizajn smeše podrazumevali su izvođenje 13 kultivacija soja PAP LIST 4 na medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom, u primenjenim uslovima (poglavlje 4.4), pri čemu je priprema inokuluma za svaki od ovih oglada izvedena nezavisno, a u skladu sa korišćenim eksperimentalnim dizajnom (tabela 4.2). Po isteku predviđenog vremena, izvršena je analiza medijuma kako bi se potvrdila mogućnost biosinteze ksantana i procenila uspešnost izvođenja bioprocasa. Da bi se ustanovilo da li je došlo do produkcije željenog biopolimera vršena su reološka merenja medijuma za biosintezu (poglavlje 4.6.2), a kao pokazatelj uspešnosti bioprocasa u ovoj fazi istraživanja određivan je sadržaj ksantana u istom medijumu (poglavlje 4.5). Dobijeni kultivacioni medijumi analizirani su i u pogledu vrednosti pH i sadržaja TDS.

Reološka svojstva medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom, dobijenih po završetku kultivacije soja PAP LIST 4, koji je prethodno umnožen na medijumima sa različitim odnosima glukoze i glicerola, prikazana su u tabeli 5.22.

Vrednosti indeksa toka kultivacionih medijuma analiziranih u ovoj fazi istraživanja kretale su se u intervalu od 0,4460 do 0,6823 (tabela 5.22). Dobijene vrednosti su u saglasnosti sa prethodno diskutovanim vrednostima indeksa toka medijuma analiziranih tokom ranijih ispitivanja (poglavlje 5.1. i 5.3). Dakle, na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 5.22. može se zaključiti da medijumi za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4, prethodno umnoženog na medijumima sa različitim odnosima glukoze i glicerola, poseduju pseudoplastične karakteristike, što je siguran pokazatelj produkcije željenog biopolimera. Vrednosti faktora konzistencije medijuma analiziranih u ovoj fazi istraživanja kretale su se u intervalu od 0,0562 Pa·s<sup>n</sup> do 0,3420 Pa·s<sup>n</sup> (tabela 5.22). Uzimajući u obzir da je faktor konzistencije direktno proporcionalan viskozitetu i da viskozitet rastvora ksantana zavisi od koncentracije biopolimera, njegove molekulske mase, dužine i sastava lanaca makromolekula, kao i stepena njihove umreženosti (García-Ochoa i sar., 2000), različite vrednosti faktora konzistencije prikazane u tabeli 5.22. ukazuju na razliku u količini i kvalitetu ksantana biosintetisanog na medijumu sa sirovim glicerolom, u primenjenim eksperimentalnim uslovima,

prilikom kultivacije odabranog proizvodnog mikroorganizma prethodno umnoženog na medijumima različite formulacije. Na osnovu vrednosti indeksa toka i faktora konzistencije izračunati su prividni viskoziteti medijuma.

Tabela 5.22. Reološke karakteristike medijuma za biosintezu po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima sa različitim odnosima glukoze i glicerola

Redni broj ogleda	Glukoza (g/l)	Komercijalni glicerol (g/l)	Sirovi glicerol (g/l)	$K$ [ $\text{Pa}\cdot\text{s}^n$ ]	$n$ [1]	$\eta_a$ [ $\text{mPa}\cdot\text{s}$ ]
1	10,00	0	0	0,0562	0,6309	10,27
2	0	10,00	0	0,2155	0,5219	23,84
3	0	0	10,00	0,0763	0,6287	13,80
4	5,00	5,00	0	0,1104	0,6260	19,72
5	5,00	0	5,00	0,1948	0,5512	24,66
6	0	5,00	5,00	0,1956	0,5330	22,77
7	5,00	5,00	5,00	0,3420	0,4460	21,64
8	6,67	1,67	1,67	0,2187	0,4869	20,59
9	1,67	6,67	1,67	0,1278	0,5860	18,99
10	1,67	1,67	6,67	0,1013	0,6451	19,76
11	10,00	0	0	0,0573	0,6823	13,27
12	0	10,00	0	0,2226	0,5141	23,75
13	0	0	10,00	0,1139	0,5861	16,93

$K$  – faktor konzistencije;  $n$  – indeks toka;  $\eta_a$  – prividni viskozitet.

Rezultati prikazani u tabeli 5.22. ukazuju na to da su se vrednosti prividnog viskoziteta medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom, dobijenih po završetku kultivacije soja PAP LIST 4, koji je u drugoj fazi pripreme inokuluma umnožen na medijumima sa različitim odnosima glukoze i glicerola, kretale od 10,27  $\text{mPa}\cdot\text{s}$  do 24,66  $\text{mPa}\cdot\text{s}$ . Dobijeni rezultati sugerišu da se prilikom korišćenja formulacije medijuma za pripremu inokuluma iz ogleda broj 5 (50% glukoze i 50% sirovog glicerola) ostvaruje najveća vrednost prividnog viskoziteta medijuma za biosintezu u poređenju sa ostalim ogledima. Pored toga, posmatranjem istih rezultata može se primetiti da je najmanja vrednost prividnog viskoziteta medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom ostvarena kada je kao medijum za drugu fazu pripreme inokuluma korišćen medijum formulacije iz ogleda broj 1. U formulaciji broj 1 je, pored ostalih komponenata (poglavlje 4.2), prisutna glukoza u količini od 100%. Navedeni rezultati ukazuju na to da se veći prividni viskozitet medijuma za biosintezu ostvaruje kada se za drugu fazu pripreme inokuluma koristi medijum koji pored glukoze sadrži ili komercijalni ili sirovi glicerol.

Po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 na medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom uzorci dobijenih kultivacionih medijuma su analizirani i u pogledu vrednosti pH i sadržaja TDS. Vrednosti pH analiziranih uzoraka prikazane su u tabeli 8.11. koja se nalazi u Prilogu 1. Iz pomenute tabele je evidentno da su se vrednosti pH medijuma za biosintezu kretale od 4,68 do 6,12. Analizom rezultata prikazanih u prethodno pomenutoj tabeli može se uočiti da je vrednost pH tokom kultivacije soja PAP LIST 4 na medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom bila iznad kritične vrednosti (5,5) u svim ogledima, izuzev kada je u drugoj fazi pripreme inokulima proizvodni soj umnožavan na medijumu formulacije iz ogleda broj 3 (100% sirovog glicerola). Ovo je važno iz ugla ekonomske isplativosti bioprocasa jer ukazuje na potencijalnu proizvodnju

ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom bez troškova korigovanja vrednosti pH tokom izvođenja samog bioprocesa. Vrednosti sadržaja TDS u medijumima za biosintezu sa sirovim glicerolom, dobijenim nakon kultivacije u primenjenim eksperimentalnim uslovima, takođe su prikazane u tabeli 8.11. (Prilog 1). Izmerene vrednosti sadržaja TDS u medijumima za biosintezu kretale su se od 3,78 g/l do 4,50 g/l. Dobijeni rezultati pokazuju da ne dolazi do drastičnih promena u sadržaju TDS u proizvodnim medijumima, kao što je to bio slučaj i u prethodnim fazama istraživanja (poglavlja 5.1. i 5.3).

Po bioprocesa izvedenog primenom soja PAP LIST 4, prethodno umnoženog na medijumima različite formulacije, određen je sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu, a dobijeni rezultati predstavljeni su u tabeli 5.23.

Tabela 5.23. Uticaj različitog odnosa glukoze i glicerola u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu po završetku kultivacije soja PAP LIST 4

Redni broj ogleda	P (g/l)			
	Glukoza (g/l)	Komercijalni glicerol (g/l)	Sirovi glicerol (g/l)	Y
1	10,00	0	0	7,37
2	0	10,00	0	8,64
3	0	0	10,00	7,41
4	5,00	5,00	0	7,47
5	5,00	0	5,00	9,03
6	0	5,00	5,00	8,22
7	5,00	5,00	5,00	8,40
8	6,67	1,67	1,67	8,07
9	1,67	6,67	1,67	8,65
10	1,67	1,67	6,67	8,77
11	10,00	0	0	7,56
12	0	10,00	0	8,50
13	0	0	10,00	7,76

Y, P-sadržaj biosintetisanog ksantana.

Rezultati u tabeli 5.23. pokazuju da je najveća koncentracija ksantana od 9,03 g/l ostvarena ako se za drugu fazu pripreme inokuluma koristio medijum formulacije iz ogleda broj 5. Pomenuti medijum je sadržao glukozu i sirovi glicerol, koji su dodati u jednakim količinama. U ogledima broj 2, 6, 7, 8, 9, 10 i 12 ostvarene su nešto niže koncentracije ksantana, i to 8,64 g/l, 8,22 g/l, 8,40 g/l, 8,07 g/l, 8,65 g/l, 8,77 g/l i 8,50 g/l, redom. Sa druge strane, najniža koncentracija ksantana u medijumu za biosintezu od 7,37 g/l je ostvarena kada je medijum formulacije iz ogleda 1 (100% glukoze) korišćen kao medijum za drugu fazu pripreme inokuluma. Na osnovu dobijenih rezultata sa sigurnošću se može potvrditi da glukozu, uz maltozu iz sladnog ekstrakta, nije najpogodnija kombinacija izvora ugljenika u medijumu za pripremu inokuluma za proces biosinteze ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom primenom soja PAP LIST 4, što je u skladu sa literaturnim navodima da tokom postupka pripreme inokuluma treba proizvodni mikroorganizam navikavati na uslove sredine koji vladaju u proizvodnom medijumu, odnosno na prisustvo konkretnog izvora ugljenika (Wang i sar., 2016). Dakle, može se primetiti da je najveća koncentracija ksantana u medijumu za biosintezu, u primenjenim eksperimentalnim

uslovima, ostvarena kada je medijum za drugu fazu pripreme inokuluma pored glukoze i maltoze, sadržao i sirovi glicerol kao izvor ugljenika (tabele 4.2. i 5.23). Ovo ukazuje na značaj adaptacije proizvodnog soja na sirovi glicerol neposredno pre kultivacije na medijumu koji sadrži sirovi glicerol kao jedini izvor ugljenika. Na značaj adaptacije sojeva iz roda *Xanthomonas* na glicerol ukazali su i naučnici iz Kine koji su u svom istraživanju izvršili adaptaciju soja *X. campestris* CCTCC M2015714 na medijum sa glicerolom uz ostvarivanje sadržaja ksantana od 7,90 g/l (Wang i sar., 2016).

#### 5.4.1.2. Generisanje modela za oglede izvedene sa ciljem definisanja odnosa glukoze i glicerola u medijumu za pripremu inokuluma

Kako bi se definisao optimalan odnos glukoze i glicerola u medijumu za umnožavanje soja PAP LIST 4 u drugoj fazi pripreme inokuluma za biosintezu ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom, nakon uspešno izvedenih statistički dizajniranih eksperimenata neophodno je generisati adekvatan model koji opisuje uticaj variranih parametara na posmatrani odziv. U cilju dobijanja detaljnijih informacija o uticaju ispitivanih faktora na uspešnost izvođenja biosinteze ksantana u primenjenim eksperimentalnim uslovima, kao i u cilju kvantifikacije faktorskih efekata i njihovih interakcija, vršena je analiza eksperimentalnih podataka primenom odgovarajućih softverskih paketa.

Na prvom mestu, u nastavku istraživanja izvedeno je matematičko modelovanje eksperimentalno dobijenih rezultata za sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu (Y) prikazanih u tabeli 5.23. Uspešnost fitovanja dobijenih podataka odabranim modelom (jednačina 4.9) procenjena je na osnovu vrednosti koeficijenta determinacije, a ispitane su i adekvatnost i značajnost generisanog matematičkog modela primenom analize varijanse. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 5.24.

Tabela 5.24. Analiza varijanse modelovanog odziva: sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima sa različitim odnosima glukoze i glicerola

Odziv	Poreklo								
	Rezidual			Model					
	SS	DF	MS	SS	DF	MS	F-vrednost	p-vrednost	R <sup>2</sup>
Y	0,317	7	0,045	865,600	6	144,267	3183,290	<0,000001	0,920

*SS – suma kvadrata; DF – stepen slobode; MS – srednja vrednost kvadrata; R<sup>2</sup> – koeficijent determinacije.*

Posmatrajući rezultate predstavljene u tabeli 5.24. može se primetiti da koeficijent determinacije iznosi 0,920 što ukazuje na to da je ostvarena veoma dobra veza između eksperimentalnih i modelom predviđenih vrednosti sadržaja biosintetisanog ksantana. Definisanim matematičkim modelom nije moglo biti objašnjeno 8,00% od ukupnih varijacija, koje zapravo predstavljaju efekte onih faktora koji nisu uključeni u modelovanje te nisu bili od interesa u ovom istraživanju. Pored toga, poređenje eksperimentalno dobijenih vrednosti i vrednosti predviđenih modelom prikazano je i grafički na slici 8.1. (Prilog 2). Predstavljeni rezultati ukazuju da se

eksperimentalne vrednosti ostvarene u ovom istraživanju nalaze veoma blizu linije najboljeg fitovanja.

Adekvatnost generisanog matematičkog modela proverena je pomoću Fišerovog (Fisher) testa, a njegova statistička značajnost, u intervalu poverenja od 95%, potvrđena je analizirajući  $p$ -vrednosti.  $F$ -vrednost, prikazana u tabeli 5.24. manja je od tabličnih vrednosti za odgovarajući stepen slobode primenjenog eksperimentalnog plana, tako da se definisani model smatra pogodnim za opisivanje uticaja variranih faktora na posmatrani odziv. Izuzetno niska  $p$ -vrednost prikazana u istoj tabeli potvrđuje da je generisani model statistički značajan u zadanom intervalu poverenja.

### Matematički model za sadržaj ksantana

Fitovanjem eksperimentalnih podataka, koji se odnose na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu po završetku bioprocesa (tabela 5.23), polinomom drugog reda (jednačina 4.9) dobijena je regresiona jednačina koja opisuje uticaj variranih faktora na pomenuti odziv:

$$Y=0,074325 \cdot X_1 + 0,085995 \cdot X_2 + 0,076060 \cdot X_3 - 0,000190 \cdot X_1 \cdot X_2 \\ + 0,000626 \cdot X_1 \cdot X_3 + 0,000125 \cdot X_2 \cdot X_3 \quad (5.1)$$

gde su:

$Y$ - sadržaj biosintetisanog ksantana,

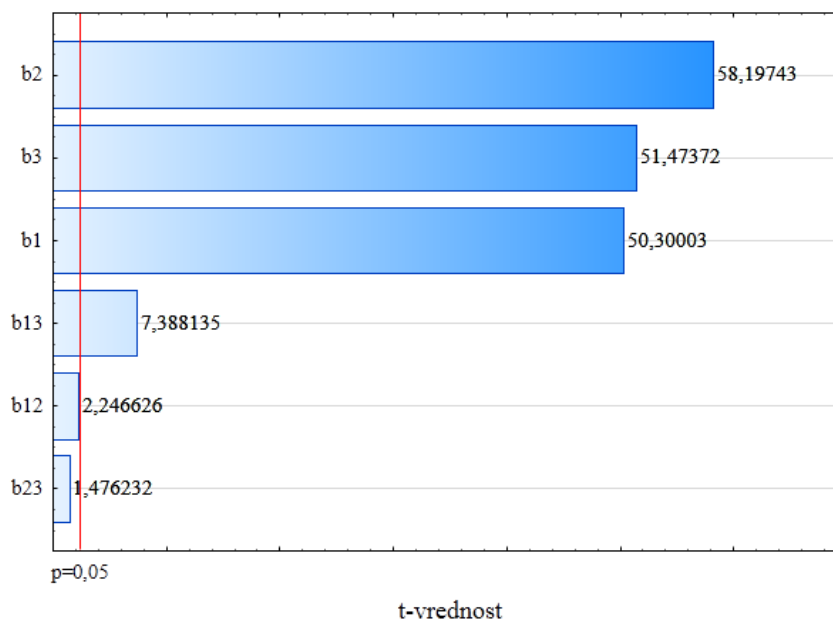
$X_1$ , - udeo glukoze,

$X_2$  - udeo komercijalnog glicerola i

$X_3$  - udeo sirovog glicerola.

Statistička značajnost koeficijenata u generisanoj jednačini (5.1.) procenjena je na osnovu  $p$ -vrednosti, dok je intenzitet njihovog uticaja određen poređenjem  $t$ -vrednosti prikazanih na Pareto grafiku. Pareto grafik standardizovanih efekata na sadržaj ksantana u medijumu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima sa različitim odnosima glukoze i glicerola prikazan je na slici 5.25.

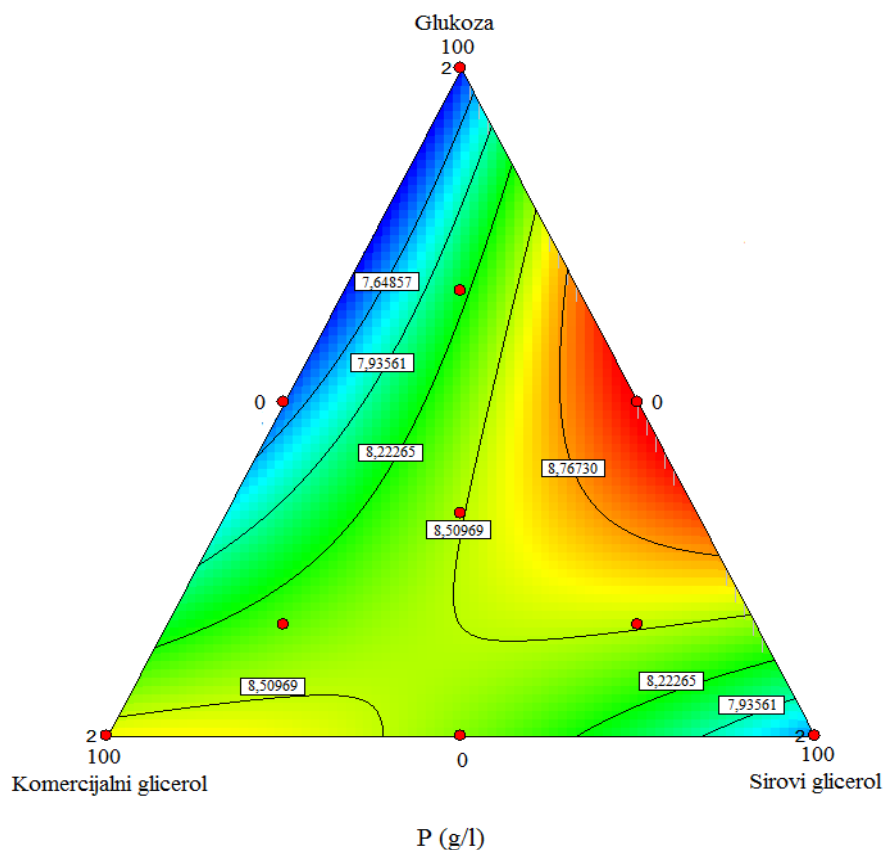
Rezultati dati na slici 5.25. ukazuju da svi linearni koeficijenti variranih parametara ( $b_1$ ,  $b_2$  i  $b_3$ ) i koeficijent interakcije glukoze i sirovog glicerola ( $b_{12}$ ,  $b_{13}$  i  $b_{23}$ ) statistički značajno utiču na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu po završetku kultivacije izvedene u primenjenim eksperimentalnim uslovima. Sa istih grafički prikazanih rezultata može se uočiti da prisustvo komercijalnog glicerola u medijumu za pripremu inokuluma u najvećoj meri utiče na produkciju ksantana, a da su pojedinačni uticaji glukoze i sirovog glicerola nešto manji i skoro ujednačeni. Prema dobijenim rezultatima, od uzajamnih interakcija jedino je značajna interakcija upravo ovih komponenti. Pozitivan predznak koeficijenta interakcije glukoze i sirovog glicerola prikazan u jednačini 5.1. ukazuje na sinergistički efekat ova dva izvora ugljenika. Rezultati prikazani na slici 5.25. pokazuju da međusobna interakcija glukoze i komercijalnog glicerola, kao i interakcija sirovog glicerola i komercijalnog glicerola u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma ne utiču statistički značajno na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu, u primenjenim eksperimentalnim uslovima.



Slika 5.25. Pareto grafik standardizovanih efekata na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima sa različitim odnosima glukoze i glicerola

U cilju lakše interpretacije ustanovljenih efekata, generisan matematički model (jednačina 5.1) prikazan je i grafički, konturnim dijagramom koji je dat na slici 5.26. Konturni dijagram predstavljen na pomenutoj slici prikazuje uticaj promene udela glukoze, komercijalnog glicerola i sirovog glicerola u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma na sadržaj ksantana biosintetisanog na medijumu sa sirovim glicerolom primenom soja PAP LIST 4.

Grafički predstavljeni rezultati na slici 5.26. jasno ukazuju da se najviše vrednosti sadržaja ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 postižu ako se za drugu fazu pripreme inokuluma primenjuje medijum sa podjednakim udelima glukoze i sirovog glicerola, dok udeo komercijalnog glicerola može biti minimalan. Prema rezultatima prikazanim na slici 5.26. predviđeno je da se najmanji sadržaj ksantana u proizvodnom medijumu ostvaruje ako se za drugu fazu umnožavanja proizvodnog soja koristi medijum sa 100% udela sirovog glicerola ili glukoze. Takođe, isti rezultat se može postići i ako se u drugoj fazi pripreme inokuluma primenjuje medijum sa različitim udelima glukoze (50-100%) i komercijalnog glicerola (0-50%). Dobijeni rezultati sugerišu da je interakcija glukoze i sirovog glicerola u medijumu za umnožavanje soja PAP LIST 4 u drugoj fazi pripreme inokuluma od krucijalnog značaja za postizanje visokog sadržaja ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom u primenjenim eksperimentalnim uslovima.



Slika 5.26. Zavisnost sadržaja ksantana (P) u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 od odnosa variranih izvora ugljenika u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma

#### 5.4.1.3. Optimizacija odnosa glukoze i glicerola u medijumu za pripremu inokuluma

Za optimizaciju sastava medijuma za drugu fazu pripreme inokuluma u pogledu odnosa glukoze i glicerola korišćena je metoda željene funkcije u kombinaciji sa prethodno generisanim matematičkim modelom (jednačina 5.1). Kao cilj optimizacije zadato je postizanje najveće moguće koncentracije ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4, koji je direktni pokazatelj uspešnosti ovog biotehnološkog postupka. Optimalne vrednosti variranih parametara i procenjena vrednost posmatranog odziva, za najveću moguću vrednost ukupne željene funkcije, prikazane su u tabeli 5.25.

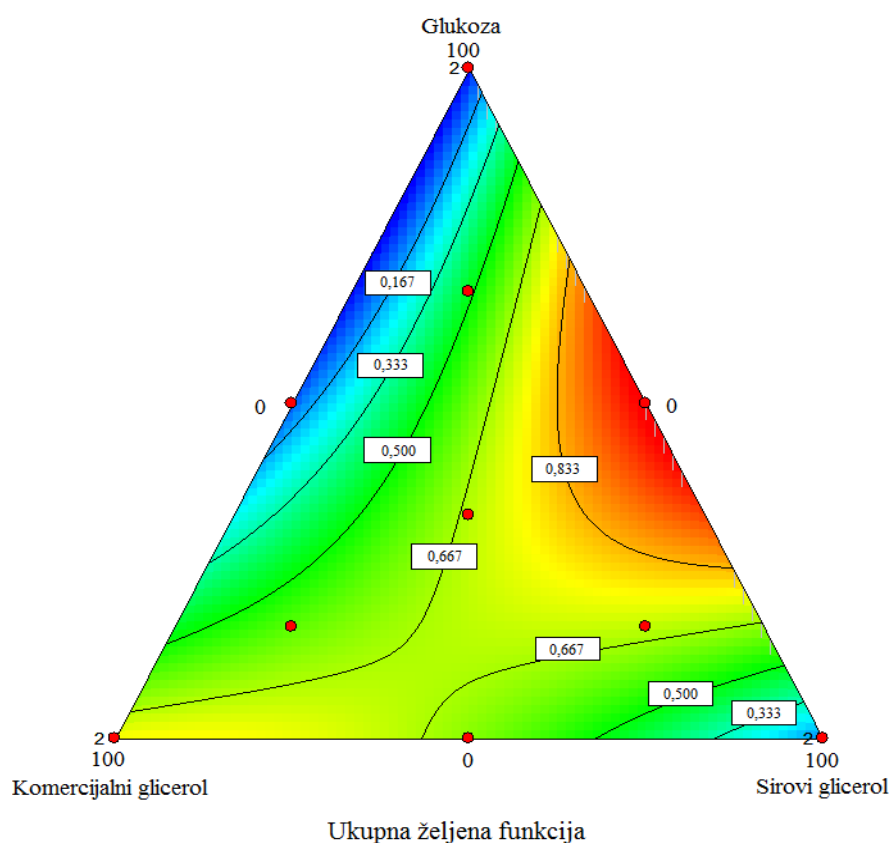
Na osnovu podataka prikazanih u tabeli 5.25. može se primetiti da, ako se kao jedini cilj optimizacije definiše postizanje maksimalne koncentracije ksantana u medijumu za biosintezu, vrednost posmatranog odziva je najveća (9,03 g/l) ukoliko se u okviru druge faze umnožavanja soja PAP LIST 4 koristi medijum sa 39,21% glukoze i 60,79% sirovog glicerola, pored ostalih nutrijenata, što uključuje i maltozu iz sladnog ekstrakta. Ukupna željena funkcija u ovom slučaju ima maksimalnu vrednost i iznosi 1.

Tabela 5.25. Optimalne vrednosti variranih parametara i predviđeni odziv: odnos glukoze i glicerola u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma

Promenljive	Uslovi	Granične vrednosti	Optimalne vrednosti
Udeo glukoze (%)	u opsegu	0-100	39,21
Udeo komercijalnog glicerola (%)	u opsegu	0-100	0
Udeo sirovog glicerola (%)	u opsegu	0-100	60,79
Odziv		Predviđene vrednosti	
P (g/l)	maksimalan	7,37-9,03	9,03
Ukupna željena funkcija			1

*P-sadržaj biosintetisanog ksantana.*

Optimizacioni rezultati prikazani su i grafički, konturnim dijagramom koji pokazuje zavisnost vrednosti ukupne željene funkcije od udela glukoze, komercijalnog glicerola i sirovog glicerola u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma, a dat je na slici 5.27.



Slika 5.27. Zavisnost vrednosti ukupne željene funkcije od odnosa variranih izvora ugljenika u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma



Rezultati prikazani na slici 5.27. ukazuju na to da se najveća vrednost ukupne željene funkcije postiže ako se za drugu fazu pripreme inokuluma koristi medijum sa podjednakim udelima glukoze i sirovog glicerola, dok udeo komercijalnog glicerola može biti minimalan. Sa druge strane, najniže vrednosti željene funkcije postižu se kada medijum za umnožavanje proizvodnog soja u drugoj fazi pripreme inokuluma sadrži samo glukozu ili sirovi glicerol, odnosno ako se primenjuju medijumi sa glukozom i komercijalnim glicerolom koji su dodati u različitim udelima (50-100% i 0-50%, redom).

Uzimajući u obzir da je težnja većine istraživanja današnjice skoncentrisana na razvoj ekonomski isplativog postupka proizvodnje visokovrednih proizvoda, izvršena optimizacija značajna je i sa ekonomskog aspekta. Cena sirovog glicerola za 2019. godinu iznosi 170 \$/t, a cena glukoze 460 \$/t (Da Silva Ruy i sar., 2020). Prema tome, jasno je da se primenom rešenja predviđenog modelom doprinosi razvoju ekonomski isplativog postupka proizvodnje ksantana jer se značajan udeo glukoze iz medijuma za pripremu inokuluma menja mnogo jeftinijom sirovinom. Takođe, bitno je napomenuti da se u tom slučaju sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku bioprocesa povećao za nešto više od 20%, u odnosu na prethodnu fazu istraživanja (tabela 5.16).

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se dizajn smeše pokazao kao funkcionalan eksperimentalni plan za kreiranje ogleda koji su za cilj imali definisanje najpogodnijeg odnosa glukoze i glicerola u medijumu za umnožavanje soja PAP LIST 4 u drugoj fazi pripreme inokuluma za biosintezu ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom. Primenom generisanog matematičkog modela u kombinaciji sa metodom željene funkcije izvršena je optimizacija sastava pomenutog medijuma, pri čemu je procenjeno da je medijum najpogodnije formulacije onaj sa 39,21% glukoze i 60,79% sirovog glicerola, što u praktičnom slučaju iznosi 40% glukoze i 60% sirovog glicerola. Medijum navedenog sastava korišćen je kao medijum za drugu fazu pripreme inokuluma u daljim istraživanjima.

#### **5.4.2. Definisane odnosa sastojaka sa azotom u medijumu za pripremu inokuluma**

Kultivacioni medijumi koji se koriste za pripremu inokuluma, pored izvora ugljenika, sadrže i lako usvojive neorganske i organske izvore azota poput amonijumovih soli, peptona ili triptona, ali i mikroelemente i različite faktore rasta (Dodić i Grahovac, 2013). U ovoj fazi istraživanja izvršena je optimizacija medijuma za drugu fazu pripreme inokuluma, koji će se dodati u medijum za biosintezu, u pogledu odnosa sastojaka sa azotom uz ispitivanje mogućnosti delimične ili potpune zamene skupljih sastojaka (pepton, ekstrakt kvasca) ekonomski isplativijim (sladni ekstrakt). Polazna tačka za formulaciju novog medijuma za drugu fazu pripreme inokuluma je medijum čiji je sastav optimizovan u prethodnoj fazi istraživanja (poglavlje 5.4.1), a koji sadrži 40% glukoze i 60% sirovog glicerola, dok su od sastojaka sa azotom dodavane one komponente koje sadrži komercijalni YMB<sup>®</sup> medijum, odnosno ekstrakt kvasca, sladni ekstrakt i pepton. Planirano je da se priprema inokuluma izvodi na medijumima koji sadrže različite udele pomenutih sastojaka kako bi se definisao odnos ovih komponenti koji je najpogodniji za umnožavanje ćelija odabranog proizvodnog soja, a koje će nakon inokulacije medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom omogućiti uspešno izvođenje bioprocesa sa predvidivim ishodom. Budući da definisanje idealnog odnosa tri različite komponente medijuma zahteva

izvođenje velikog broja eksperimenata, a u cilju smanjenja obima eksperimentalnih ispitivanja, u okviru ove faze istraživanja primenjen je eksperimentalni plan za dizajn smeše (tabela 4.3). Po pitanju optimizacije sadržaja sastojaka sa azotom, i u ovom slučaju su dosadašnja naučna istraživanja iz oblasti razvoja biotehnoške proizvodnje ksantana u kojima je korišćeno statističko planiranje eksperimenata za cilj imali optimizaciju sastava medijuma za biosintezu (Carignatto i sar., 2011; Kumara i sar., 2012), dok se ne sreću literaturni navodi koji se odnose na definisanje optimalnog sastava medijuma za pripremu inokuluma.

#### **5.4.2.1. Eksperimentalni rezultati oglada izvedenih sa ciljem definisanja odnosa sastojaka sa azotom u medijumu za pripremu inokuluma**

U cilju pripreme inokuluma, umnožavanje soja PAP LIST 4 izvedeno je u dva koraka, pod identičnim uslovima (poglavljje 4.3), ali na različitim medijumima. U prvom koraku umnožavanja korišćen je komercijalni medijum YMB<sup>®</sup> (HiMedia, Indija), dok je u drugom koraku primenjeno više medijuma u kojima je variran odnos različitih sastojaka sa azotom (tabela 4.3) dok je sadržaj glukoze i glicerola bio nepromenjen (poglavljje 4.2.1). Pripremljeni inokulumi dodati su u jednakim koncentracijama u medijume za biosintezu na bazi sirovog glicerola (poglavljje 4.3), a zatim je vršena njihova inkubacija.

Ogledi dizajnirani prema eksperimentalnom planu za dizajn smeše podrazumevali su izvođenje 13 kultivacija soja PAP LIST 4 na medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom, u primenjenim eksperimentalnim uslovima (poglavljje 4.4), pri čemu je priprema inokuluma za svaki od ovih oglada izvedena nezavisno, a u skladu sa korišćenim eksperimentalnim dizajnom (tabela 4.3). Po isteku predviđenog vremena, izvršena je analiza medijuma kako bi se potvrdila mogućnost biosinteze ksantana i procenila uspešnost izvođenja bioprocasa. Da bi se ustanovilo da li je došlo do produkcije željenog biopolimera vršena su reološka merenja medijuma za biosintezu (poglavljje 4.6.2), a kao pokazatelj uspešnosti bioprocasa u ovoj fazi istraživanja određivan je sadržaj ksantana u istom medijumu (poglavljje 4.5). Dobijeni kultivacioni medijumi analizirani su i u pogledu vrednosti pH i sadržaja TDS.

Reološka svojstva medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom, dobijenih po završetku kultivacije soja PAP LIST 4, koji je prethodno umnožen na medijumima sa različitim odnosima ispitivanih sastojaka sa azotom, prikazana su u tabeli 5.26.

Rezultati prikazani u tabeli 5.26. ukazuju na to da su se vrednosti indeksa toka kultivacionih medijuma analiziranih u ovim ispitivanjima kretale u opsegu od 0,5768 do 0,8940. Može se primetiti da su ove vrednosti u saglasnosti sa prethodno diskutovanim vrednostima indeksa toka analiziranih tokom prethodnih faza ispitivanja (poglavljja 5.1. i 5.3). Dobijeni rezultati sugerišu da su pseudoplastične karakteristike medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4, prethodno umnoženog na medijumima sa različitim odnosim sastojaka sa azotom, potvrđene vrednostima indeksa toka ( $n$ ) datih u tabeli 5.26. Vrednosti faktora konzistencije medijuma analiziranih u ovoj fazi istraživanja kretale su se u intervalu od 0,0287 Pa·s<sup>n</sup> do 0,1032 Pa·s<sup>n</sup> (tabela 5.26). Faktor konzistencije direktno je proporcionalan viskozitetu, a viskozitet rastvora ksantana zavisi od koncentracije biopolimera, njegove molekulske mase, kao i sastava, dužine lanaca makromolekula i stepena umreženosti (García-Ochoa i sar., 2000). Stoga, različite vrednosti faktora konzistencije prikazane u tabeli

5.26. ukazuju na razliku u kvantitetu i kvalitetu ksantana biosintetisanog na medijumu sa sirovim glicerolom, u primenjenim eksperimentalnim uslovima, prilikom kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima različite formulacije. Prividni viskoziteti kultivacionih medijuma izračunati su na osnovu vrednosti indeksa toka i faktora konzistencije.

Tabela 5.26. Reološke karakteristike medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima sa različitim odnosima sastojaka sa azotom

Redni broj ogleda	Ekstrakt kvasca (g/l)	Sladni ekstrakt (g/l)	Pepton (g/l)	K [Pa·s <sup>n</sup> ]	n [1]	η <sub>a</sub> [mPa·s]
1	11,0	0	0	0,0452	0,5971	7,07
2	0	11,0	0	0,0707	0,7629	23,73
3	0	0	11,0	0,0670	0,7295	19,28
4	5,5	5,5	0	0,0287	0,8940	17,61
5	5,5	0	5,5	0,0632	0,6742	14,10
6	0	5,5	5,5	0,0417	0,8200	18,20
7	3,7	3,7	3,7	0,1032	0,6149	17,52
8	7,3	1,8	1,8	0,0369	0,7565	12,02
9	1,8	7,3	1,8	0,0605	0,8204	26,46
10	1,8	1,8	7,3	0,0644	0,6367	12,09
11	11,0	0	0	0,0477	0,5768	6,79
12	0	11,0	0	0,0425	0,8187	18,44
13	0	0	11,0	0,0558	0,6217	13,52

*K* – faktor konzistencije; *n* – indeks toka; η<sub>a</sub> – prividni viskozitet.

Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 5.26, a pokazuju da su se vrednosti prividnog viskoziteta medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom, dobijenih po završetku kultivacije soja, koji je u drugoj fazi pripreme inokuluma umnožen na medijumima sa različitim odnosima sastojaka sa azotom, kretale od 7,07 mPa·s do 26,46 mPa·s. Prema prikazanim rezultatima evidentno je da se prilikom korišćenja formulacije medijuma iz ogleda broj 9, kao medijuma za drugu fazu pripreme inokuluma za biosintezu ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom, ostvaruje najveći prividni viskozitet proizvodnog medijuma. Navedena formulacija sadržala je 16,67% ekstrakta kvasca, 66,67% sladnog ekstrakta i 16,67% peptona, pored ostalih komponenata medijuma (poglavlje 4.2). Dobijeni rezultati pokazuju da je najmanja vrednost prividnog viskoziteta medijuma za biosintezu ostvarena kada je kao medijum za drugu fazu pripreme inokuluma korišćen medijum formulacije iz ogleda broj 11. U formulaciji iz ogleda broj 11 je korišćen ekstrakt kvasca u količini od 100%. Podaci prikazani u tabeli 5.26. sugerišu da se veći prividni viskozitet medijuma za biosintezu ostvaruje kada se za drugu fazu pripreme inokuluma koristi medijum koji sadrži sladni ekstrakt u najvećoj količini.

Nakon završene kultivacije soja PAP LIST 4 na medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom, u primenjenim eksperimentalnim uslovima, uzorci medijuma su analizirani i u pogledu vrednosti pH i sadržaja TDS. Vrednosti pH analiziranih uzoraka prikazane su u tabeli 8.12. (Prilog 1). Dobijeni rezultati ukazuju na to da su se vrednosti pH medijuma za biosintezu kretale od 4,50 do 6,74. Analizom rezultata datih u tabeli 8.12. može se uočiti da je vrednost pH tokom kultivacije soja PAP LIST 4 na medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom bila iznad kritične vrednosti (5,5) u svim ogledima, izuzev kada je u drugoj fazi pripreme inokuluma proizvodni soj umnožavan na medijumu formulacije iz ogleda broj 8 (66,67% ekstrakta kvasca, 16,67% sladnog

ekstrakta i 16,67% peptona). Vrednosti sadržaja TDS u medijumima za biosintezu sa sirovim glicerolom, dobijenim u primenjenim eksperimentalnim uslovima, takođe su prikazane u tabeli 8.12. Izmerene vrednosti ovog parametra kretale su se od 3,75 g/l do 4,56 g/l. U poređenju sa prethodno diskutovanim rezultatima (tabela 8.11) može se uočiti da varijacije u sastavu medijuma za pripremu inokuluma ne utiču u velikoj meri na promenu sadržaja TDS u medijumu za biosintezu. Nije uočena drastična razlika ni kada je izvršeno poređenje vrednosti sadržaja TDS u medijumima za biosintezu dobijenim u svim sprovedenim fazama istraživanja.

Po završetku bioprocasa primenom soja PAP LIST 4, prethodno umnoženog na medijumima različite formulacije, određen je sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu, a dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 5.27.

Tabela 5.27. Uticaj različitog odnosa sastojaka sa azotom u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4

Redni broj ogleda	P (g/l)			
	Ekstrakt kvasca (g/l)	Sladni ekstrakt (g/l)	Pepton (g/l)	Y
1	11,0	0	0	4,49
2	0	11,0	0	10,01
3	0	0	11,0	9,96
4	5,5	5,5	0	7,77
5	5,5	0	5,5	8,05
6	0	5,5	5,5	10,18
7	3,7	3,7	3,7	9,38
8	7,3	1,8	1,8	5,71
9	1,8	7,3	1,8	10,22
10	1,8	1,8	7,3	9,47
11	11,0	0	0	4,13
12	0	11,0	0	10,14
13	0	0	11,0	9,69

Y, P-sadržaj biosintetisanog ksantana.

Rezultati predstavljeni u tabeli 5.27. pokazuju da je u svim ogleđima došlo do produkcije ksantana i da je najveća koncentracija ksantana u medijumu za biosintezu od 10,22 g/l ostvarena ako se za drugu fazu pripreme inokuluma koristio medijum formulacije iz ogleđa broj 9. Pomenuti medijum sadržao je 16,67% ekstrakta kvasca, 66,67% sladnog ekstrakta i 16,67% peptona. U ogleđima broj 6, 12, 2, 3, 13 i 7 ostvarene su nešto niže koncentracije ksantana u medijumu za biosintezu, i to 10,18 g/l, 10,14 g/l, 10,01 g/l, 9,96 g/l, 9,69 g/l i 9,38 g/l, redom. Prema dobijenim rezultatima, najniža koncentracija ksantana u proizvodnom medijumu ostvarena je kada je medijum formulacije iz ogleđa broj 11 korišćen kao medijum za drugu fazu pripreme inokuluma. Navedeni medijum od variranih sastojaka sa azotom sadržao je samo ekstrakt kvasca. Takođe, niska koncentracija ksantana u medijumu za biosintezu dobijena je ako se priprema inokuluma odvijala na medijumima formulacije iz ogleđa broj 1 i 8. Prvi medijum je istog sastava kao i medijum iz ogleđa broj 11 (ponovljeni eksperiment sa 100% ekstrakta kvasca), dok je medijum formulacije iz ogleđa broj 8 sadržao 66,67% ekstrakta kvasca, 16,67% sladnog ekstrakta i 16,67% peptona.

Dobijeni rezultati ukazuju na to da medijumi sa velikom koncentracijom ekstrakta kvasca nisu najpogodniji za umnožavanje soja PAP LIST 4 u drugoj fazi pripreme inokuluma za biosintezu ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom. Pored toga, a na osnovu prethodno diskutovanih rezultata može se zaključiti da je najveća koncentracija ksantana u medijumu za biosintezu, u primenjenim eksperimentalnim uslovima, ostvarena kada je medijum za drugu fazu pripreme inokuluma sadržao sladni ekstrakt u najvećoj koncentraciji.

#### 5.4.2.2. Generisanje modela za oglede izvedene sa ciljem definisanja odnosa sastojaka sa azotom u medijumu za pripremu inokuluma

Kako bi se definisao optimalan odnos sastojaka sa azotom u medijumu za umnožavanje soja PAP LIST 4 u drugoj fazi pripreme inokuluma za biosintezu ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom, nakon uspešno izvedenih statistički dizajniranih eksperimenata potrebno je generisati adekvatan model koji opisuje uticaj variranih parametara na posmatrani odziv. Za dobijanje detaljnog uvida o uticaju ispitivanih faktora na uspešnost izvođenja biosinteze ksantana u primenjenim eksperimentalnim uslovima, kao i u cilju kvantifikacije faktorskih efekata i njihovih interakcija, vršena je analiza eksperimentalnih podataka primenom odgovarajućih softverskih paketa.

Prvi korak predstavljao je matematičko modelovanje eksperimentalno dobijenih rezultata za sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu (Y) prikazanih u tabeli 5.27. Uspešnost fitovanja prikazanih podataka odabranim modelom (jednačina 4.9) procenjena je na osnovu vrednosti koeficijenta determinacije, a procena adekvatnosti i značajnosti generisanog matematičkog modela izvršena je primenom analize varijanse. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 5.28.

Tabela 5.28. Analiza varijanse modelovanog odziva: sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima sa različitim odnosima sastojaka sa azotom

Odziv	Poreklo								
	Rezidual			Model					
	SS	DF	MS	SS	DF	MS	F-vrednost	p-vrednost	R <sup>2</sup>
Y	2,010	7	0,287	975,168	6	165,528	566,402	<0,000001	0,967

*SS – suma kvadrata; DF – stepen slobode; MS – srednja vrednost kvadrata; R<sup>2</sup> – koeficijent determinacije*

Prema rezultatima predstavljenim u tabeli 5.28. koeficijent determinacije je veoma visok i iznosi 0,967, što ukazuje na dobru korelaciju između eksperimentalnih i modelom predviđenih vrednosti sadržaja biosintetisanog ksantana. Mali procenat varijacija u vrednostima sadržaja produkovanog ksantana nije mogao biti objašnjen generisanom regresionom jednačinom (3,30%), što je rezultat uticaja faktora koji ovim eksperimentima nisu obuhvaćeni. Poređenje eksperimentalno dobijenih vrednosti i vrednosti predviđenih modelom prikazano je i grafički na slici 8.2. (Prilog 2). Predstavljeni rezultati ukazuju da se eksperimentalne vrednosti ostvarene u ovoj fazi istraživanja nalaze veoma blizu linije najboljeg fitovanja.

Adekvatnost generisanog matematičkog modela ispitana je pomoću Fišerovog testa, a njegova statistička značajnost, u intervalu poverenja od 95%, potvrđena analizom  $p$ -vrednosti. S obzirom da su  $F$ -vrednosti prikazane u tabeli 5.28. manje od tabličnih vrednosti za odgovarajući stepen slobode primenjenog eksperimentalnog plana, definisani model smatra se pogodnim za opisivanje uticaja variranih faktora na posmatrani odziv. Izuzetno niska  $p$ -vrednost prikazana u istoj tabeli potvrđuje da je dobijeni matematički model statistički značajan u zadatom intervalu poverenja.

### Matematički model za sadržaj ksantana

Eksperimentalni podaci koji se odnose na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku bioprocasa (tabela 5.27) fitovani su polinomom drugog reda (jednačina 4.9) pri čemu je generisana regresiona jednačina koja opisuje uticaj variranih sastojaka sa azotom u medijumu za pripremu inokuluma na vrednost pomenutog odziva:

$$Y=0,041987 \cdot X_1 + 0,101778 \cdot X_2 + 0,098161 \cdot X_3 + 0,000236 \cdot X_1 \cdot X_2 \\ + 0,000333 \cdot X_1 \cdot X_3 + 0,000191 \cdot X_2 \cdot X_3 \quad (5.2)$$

gde su:

$Y$  - sadržaj biosintetisanog ksantana,

$X_1$ , - udeo ekstrakta kvasca,

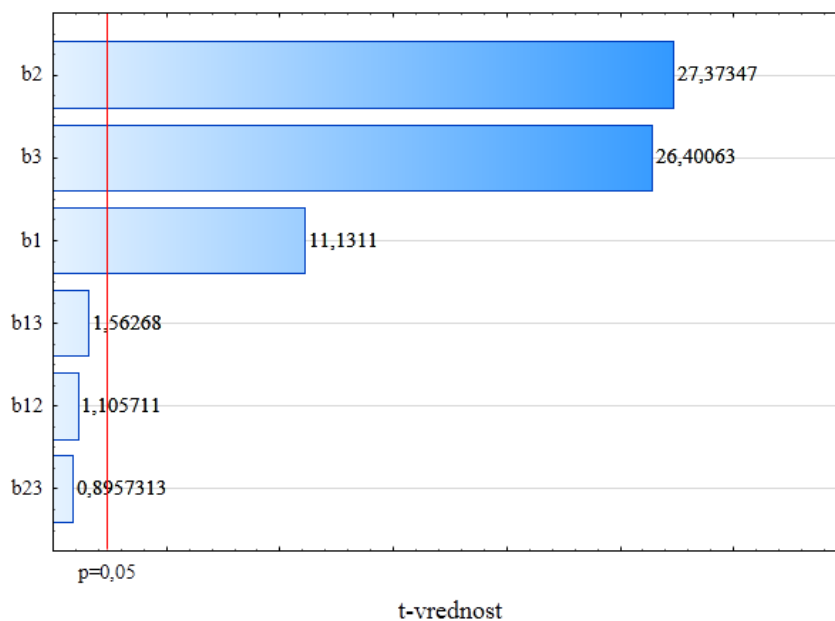
$X_2$  - udeo sladnog ekstrakta i

$X_3$  - udeo peptona.

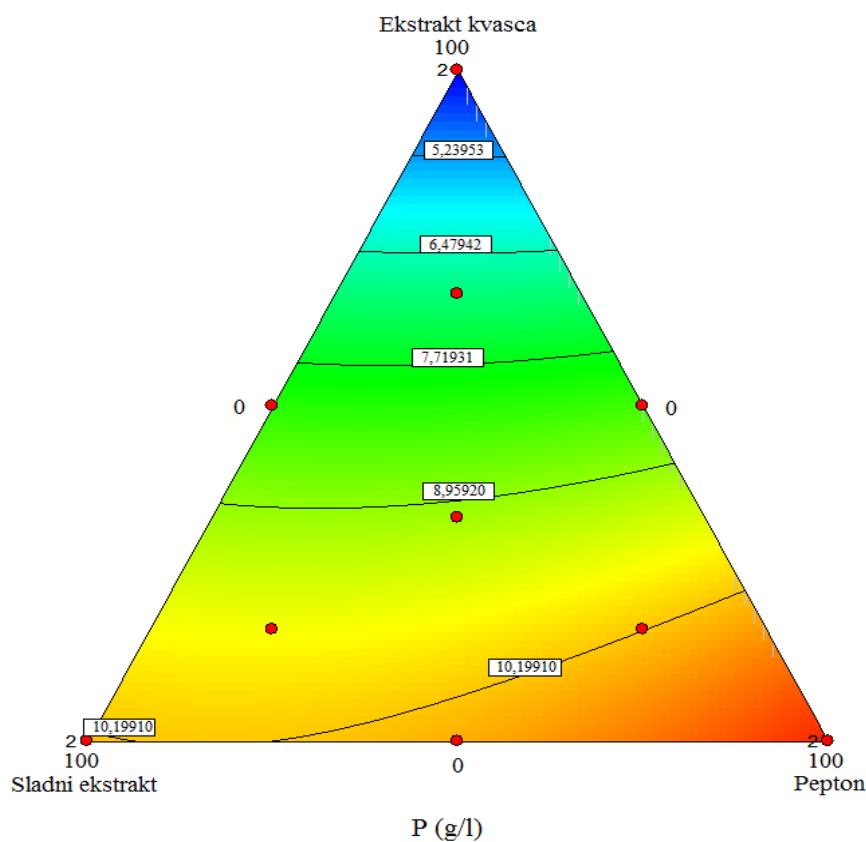
Statistička značajnost koeficijenata u generisanoj jednačini (5.2) procenjena je na osnovu  $p$ -vrednosti, dok je intenzitet njihovog uticaja određen poređenjem  $t$ -vrednosti prikazanih na Pareto grafiku. Pareto grafik standardizovanih efekata na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima sa različitim odnosima sastojaka sa azotom prikazan je na slici 5.28.

Rezultati prikazani na slici 5.28. ukazuju na to da svi linearni koeficijenti variranih parametara ( $b_1$ ,  $b_2$  i  $b_3$ ) statistički značajno utiču na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 izvedene u primenjenim eksperimentalnim uslovima, ali i da sladni ekstrakt u medijumu za pripremu inokuluma ima najznačajniji uticaj na produkciju biopolimera u primenjenim eksperimentalnim uslovima. Sa druge strane, koeficijenti interakcije variranih parametara ( $b_{12}$ ,  $b_{13}$  i  $b_{23}$ ) nemaju statistički značajan uticaj na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom. Posmatrajući grafički prikazane rezultate može se videti i da su pojedinačni uticaji sladnog ekstrakta i peptona u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma skoro ujednačeni.

Rezultati matematičkog modelovanja (jednačina 5.2) prikazani su i grafički na slici 5.29, konturnim dijagramom koji prikazuje uticaj promene udela ekstrakta kvasca, sladnog ekstrakta i peptona u medijumu za drugu fazu umnožavanja soja PAP LIST 4, na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom.



Slika 5.28. Pareto grafik standardizovanih efekata na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima sa različitim odnosima sastojaka sa azotom



Slika 5.29. Zavisnost sadržaja ksantana (P) u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 od odnosa sastojaka sa azotom u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma

Analizom grafički predstavljenih rezultata na slici 5.29. uočava se da se najviše vrednosti sadržaja ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 postižu ako se za drugu fazu pripreme inokuluma primenjuje medijum sa maksimalnim udelom peptona, ali i sladnog ekstrakta, dok udeo ekstrakta kvasca može biti minimalan. Prema rezultatima prikazanim na istoj slici predviđeno je da se najmanji sadržaj ksantana ostvaruje ako se za drugu fazu umnožavanja proizvodnog soja koristi medijum sa maksimalnim udelom ekstrakta kvasca.

Dobijeni rezultati sugerišu da udeli sladnog ekstrakta i peptona u medijumu za umnožavanje soja PAP LIST 4 u drugoj fazi pripreme inokuluma, imaju najznačajniji uticaj na uspešnost biosinteze ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom u primenjenim eksperimentalnim uslovima.

#### 5.4.2.3. Optimizacija odnosa sastojaka sa azotom u medijumu za pripremu inokuluma

Prilikom optimizacije sastava medijuma za umnožavanje soja PAP LIST 4 u drugoj fazi pripreme inokuluma za biosintezu ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom u pogledu odnosa sastojaka sa azotom korišćena je metoda željene funkcije u kombinaciji sa prethodno generisanim matematičkim modelom (jednačina 5.2). U skladu sa definisanim ciljem istraživanja, zadatak ove optimizacije je postizanje maksimalne koncentracije ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 u primenjenim eksperimentalnim uslovima. Optimalne vrednosti variranih parametara i procenjena vrednost posmatranog odziva, za najveću moguću vrednosti ukupne željene funkcije, prikazane su u tabeli 5.29.

Tabela 5.29. Optimalne vrednosti variranih parametara i predviđeni odziv: odnos sastojaka sa azotom u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma

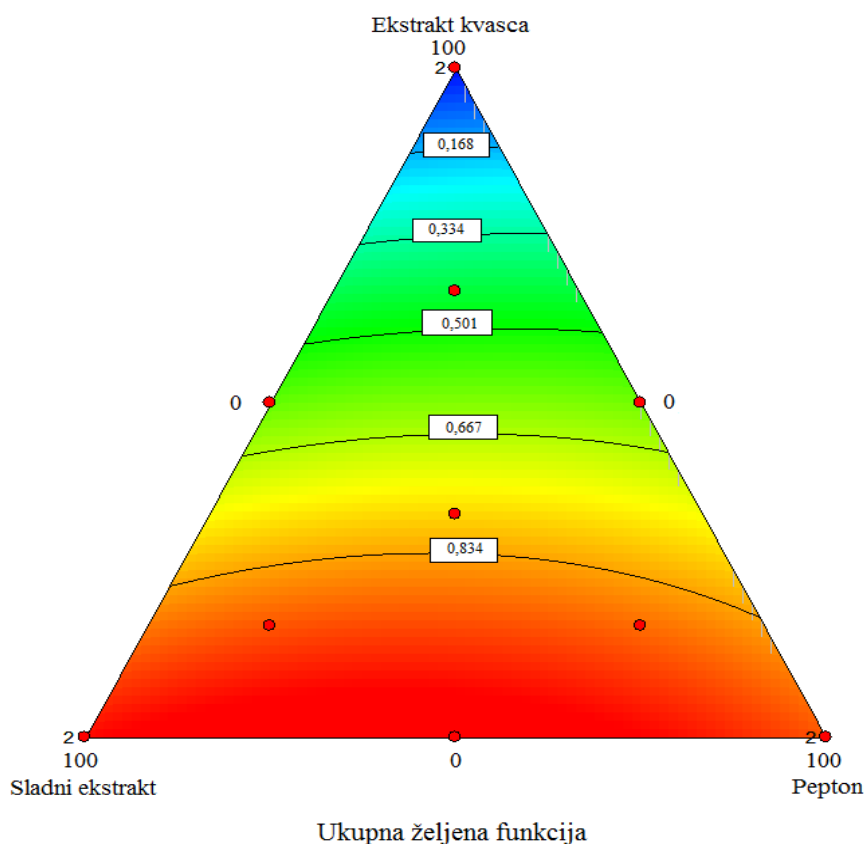
Promenljive	Uslovi	Granične vrednosti	Optimalne vrednosti
Udeo ekstrakta kvasca (%)	u opsegu	0-100	0
Udeo sladnog ekstrakta (%)	u opsegu	0-100	100
Udeo peptona (%)	u opsegu	0-100	0
Odziv		Predviđene vrednosti	
P (g/l)	maksimalan	4,13-10,22	10,18
Ukupna željena funkcija			0,992

*P-sadržaj biosintetisanog ksantana.*

Rezultati prikazani u tabeli 5.29. pokazuju da, ako se kao jedini cilj optimizacije definiše postizanje maksimalnog sadržaja ksantana u medijumu za biosintezu, prema predviđanjima modela, posmatrani odziv će imati vrednost od 10,18 g/l ukoliko medijum za drugu fazu pripreme inokuluma sadrži samo sladni ekstrakt, odnosno ukoliko udeo ove komponente iznosi 100,00%. Ukupna željena funkcija u ovom slučaju ima vrednost 0,992.



Optimizacioni rezultati prikazani su i grafički, konturnim dijagramom koji pokazuje zavisnost vrednosti ukupne željene funkcije od udela ekstrakta kvasca, sladnog ekstrakta i peptona u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma, a dat je na slici 5.30.



Slika 5.30. Zavisnost vrednosti ukupne željene funkcije od odnosa sastojaka sa azotom u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma

Analizom prikazanog konturnog dijagrama (slika 5.30) evidentno je da se najveća vrednost ukupne željene funkcije postiže ako se za drugu fazu pripreme inokuluma koristi medijum sa maksimalnim udelom sladnog ekstrakta ili peptona, dok udeo ekstrakta kvasca u ovom slučaju može biti minimalan. Takođe, vrednost ukupne željene funkcije je maksimalna ako medijum za umnožavanje soja PAP LIST 4 sadrži i sladni ekstrakt i pepton u promenljivom udelu (0-100%). Najniže vrednosti željene funkcije postižu se kada medijum za drugu fazu pripreme inokuluma sadrži samo ekstrakt kvasca.

Ukoliko se izvrši poređenje cena ekstrakta kvasca, sladnog ekstrakta i peptona koje iznose oko 250 €/kg, 5 €/kg i 100 €/kg ([www.sigmaaldrich.com/RS/en:3.7.2021](http://www.sigmaaldrich.com/RS/en:3.7.2021); [www.biomarket.rs/:3.7.2021](http://www.biomarket.rs/:3.7.2021)), redom, jasno je da je predviđeno optimizaciono rešenje značajno i sa ekonomskog aspekta te da doprinosi razvoju ekonomski isplativog postupka proizvodnje ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom jer se skupoceni ekstrakt kvasca menja mnogo jeftinijom sirovinom, kao što je sladni ekstrakt. U ovom slučaju sadržaj ksantana u medijumu sa

sirovim glicerolom po završetku bioprocesa povećao se za nešto više od 10%, u odnosu na prethodnu fazu istraživanja (tabela 5.25).

Osim što je ekonomičniji, sladni ekstrakt je, u poređenju sa ekstraktom kvasca i peptonom, nutritivno bogatiji jer pored azotnih komponenti sadrži lako fermentabilne šećere od kojih je dominantno prisutna maltoza, koja je naročito pogodan izvor ugljenika za rast i razmnožavanje bakterija roda *Xanthomonas*. Pored toga, sadni ekstrakt sadrži i različite vitamine i minerale neophodne za umnožavanje biomase proizvodnog mikroorganizma.

Dobijeni rezultati sugerišu da se dizajn smeše pokazao kao funkcionalan eksperimentalni plan za kreiranje ogleđa koji su za cilj imali definisanje najpogodnijeg odnosa sastojaka sa azotom u medijumu za umnožavanje soja PAP LIST 4 u drugoj fazi pripreme inokuluma za biosintezu ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom. Primenom generisanog matematičkog modela u kombinaciji sa metodom željene funkcije izvršena je optimizacija sastava pomenutog medijuma, pri čemu je procenjeno da je medijum najpogodnije formulacije onaj sa 100% sladnog ekstrakta, pored 40% glukoze i 60% sirovog glicerola. Medijum pomenutog sastava korišćen je kao medijum za drugu fazu pripreme inokuluma u daljim istraživanjima.

### **5.4.3. Definisanje sadržaja sastojaka medijuma za pripremu inokuluma i koncentracije inokuluma u medijumu za biosintezu**

Nakon odabira najpogodnijih sastojaka medijuma za drugu fazu pripreme inokuluma za biosintezu ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom, naredni korak u optimizaciji sastava medijuma za umnožavanje ćelija proizvodnog soja u drugoj fazi pripreme inokuluma predstavlja definisanje njihovog optimalnog sadržaja, a potrebno je definisati i optimalnu koncentraciju inokuluma koja se dodaje u medijum za biosintezu. Kako bi se postigao željeni cilj, u nastavku istraživanja priprema inokuluma je izvedena na medijumima formulisanim u skladu sa odabranim eksperimentalnim dizajnom (poglavlje 4.8), dok je biosinteza ksantana započeta dodatkom različite koncentracije inokuluma u proizvodni medijum na bazi sirovog glicerola (poglavlje 4.2.2). Opsezi u kojima su varirani ispitivani parametri definisani su nakon detaljne analize podataka iz dostupne naučne i stručne literature (Casas i sar., 2000; Leela i Sharma, 2000; Wang i sar., 2016; Demirci i sar., 2019). Primenom postupka odzivne površine, a na osnovu eksperimentalno dobijenih podataka, definisani su matematički modeli koji opisuju uticaj ispitivanih parametara na odabrani odziv. Optimizacija je izvedena primenom metode željene funkcije u kombinaciji sa generisanim matematičkim modelom.

#### **5.4.3.1. Eksperimentalni rezultati ogleđa izvedenih sa ciljem definisanja sadržaja sastojaka medijuma za pripremu inokuluma i koncentracije inokuluma u medijumu za biosintezu**

Odabir odgovarajućeg eksperimentalnog plana ključan je korak u primeni postupka odzivne površine. Prilikom ispitivanja uticaja tri faktora na posmatrani proces najčešće se primenjuje Boks-Benkenov dizajn jer se u poređenju sa drugim eksperimentalnim planovima pokazao kao efikasniji (Ferreira i sar., 2007). Iz navedenog razloga je Boks-Benkenov plan sa tri faktora na tri nivoa i tri ponavljanja u centralnoj tački korišćen u okviru ovih istraživanja. Ovako dizajnirani

eksperimenti podrazumevali su izvođenje 15 nezavisnih kultivacija soja PAP LIST 4 na medijumu za biosintezu, koje su započete dodatkom variranih količina inokuluma prethodno pripremljenih pri tačno definisanim vrednostima odabranih sastojaka medijuma (tabela 4.4), dok su ostali parametri bili identični u svim sprovedenim ogledima (poglavlja 4.3, 4.4 i 4.5). Po završetku bioprocasa, izvršena je analiza medijuma za biosintezu kako bi se potvrdila mogućnost produkcije ksantana i procenila uspešnost njegovog izvođenja. Da bi se ustanovilo da li je došlo do biosinteze željenog biopolimera vršena su reološka merenja medijuma za biosintezu (poglavlje 4.6.2), a kao pokazatelj uspešnosti bioprocasa u ovoj fazi istraživanja određivan je sadržaj ksantana u istom medijumu (poglavlje 4.5). Dobijeni medijumi analizirani su i u pogledu vrednosti pH i sadržaja TDS (poglavlje 4.6.2).

Reološka svojstva medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom, dobijenih po završetku kultivacije soja PAP LIST 4, koji je prethodno umnožen na medijumima sa različitim sadržajem odabranih sastojaka, a zatim dodat u različitim koncentracijama, prikazana su u tabeli 5.30.

Tabela 5.30. Reološke karakteristike medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima sa različitim sadržajem sastojaka i dodatog u različitim koncentracijama

Redni broj ogleda	Glu:Gly (g/l)	Sladni ekstrakt (g/l)	Inokulum (%,v/v)	K [Pa·s <sup>n</sup> ]	n [1]	η <sub>a</sub> [mPa·s]
1	5	5	10	0,2919	0,4902	27,90
2	15	5	10	0,1743	0,5252	19,57
3	5	15	10	0,2939	0,4546	23,84
4	15	15	10	0,1933	0,5084	20,09
5	5	10	5	0,1748	0,5685	23,96
6	15	10	5	0,2266	0,4969	22,34
7	5	10	15	0,2570	0,4385	19,36
8	15	10	15	0,1460	0,5258	16,44
9	10	5	5	0,2236	0,4999	22,35
10	10	15	5	0,2271	0,5097	23,75
11	10	5	15	0,1131	0,5816	16,47
12	10	15	15	0,1216	0,5890	18,32
13	10	10	10	0,1175	0,5652	15,86
14	10	10	10	0,1088	0,5819	15,86
15	10	10	10	0,1054	0,5938	16,23

*K* – faktor konzistencije; *n* – indeks toka; η<sub>a</sub> – prividni viskozitet; Glu:Gly- glukoza i sirovi glicerol dodati u odnosu 40:60.

Rezultati prikazani u tabeli 5.30. pokazuju da su se vrednosti indeksa toka medijuma za biosintezu, analiziranih u ogledima iz okvira ove faze istraživanja, kretale u opsegu od 0,4385 do 0,5938. Dobijene vrednosti sugerišu da medijumi za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4, prethodno umnoženog na medijumima sa različitim sadržajem nutrijenata i dodatog u različitim koncentracijama, poseduju pseudoplastične karakteristike, što predstavlja siguran pokazatelj produkcije ksantana. Vrednosti faktora konzistencije medijuma analiziranih u ovoj fazi kretale su se u intervalu od 0,1054 Pa·s<sup>n</sup> do 0,2939 Pa·s<sup>n</sup> (tabela 5.30). I u ovom slučaju različite vrednosti faktora konzistencije prikazane u tabeli 5.30. ukazuju na razliku u količini i kvalitetu ksantana biosintetisanog u primenjenim eksperimentalnim uslovima. Na osnovu vrednosti indeksa toka i faktora konzistencije izračunati su prividni viskoziteti kultivacionih medijuma za biosintezu.

Podaci dati u tabeli 5.30. ukazuju na to da su se vrednosti prividnog viskoziteta medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4, prethodno umnoženog na medijumima sa različitim sadržajem nutrijenata i dodatog u različitim koncentracijama, kretale od 15,86 mPa·s do 27,90 mPa·s. Dobijeni rezultati sugerišu da se prilikom izvođenja oglada broj 1 (5,00 g/l izvora ugljenika, 5,00 g/l izvora azota i 10%(v/v) inokuluma) dobija medijum za biosintezu najvećeg prividnog viskoziteta (27,90 mPa·s) u poređenju sa rezultatima delovanja istog soja u ostalim ogledima. Medijum najmanje vrednosti prividnog viskoziteta od 15,86 mPa·s ostvaren je prilikom izvođenja oglada broj 14 (10,00 g/l izvora ugljenika, 10,00 g/l izvora azota i 10%(v/v) inokuluma).

Po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 uzorci medijuma za biosintezu iz svih 15 oglada su analizirani i u pogledu vrednosti pH i sadržaja TDS. Vrednosti pH analiziranih uzoraka prikazane su u tabeli 8.13. koja je data u Prilogu 1. Izmerene vrednosti pH medijuma za biosintezu kretale su se od 5,90 do 6,11, što ukazuje na to da je vrednost pH tokom kultivacije soja PAP LIST 4 na medijumu sa sirovim glicerolom u svim ogledima bila iznad kritične vrednosti (5,5). Vrednosti sadržaja TDS u medijumima za biosintezu sa sirovim glicerolom, dobijenim nakon kultivacije soja PAP LIST 4 u primenjenim eksperimentalnim uslovima, takođe su prikazane u tabeli 8.13. Izmerene vrednosti sadržaja TDS u medijumima za biosintezu kretale su se od 3,54 g/l do 4,01 g/l. Dobijeni rezultati pokazuju da ne dolazi do drastičnih promena u sadržaju TDS u medijumima za biosintezu, te da se ove vrednosti ne razlikuju značajno od vrednosti dobijenih u svim prethodnim fazama istraživanja.

Uticaj variranih sadržaja sastojaka medijuma za drugu fazu pripreme inokuluma i koncentracije dodatog inokuluma na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu, kao i na rezidualni sadržaj izvora ugljenika, rezidualni sadržaj asimilabilnog azota i rezidualni sadržaj ukupnog azota u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma prikazan je u tabeli 5.31.

Tabela 5.31. Uticaj različitog sadržaja sastojaka medijuma za drugu fazu pripreme inokuluma i koncentracije inokuluma u medijumu sa sirovim glicerolom na pokazatelje uspešnosti biosinteze ksantana primenom soja PAP LIST 4

Redni broj ogleda	Glu:Gly (g/l)	Sladni ekstrakt (g/l)	Inokulum (%,v/v)	P (g/l)	S (g/l)	N <sub>as</sub> (mg/l)	N <sub>uk</sub> (mg/l)
				Y			
1	5	5	10	10,52	1,84	2,80	203,00
2	15	5	10	9,74	5,75	8,40	266,00
3	5	15	10	9,97	4,42	4,20	196,00
4	15	15	10	9,63	8,07	2,80	196,00
5	5	10	5	10,50	2,81	2,80	203,00
6	15	10	5	10,05	8,98	11,20	287,00
7	5	10	15	9,25	2,97	5,60	238,00
8	15	10	15	8,99	7,38	9,80	273,00
9	10	5	5	9,67	4,43	8,40	280,00
10	10	15	5	10,47	6,65	7,00	175,00
11	10	5	15	9,50	4,93	11,20	280,00
12	10	15	15	8,85	6,52	9,00	266,00
13	10	10	10	9,95	4,21	9,80	280,00
14	10	10	10	9,53	4,01	12,60	294,00
15	10	10	10	9,47	3,65	11,20	273,00

Glu:Gly- glukoza i sirovi glicerol dodati u odnosu 40:60; Y, P-sadržaj biosintetisanog ksantana; S-rezidualni sadržaj izvora ugljenika; N<sub>as</sub>-rezidualni sadržaj asimilabilnog azota; N<sub>uk</sub>-rezidualni sadržaj ukupnog azota.

Podaci predstavljeni u tabeli 5.31. pokazuju da je po završetku kultivacije soja PAP LIST 4, prethodno umnoženog na medijumima sa različitim sadržajem nutrijenata i dodatog u različitim koncentracijama, ostvarena proizvodnja različite količine ksantana u medijumu za biosintezu. Može se primetiti da se sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu po završetku bioprocasa kretao od 8,85 g/l do 10,52 g/l. Najveći sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu ostvaren je prilikom izvođenja ogleđa broj 1, gde su varirane vrednosti ispitivanih parametara iznosile 5 g/l za početni sadržaj izvora ugljenika, 5 g/l za početni sadržaj izvora azota i 10%(v/v) za koncentraciju dodatog inokuluma. Sa druge strane, najmanja produkcija biopolimera ostvarena prilikom izvođenja ogleđa broj 12 u kom su vrednosti početnog sadržaja izvora ugljenika, početnog sadržaja izvora azota i koncentracije dodatog inokuluma iznosile 10 g/l, 15 g/l i 15%(v/v), redom.

Rezultati prikazani u tabeli 5.31, koji se odnose na rezidualni sadržaj izvora ugljenika u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma, predstavljaju ustvari sadržaj glicerola koji je zaostao nakon umnožavanja soja PAP LIST 4 jer je primenjenom insitumentalnom metodom analize detektovano odsustvo glukoze i maltoze u svim uzorcima. Ovo ukazuje na to da primenjeni proizvodni mikroorganizam, u ovoj fazi izvođenja bioprocasa, najpre metaboliše pomenute lako usvojive šećere pa tek onda glicerol. Na osnovu dobijenih rezultata može se primetiti da se rezidualni sadržaj izvora ugljenika u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma kretao od 1,84 g/l do 8,98 g/l. Najmanja vrednost ovog parametra ostvarena je prilikom izvođenja ogleđa broj 1 (5 g/l glukoze i glicerola, 5 g/l sladnog ekstrakta i 10%(v/v) inokuluma), u kojem je istovremeno ostvaren i najveći sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu. Dosta nizak sadržaj izvora ugljenika u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma po završetku umnožavanja proizvodnog soja zaostao je i u okviru ogleđa broj 5 (2,81 g/l), 7 (8,97 g/l) i 15 (3,65 g/l). Kod ovih ogleđa početni sadržaj glukoze i glicerola u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma iznosio je 5,00 g/l (ogleđi 1, 5 i 7), odnosno 10,00 g/l (ogled 15). Sa druge strane, najveći sadržaj izvora ugljenika u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma zaostao je prilikom realizacije ogleđa broj 6. U ovom eksperimentu glukoza i glicerol inicijalno su dodati u maksimalnoj koncentraciji (15,00 g/l). Iako je nakon izvođenja ogleđa broj 6 zaostalo najviše izvora ugljenika u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma, sadržaj produkovanog ksantana u medijumu za biosintezu imao je relativno visoku vrednost i iznosio je 10,05 g/l. Dosta veliki sadržaj izvora ugljenika u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma zaostao je i pri izvođenju ogleđa broj 4 (8,07 g/l) i 8 (7,38 g/l). I kod ovih ogleđa glukoza i glicerol dodati su u maksimalnoj ispitivanoj koncentraciji (15,00 g/l). Dobijeni rezultati sugerišu da se prilikom umnožavanja proizvodnog soja na medijumu sa koncentracijom glukoze i glicerola od 5,00 g/l do 10,00 g/l postiže visok sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu uz minimalan rezidualni sadržaj izvora ugljenika u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma.

Prema rezultatima prikazanim u tabeli 5.31. rezidualni sadržaj asimilabilnog azota u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma po završetku umnožavanja proizvodnog soja kretao od 2,80 mg/l do 12,60 mg/l. Najmanji sadržaj asimilabilnog azota u ovom medijumu zaostao je nakon izvođenja ogleđa broj 1, 4 i 5, gde je sladni ekstrakt dodat u koncentracijama od 5,00 g/l, 15,00 g/l i 10,00 g/l, redom. Najveći sadržaj asimilabilnog azota zaostao je u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma pri realizaciji ogleđa broj 14, gde su sva tri ispitivana parametra imala srednju variranu vrednost (10,00 g/l glukoze i glicerola, 10,00 g/l sladnog ekstrakta i 10%(v/v) inokuluma). Dobijeni rezultati sugerišu da različite kombinacije sadržaja glukoze i glicerola u

odnosu 40:60 i sladnog ekstrakta u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma različito utiču na stepen iskorišćenja asimilabilnog azota.

Rezultati prikazani u tabeli 5.31. pokazuju da se rezidualni sadržaj ukupnog azota u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma u okviru ove faze istraživanja kretao od 175,00 mg/l do 294,00 mg/l. Najmanji sadržaj ukupnog azota u medijumu za drugu fazu umnožavanja proizvodnog soja zaostao je pri izvođenju ogleda broj 10, gde je početni sadržaj sladnog ekstrakta iznosio 15,00 g/l. U ovom ogledu je ostvarena i visoka koncentracija ksantana u medijumu za biosintezu (10,47 g/l). Dosta niska vrednost rezidualnog sadržaja ukupnog azota u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma ostvarena je i u ogledima broj 3 i 4, gde je početni sadržaj sladnog ekstrakta iznosio po 15,00 g/l. Pri izvođenju ovih ogleda ksantan je produkovan u koncentraciji manjoj od 10,00 g/l. Najveći sadržaj ukupnog azota u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma zaostao je u ogledu broj 14 (10 g/l glukoze i glicerola, 10 g/l sladnog ekstrakta i 10%(v/v) inokuluma), pri čemu je u medijumu za biosintezu produkovan ksantan u koncentraciji od 9,53 g/l. Ukoliko se obrati pažnja na prethodno diskutovane rezultate može se uočiti da je ovaj rezultat u saglasnosti sa rezultatima za rezidualni sadržaj asimilabilnog azota u istom ogledu.

Analizirajući sve prethodno diskutovane rezultate može se zaključiti da veće koncentracije sastojaka medijuma za drugu fazu pripreme inokuluma u kombinaciji sa najvećim procentom inokuluma u medijumu za biosintezu rezultuju slabijom produkcijom ksantana, dok manje koncentracije sastojaka medijuma za umnožavanje proizvodnog soja dovode do ostvarivanja većeg sadržaja biosintetisanog ksantana u proizvodnom medijumu. U skladu sa tim, evidentno je da se maksimalna produkcija ksantana na medijuma sa sirovim glicerolom ostvaruje ako medijum za drugu fazu pripreme inokuluma sadrži glukozu i glicerol u odnosu 40:60 i sladni ekstrakt u koncentraciji od po 5,00 g/l i ako se 10%(v/v) ovako pripremljenog inokuluma doda u medijum za biosintezu. Prilikom ovako izvedenog ogleda u medijumu za pripremu inokuluma zaostaje najmanja količina variranih nutrijenata. U dostupnoj naučnoj literaturi ne postoje podaci o optimizaciji sastava medijuma za pripremu inokuluma u proizvodnji ksantana. Međutim, u mnogim istraživanjima vezanim za biosintezu ksantana praktikuje se dodatak inokuluma u koncentraciji od 10%(v/v) (Gumus i sar., 2010; Reis i sar., 2010), što je u saglasnosti sa eksperimentalnim rezultatima ostvarenim u ovoj fazi istraživanja. Iako je utvrđeno da kombinacije različitog sadržaja glukoze i glicerola i sladnog ekstrakta u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma utiču na stepen iskorišćenja ovih nutrijenata, ali i na prinos ksantana, potrebna su dodatna analiziranja kako bi se definisale optimalne vrednosti variranih parametara pri kojima se ostvaruje najveća uspešnost ispitivanog bioprocasa.

#### **5.4.3.2. Generisanje modela za ogleda izvedene sa ciljem definisanja sadržaja sastojaka medijuma za pripremu inokuluma i koncentracije inokuluma u medijumu za biosintezu**

Generisanje adekvatnog modela za opisivanje uticaja variranih parametara na posmatrani odziv predstavlja veoma važan korak koji prethodi optimizaciji bioprocasa. U nastavku istraživanja izvedeno je matematičko modelovanje eksperimentalno dobijenih rezultata za sadržaj biosintetisanog ksantana prikazanih u tabeli 5.31. Kako bi se definisala relacija koja opisuje uticaj variranih parametara na odabrani pokazatelj uspešnosti bioprocasa, eksperimentalni podaci

(tabela 5.31) fitovani su polinomom drugog reda (jednačina 4.10). Uspešnost fitovanja eksperimentalno dobijenih rezultata odabranim modelom procenjena je na osnovu vrednosti koeficijenta determinacije, a ispitane su i adekvatnost i značajnost generisanog matematičkog modela primenom analize varijanse. Rezultati analize varijanse modelovanog odziva i koeficijent determinacije prikazani su u tabeli 5.32.

Tabela 5.32. Analiza varijanse modelovanog odziva: sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima sa različitim sadržajem sastojaka i dodatog u različitim koncentracijama

Odziv	Poreklo								
	Rezidual			Model					
	SS	DF	MS	SS	DF	MS	F-vrednost	p-vrednost	R <sup>2</sup>
Y	0,274	5	0,055	1426,244	10	142,624	2606,202	<0,000001	0,926

SS – suma kvadrata; DF – stepen slobode; MS – srednja vrednost kvadrata; R<sup>2</sup> – koeficijent determinacije.

Posmatrajući rezultate predstavljene u tabeli 5.32. može se primetiti da koeficijent determinacije iznosi 0,926 što ukazuje na to da je ostvarena veoma dobra veza između eksperimentalnih i modelom predviđenih vrednosti sadržaja biosintetisanog ksantana. Definisanim matematičkim modelom nije moglo biti objašnjeno 7,40% od ukupnih varijacija, koje predstavljaju efekte onih faktora koji nisu uključeni u modelovanje te nisu bili od interesa u ovom istraživanju. Da se eksperimentalne vrednosti veoma dobro poklapaju sa vrednostima koje su predviđene primenom generisanog modela potvrđuju i rezultati prikazani na slici 8.13. (Prilog 2).

Adekvatnost generisanog matematičkog modela proverena je pomoću Fišerovog testa, dok je njihova statistička značajnost u intervalu poverenja od 95% potvrđena analizirajući p-vrednosti. S obzirom da je F-vrednost prikazana u tabeli 5.32 manja od tabličnih vrednosti za odgovarajući stepen slobode primenjenog eksperimentalnog plana, definisani kvadratni model smatra se pogodnim za opisivanje uticaja variranih faktora na posmatrani odziv. Izuzetno niska p-vrednost prikazana u istoj tabeli potvrđuje da je model polinoma drugog reda statistički značajan u zadanom intervalu poverenja.

### Matematički model za sadržaj ksantana

Eksperimentalni podaci koji se odnose na sadržaj ksantana u medijumu sa sirovim glicerolom po završetku bioprocasa (tabela 5.31) su fitovani polinomom drugog reda pri čemu je generisana regresiona jednačina koja opisuje uticaj sadržaja variranih faktora na vrednost pomenutog odziva:

$$Y = 11,110000 - 0,264800 \cdot X_1 - 0,007800 \cdot X_2 + 0,141500 \cdot X_3 + 0,007800 \cdot X_1^2 + 0,004800 \cdot X_2^2 - 0,005900 \cdot X_3^2 + 0,004400 \cdot X_1 \cdot X_2 + 0,001900 \cdot X_1 \cdot X_3 - 0,014500 \cdot X_2 \cdot X_3 \quad (5.3)$$

gde su:

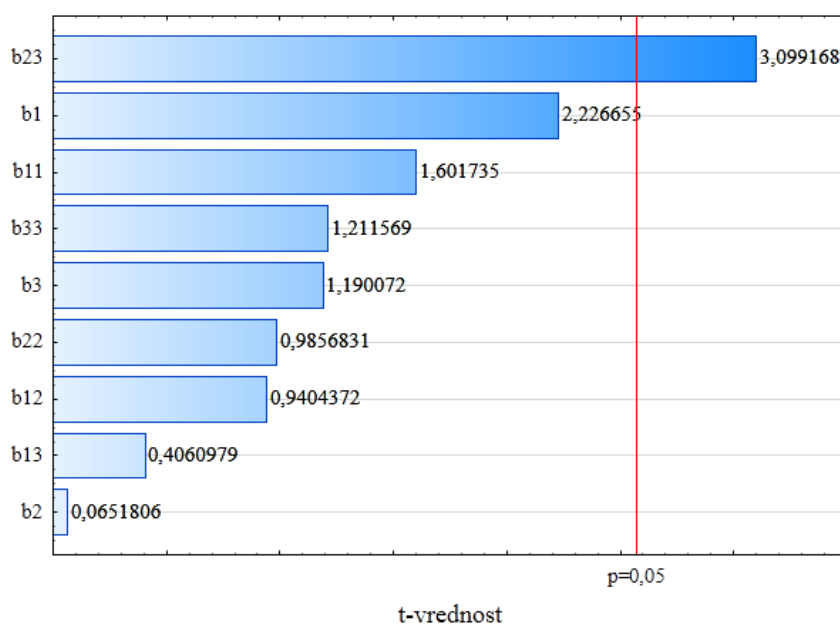
Y- sadržaj biosintetisanog ksantana,

$X_1$ , - sadržaj glukoze i glicerola u odnosu 40:60,

$X_2$  - sadržaj sladnog ekstrakta i

$X_3$  - koncentracija inokuluma.

Statistička značajnost koeficijenata u generisanoj jednačini procenjena je na osnovu  $p$ -vrednosti, a intenzitet njihovog uticaja određen je poređenjem  $t$ -vrednosti prikazanih na Pareto grafiku. Pareto grafik standardizovanih efekata na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4, prethodno umnoženog na medijumima sa različitim sadržajem sastojaka ,edijuma za drugu fazu pripreme inokuluma i dodatog u različitim koncentracijama u medijum za biosintezu, prikazan je na slici 5.31.



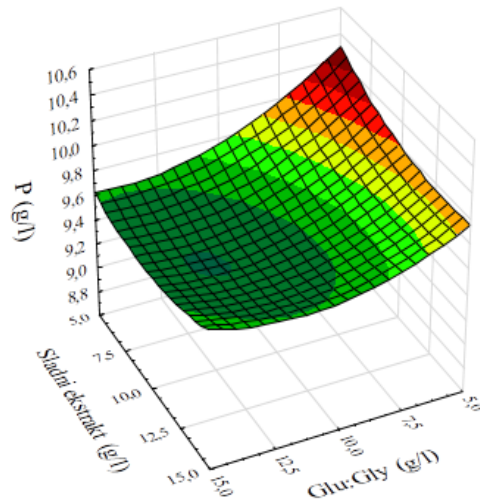
Slika 5.31. Pareto grafik standardizovanih efekata na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima sa različitim sadržajem sastojaka i dodatog u različitim koncentracijama

Rezultati prikazani na slici 5.31. ukazuju da koeficijent interakcije sadržaja sladnog ekstrakta i koncentracije dodatog inokuluma ( $b_{23}$ ) statistički značajno utiče na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 u primenjenim eksperimentalnim uslovima. Negativan predznak ovog koeficijenta prikazan u jednačini 5.3. ukazuje na antagonistički efekat pomenutih parametara. Efekti linearnog ( $b_1$ ) i kvadratnog člana sadržaja glukoze i glicerola ( $b_{11}$ ), linearnog ( $b_2$ ) i kvadratnog člana sladnog ekstrakta ( $b_{22}$ ), linearnog ( $b_3$ ) i kvadratnog člana koncentracije dodatog inokuluma ( $b_{33}$ ), kao i ostalih koeficijenata interakcije ( $b_{12}$  i  $b_{13}$ ) nisu pokazali statistički značajan uticaj na vrednost posmatranog odziva u intervalu poverenja od 95%.

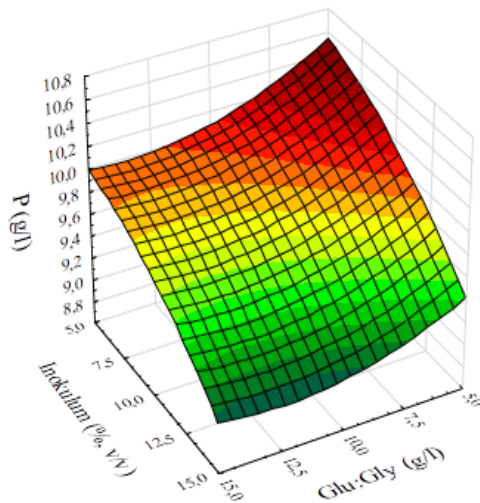
U cilju boljeg razumevanja ustanovljenih efekata, generisan matematički model (jednačina 5.3) predstavljen je i grafički, trodimenzionalnim odzivnim površinama na slikama 5.32.a-c. Svaki grafik prikazuje modelom predviđen uticaj dva faktora na posmatrani odziv pri konstantnoj vrednosti trećeg.



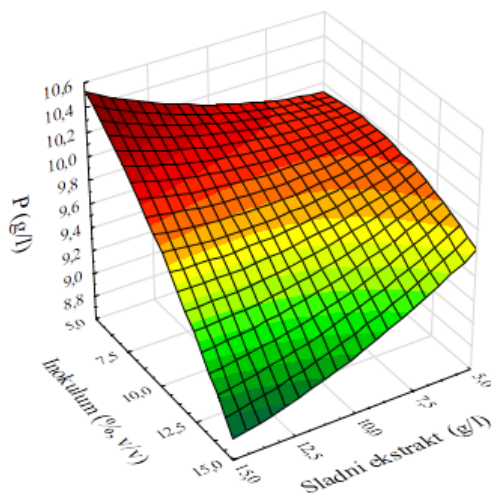
a)



b)



c)



Slika 5.32. Sadržaj ksantana (P) u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima sa različitim sadržajem sastojaka i dodatog u različitim koncentracijama u funkciji dva faktora pri konstantnoj vrednosti trećeg:

- a) koncentracija inokuluma (10%, v/v)
- b) sadržaj sladnog ekstrakta (10 g/l)
- c) sadržaj Glu:Gly (10 g/l)

Na slici 5.32.a prikazan je modelom predviđen uticaj početnog sadržaja glukoze i glicerola dodatih u odnosu 40:60 (Glu:Gly) i sladnog ekstrakta u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu pri koncentraciji inokuluma od 10%(v/v). Analizom grafički predstavljenih rezultata može se uočiti da, ako je početna koncentracija glukoze i glicerola u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma konstantna i ima vrednost veću od 7,50 g/l, povećanje sadržaja sladnog ekstrakta u istom medijumu ne utiče na produkciju željenog biopolimera. Sa druge strane, ako se početna koncentracija glukoze i glicerola u medijumu za umnožavanje ćelija proizvodnog soja nalazi u intervalu od 5,00 g/l do 7,50 g/l, obogaćivanje istog medijuma slanim ekstraktom utiče na smanjenje sadržaja ksantana u medijumu za biosintezu. Pored toga, pri konstantnom početnom sadržaju sladnog ekstrakta u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma dolazi do smanjenja sadržaja ksantana u medijumu za biosintezu sa povećanjem početnog sadržaja glukoze i glicerola u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma pri čemu je ovaj trend izraženiji u medijumima sa nižom ispitivanom koncentracijom sladnog ekstrakta. Najveća vrednost sadržaja ksantana od oko 10,30 g/l u medijumu za biosintezu predviđena je ako medijum za drugu fazu pripreme inokuluma inicijalno sadrži oko 5,00 g/l sladnog ekstrakta i 5,00 g/l glukoze i glicerola (40:60).

Slika 5.32.b prikazuje predikciju sadržaja ksantana u medijumu za biosintezu pri konstantnom početnom sadržaju sladnog ekstrakta u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma od 10,00 g/l i pri variranim vrednostima koncentracije inokuluma koji se dodaje u medijum za biosintezu i početnog sadržaja glukoze i glicerola (40:60) u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma. Rezultati predstavljeni na pomenutoj slici ukazuju da povećanjem koncentracije inokuluma, pri konstantnom početnom sadržaju glukoze i glicerola u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma, dolazi do smanjenja sadržaja ksantana u medijumu za biosintezu. Sa druge strane, i prilikom povećanja početnog sadržaja glukoze i glicerola u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma, pri konstantnoj vrednosti koncentracije inokuluma koji se dodaje u medijum za biosintezu, takođe dolazi do smanjenja sadržaja ksantana u medijumu za biosintezu, s tim da je ovaj trend slabije izražen od prethodno pomenutog i gotovo je neprimetan ako bioproces započne dodatnom veće količine inokuluma. Sadržaj ksantana veći od 10,40 g/l predviđen je pri koncentraciji inokuluma od 5,00%(v/v) do 7,00%(v/v) i početnom sadržaju glukoze i glicerola (40:60) u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma od oko 5,00 g/l.

Slika 5.32c ilustruje modelom predviđen uticaj koncentracije inokuluma i početnog sadržaja sladnog ekstrakta u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu pri konstantnom sadržaju glukoze i glicerola u medijumu za pripremu inokuluma od 10,00 g/l. Rezultati predstavljeni na pomenutoj slici sugerišu da, pri konstantnoj koncentraciji inokuluma, promena sadržaja sladnog ekstrakta u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma ne utiče značajno na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu, osim u slučaju kada se koncentracija inokuluma dodatog u proizvodni medijum nalazi u opsegu od 5,00%(v/v) do 7,50%(v/v). Tada porast početnog sadržaja sladnog ekstrakta u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma pozitivno utiče na biosintezu ksantana. Sa druge strane, ukoliko se početni sadržaj sladnog ekstrakta u medijumu za umnožavanje ćelija proizvodnog soja u drugoj fazi pripreme inokuluma održava konstantnim na bilo kojoj vrednosti iz analiziranog intervala, povećanjem koncentracije inokuluma dolazi do smanjenja sadržaja ksantana u medijumu za biosintezu. Najveći sadržaj ksantana od oko 10,50 g/l predviđen je ako početna

koncentracija sladnog ekstrakta u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma iznosi oko 15,00 g/l i ako se pripremljeni inokulum u medijum za biosintezu dodaje od 5,00%(v/v).

#### 5.4.3.3. Optimizacija sadržaja sastojaka medijuma za pripremu inokuluma i koncentracije inokuluma u medijumu za biosintezu

Nakon generisanja matematičkog modela (jednačina 5.3), za koji je ustanovljeno da je statistički značajan i da adekvatno opisuje uticaj nezavisnih promenljivih (početni sadržaj glukoze i glicerola dodatih u odnosu 40:60 i sladnog ekstrakta u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma, koncentracija dodatog inokuluma), na odabrani odziv (sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu), sledeći korak predstavlja definisanje optimalnih vrednosti ispitivanih faktora, a sve sa ciljem ostvarivanja najveće uspešnosti bioprocasa i ekonomičnosti čitavog proizvodnog postupka. Stoga su, kao uslovi optimizacije, zadati postizanje maksimalne koncentracije biosintetisanog ksantana uz minimalan utrošak sastojaka medijuma koji će se koristiti u drugoj fazi pripreme inokuluma, kao i uz minimalnu koncentraciju inokuluma koji se dodaje u medijum za biosintezu. Za definisane željene funkcije izvedena je optimizacija analiziranih faktora primenom odgovarajuće metodologije. Optimalne vrednosti variranih parametara, kao i procenjena vrednost posmatranog odziva za najveću moguću vrednost ukupne željene funkcije prikazane su u tabeli 5.33.

Tabela 5.33. Optimalne vrednosti variranih parametara i predviđeni odziv: sadržaj sastojaka medijuma za drugu fazu pripreme inokuluma i koncentracija inokuluma u medijumu za biosintezu

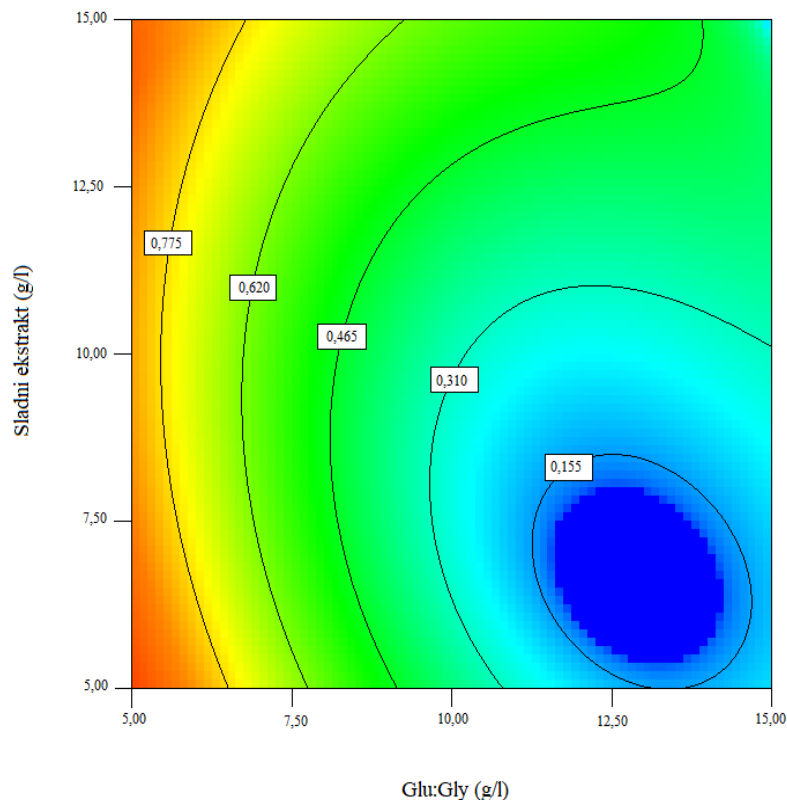
Promenljive	Uslovi	Granične vrednosti	Optimalne vrednosti
Glu:Gly (g/l)	minimalan	5,00-15,00	5,00
Sladni ekstrakt (g/l)	minimalan	5,00-15,00	5,00
Inokulum (% , v/v)	minimalan	5,00-15,00	5,19
Odzivi			Predviđene vrednosti
P (g/l)	maksimalan	8,85-10,52	10,42
<b>Ukupna željena funkcija</b>			<b>0,980</b>

*Glu:Gly- glukoza i sirovi glicerol dodati u odnosu 40:60; Y, P-sadržaj biosintetisanog ksantana.*

Rezultati prikazani u tabeli 5.33. pokazuju da je vrednost ukupne željene funkcije visoka i iznosi 0,980. Optimalne vrednosti ispitivanih faktora, pri kojima željena funkcija ima najveću vrednost, su početni sadržaj glukoze i glicerola od 5,00 g/l, početni sadržaj sladnog ekstrakta od 5,00 g/l i koncentracija inokuluma od 5,19%(v/v). Za ovako definisane vrednosti variranih parametara modelom predviđena vrednost posmatranog odziva, odnosno sadržaja biosintetisanog ksantana iznosi 10,42 g/l.

Optimizacioni rezultati prikazani su i grafički, konturnim dijagramom koji pokazuje zavisnost vrednosti ukupne željene funkcije od početnog sadržaja glukoze i glicerola i ekstrakta kvasca u

medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma pri konstantnoj, optimalnoj koncentraciji inokuluma dodatog u proizvodni medijum (5,19% v/v), a dat je na slici 5.33.



Slika 5.33. Zavisnost vrednosti ukupne željene funkcije od sadržaja glukoze i glicerola, kao i sladnog ekstrakta u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma pri konstantnoj koncentraciji inokuluma u medijumu za biosintezu od 5,19% (v/v)

Analizom rezultata predstavljenih na slici 5.33. može se uočiti da, ako je početni sadržaj sladnog ekstrakta u medijumu za drugu fazu pripreme inokuluma konstantan, povećanjem početnog sadržaja glukoze i glicerola dodatih u odnosu 40:60 u istom medijumu dolazi do smanjenja vrednosti ukupne željene funkcije, što važi u čitavom ispitivanom opsegu. Sa druge strane, ukoliko je početni sadržaj glukoze i glicerola u medijumu za umnožavanje ćelija odabranog proizvodnog soja u drugoj fazi pripreme inokuluma konstantan, povećanjem sadržaja sladnog ekstrakta u istom medijumu ne dolazi do značajne promene vrednosti ukupne željene funkcije u ispitivanom opsegu. Međutim, pri konstantnom početnom sadržaju glukoze i glicerola od 10,00 g/l do 15,00 g/l, povećanje sadržaja sladnog ekstrakta neznatno utiče na povećanje vrednosti ukupne željene funkcije. Prema prikazanim rezultatima soj PAP LIST 4 će u medijumu za biosintezu ostvariti najveću produktivnost i ukupna željena funkcija će imati najveću vrednost ukoliko je prethodno umnožen na medijumu sa početnim sadržajem glukoze i glicerola od 5,00 g/l i istim početnim sadržajem sladnog ekstrakta.

Iako se sadržaj biosintetisanog ksantana nije značajno povećao u odnosu na prethodno izvedenu fazu istraživanja (tabela 5.29), rezultati ovih ogleda su značajni ukoliko se posmatraju sa ekonomskog stanovišta biotehnoške proizvodnje jer se količina glukoze i glicerola i sladnog ekstrakta, koja se dodaje u medijum za drugu fazu pripreme inokuluma, može smanjiti za 50%. Na povećanje ekonomičnosti ispitivanog bioprocasa utiče i optimalna vrednost koncentracije inokuluma koja je za 50% manja. Dobijeni rezultati upućuju na konstataciju da se Boks-Benkenov dizajn pokazao kao funkcionalan eksperimentalni plan za kreiranje ogleda koji su za cilj imali optimizaciju sadržaja sastojaka medijuma za drugu fazu pripreme inokuluma i koncentracije inokuluma u medijumu za biosintezu ksantana. Definisane optimalne vrednosti variranih parametara korišćene su u nastavku istraživanja, odnosno umnožavanje soja PAP LIST 4 je u drugoj fazi pripreme inokuluma izvedeno na medijumu sa 5 g/l glukoze i glicerola (40:60) i 5 g/l sladnog ekstrakta, dok je dobijeni inokulum u medijum za biosintezu dodavan u koncentraciji od 5%(v/v).

#### **5.4.4. Definisane vremena trajanja pripreme inokuluma**

Nakon odabira najpogodnijih sastojaka medijuma za drugu fazu pripreme inokuluma, definisanja njihovih optimalnih koncentracija, kao i koncentracije inokuluma koji se dodaje u proizvodni medijum, naredni korak u standardizaciji pripreme inokuluma za biosintezu ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom primenom soja PAP LIST 4 predstavlja optimizaciju vremena trajanja pripreme inokuluma. Prethodno diskutovani rezultati u okviru poglavlja 5.3. sugerišu da je sojevima roda *Xanthomonas* neophodan određen vremenski period za adaptaciju na sirovi glicerol kao izvor ugljenika u medijumu za biosintezu ksantana. Shodno tome, i prilikom standardizacije medijuma za pripremu inokuluma je uzeto u obzir da vreme trajanja pripreme inokuluma može da utiče na uspešnost biosinteze ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom, u primenjenim eksperimentalnim uslovima. Prema podacima iz dostupne naučne literature uobičajeno vreme trajanja pripreme inokuluma kreće se od 24 h do 48 h (Mirik i sar., 2011; Da Silva i sar., 2018). Uzimajući u obzir prethodno navedeno, u nastavku istraživanja priprema inokuluma je izvedena u skladu sa odabranim eksperimentalnim dizajnom (tabela 4.5) gde je vreme trajanje umnožavanje proizvodnog soja u obe faze varirano u navedenom opsegu. Primenom postupka odzivne površine, a na osnovu eksperimentalno dobijenih podataka, definisan je matematički model koji opisuje uticaj ispitivanih parametara na odabrani odziv. Optimizacija je izvedena primenom metode željene funkcije u kombinaciji sa generisanim matematičkim modelom.

##### **5.4.4.1. Eksperimentalni rezultati ogleda izvedenih sa ciljem definisanja vremena trajanja pripreme inokuluma**

Sa ciljem pripreme inokuluma, umnožavanje soja PAP LIST 4 izvedeno je u dva koraka na različitim medijumima. U prvom koraku umnožavanja korišćen je komercijalni medijum YMB<sup>®</sup> (HiMedia, Indija), dok je u drugom koraku primenjen medijum prethodno optimizovane formulacije (poglavljje 5.4.3). Svi uslovi pripreme inokuluma bili su identični za obe faze (poglavljje 4.3), osim vremena trajanja inkubacije koje je varirano (tabela 4.5). Pripremljeni inokulumi dodati su u jednakim koncentracijama u medijume za biosintezu na bazi sirovog glicerola (poglavljje 4.3), a zatim je vršena njihova inkubacija u trajanju od 168 h.

U okviru ovih istraživanja eksperimenti su izvedeni u skladu sa faktorijalnim dizajnom koji obuhvata variranje dva faktora na tri nivoa i tri ponavljanja u centralnoj tački. Ovako dizajnirani eksperimenti podrazumevali su izvođenje 11 nezavisnih kultivacija soja PAP LIST 4 na medijumima odgovarajuće formulacije (poglavlje 4.2) u tačno definisanim procesnim uslovima (poglavlje 4.4). Po završetku kultivacije, izvršena je analiza medijuma za biosintezu kako bi se potvrdila mogućnost produkcije ksantana i procenila uspešnost izvođenja bioprocesa. Kako bi se ustanovilo da li je došlo do produkcije željenog biopolimera vršena su reološka merenja medijuma za biosintezu (poglavlje 4.6.2), a kao pokazatelj uspešnosti bioprocesa u ovoj fazi istraživanja određivan je sadržaj ksantana u istom medijumu (poglavlje 4.5). Dobijeni medijumi analizirani su i u pogledu vrednosti pH i sadržaja TDS (poglavlje 4.6.2).

Reološka svojstva medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4, prethodno umnoženog na medijumu za pripremu inokuluma optimizovane formulacije u različitom trajanju, prikazana su u tabeli 5.34.

Tabela 5.34. Reološke karakteristike medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumu za pripremu inokuluma optimizovane formulacije u različitom trajanju

Redni broj ogleda	$t_I$ (h)	$t_{II}$ (h)	$K$ [Pa·s <sup>n</sup> ]	$n$ [1]	$\eta_a$ [mPa·s]
1	24	24	0,1699	0,5361	20,06
2	24	36	0,2383	0,4849	22,23
3	24	48	0,3864	0,4378	29,02
4	36	24	0,1572	0,5518	19,95
5	36	36	0,2248	0,4898	21,45
6	36	48	0,3492	0,4618	29,29
7	48	24	0,1430	0,5649	19,28
8	48	36	0,1699	0,5361	20,06
9	48	48	0,3819	0,4396	28,92
10	36	36	0,2903	0,4643	24,63
11	36	36	0,1615	0,5747	22,78

$K$  – faktor konzistencije;  $n$  – indeks toka;  $\eta_a$  – prividni viskozitet;  
 $t_I$ , vreme trajanja prve faze pripreme inokuluma;  $t_{II}$ , vreme trajanja  
druge faze pripreme inokuluma.

Vrednosti indeksa toka medijuma za biosintezu analiziranih u ovoj fazi istraživanja kretale su se u intervalu od 0,4378 do 0,5747 (tabela 5.33). Na osnovu prikazanih vrednosti ovog reološkog parametra, koje se nalaze između 0 i 1, može se zaključiti da medijumi za biosintezu sa sirovim glicerolom dobijeni po završetku kultivacije soja PAP LIST 4, prethodno umnoženog na medijumu za pripremu inokuluma optimizovane formulacije u različitom trajanju, poseduju pseudoplastične karakteristike što predstavlja pouzdan pokazatelj produkcije ksantana. Vrednosti faktora konzistencije medijuma za biosintezu analiziranih u ovoj fazi istraživanja kretale su se od 0,1430 Pa·s<sup>n</sup> do 0,3864 Pa·s<sup>n</sup> (tabela 5.34). Dobijeni rezultati sugerišu da različite vrednosti faktora konzistencije medijuma prikazane u tabeli 5.34. ukazuju na razliku u količini i kvalitetu ksantana biosintetisanog u primenjenim eksperimentalnim uslovima prilikom kultivacije proizvodnog mikroorganizma na medijumu sa sirovim glicerolom. Na osnovu vrednosti indeksa toka i faktora konzistencije izračunati su prividni viskoziteti kultivacionih medijuma.

Rezultati prikazani u tabeli 5.34. ukazuju na to da su se vrednosti prividnog viskoziteta medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4, prethodno umnoženog na medijumu za pripremu inokuluma optimizovane formulacije u različitom trajanju, kretale u intervalu od 19,28 mPa·s do 29,29 mPa·s. Dobijeni rezultati sugerišu da se prilikom izvođenja ogleđa broj 6 ostvaruje najveća vrednost prividnog viskoziteta medijuma za biosintezu u poređenju sa ostalim ogleđima. U okviru ovog ogleđa prva i druga faza pripreme inokuluma izvedene su u trajanju od 36 h i 48 h, redom. Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 5.33. može se primetiti da je najmanja vrednost prividnog viskoziteta medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom ostvarena u okviru ogleđa broj 7, gde su inkubacije prve i druge pasaže inokuluma trajale 48 h i 24 h, redom. Navedeni rezultati ukazuju na to da se najveće vrednosti prividnog viskoziteta medijuma za biosintezu ostvaruju kada druga faza pripreme inokuluma traje duže od prve faze, što može biti posledica izvora ugljenika prisutnih u primenjenim medijumima. Navedena konstatacija može se potkrepiti činjenicom da je sojevima roda *Xanthomonas* potrebno duže vreme kako bi se adaptirali na medijum sa sirovim glicerolom i koristili ovaj izvor ugljenika za rast i razmnožavanje, a zatim i za produkciju ksantana (Wang i sar., 2016).

Uzorci medijuma za biosintezu dobijenih nakon izvođenja svih 11 ogleđa u okviru ovog istraživanja analizirani su u pogledu vrednosti pH i sadržaja TDS. Izmerene vrednosti pH prikazane su u tabeli 8.14., koja se nalazi u Prilogu 2. Rezultati dati u pomenutoj tabeli pokazuju da su se vrednosti pH medijuma za biosintezu dobijenih u primenjenim eksperimentalnim uslovima kretale od 6,33 do 6,75. Dobijeni rezultati ukazuju da vrednost pH ni u jednom ogleđu nije opala ispod kritične vrednosti (5,5), što je značajno iz ugla ekonomske isplativosti bioprocasa, jer ukazuje na potencijalnu proizvodnju ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom bez potrebe i troškova korigovanja vrednosti pH tokom izvođenja samog bioprocasa. Vrednosti sadržaja TDS u medijumima za biosintezu sa sirovim glicerolom dobijenim nakon kultivacije soja PAP LIST 4 u ovoj fazi istraživanja takođe su prikazane u tabeli 8.13. Izmerene vrednosti sadržaja TDS kretale su se od 4,31 g/l do 4,53 g/l. Dobijeni rezultati pokazuju da ne dolazi do drastičnih promena u sadržaju TDS u medijumima za biosintezu dobijenim po završetku bioprocasa izvedenih u primenjenim eksperimentalnim uslovima, te da je vrednost sadržaja TDS u navedenim medijumima bila u granicama potrebnim za nesmetanu metaboličku aktivnost proizvodnog mikroorganizma.

Prethodno prodiskutovani rezultati ukazuju da je u svim izvedenim ogleđima došlo do biosinteze ksantana. Međutim, da bi se optimizovalo vreme pripreme inokuluma potrebno je uzeti u obzir i vrednosti pokazatelja uspešnosti posmatranog bioprocasa. Sadržaj ksantana, koji je biosintetisan tokom izvođenja eksperimenata čiji je krajnji cilj definisanje vremena pripreme inokuluma, prikazan je u tabeli 5.35.

Rezultati prikazani u tabeli 5.35. ukazuju da je kultivacija odabranog proizvodnog soja u primenjenim eksperimentalnim uslovima rezultovala različitom produkcijom ksantana. Iz medijuma za biosintezu dobijenih po završetku bioprocasa izdvojeno je od 7,41 g/l do 10,46 g/l ksantana, što ukazuje da vreme pripreme inokuluma utiče na sadržaj produkovanog biopolimera. Najveća koncentracija ksantana u medijumu za biosintezu ostvarena je po završetku ogleđa broj 6. U navedenom ogleđu prva faza pripreme inokuluma trajala je 36 h, a vreme trajanja druge faze pripreme inokuluma iznosilo je 48 h. Sa druge strane, najmanja količina ksantana u

medijumu za biosintezu ostvarena je po završetku ogleđa broj 4 i 7. Vreme trajanja prve i druge faze pripreme inokuluma u navedenim ogledima iznosilo je 36 h i 24 h, odnosno 48 h i 24 h, redom.

Tabela 5.35. Uticaj vremena trajanja pripreme inokuluma na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumu za pripremu inokuluma optimizovane formulacije

Redni broj ogleđa	P(g/l)		Y
	$t_I$ (h)	$t_{II}$ (h)	
1	24	24	7,70
2	24	36	8,17
3	24	48	9,80
4	36	24	7,41
5	36	36	9,39
6	36	48	10,46
7	48	24	7,41
8	48	36	8,50
9	48	48	9,49
10	36	36	9,64
11	36	36	9,54

$t_I$ , vreme trajanja prve faze pripreme inokuluma;

$t_{II}$ , vreme trajanja druge faze pripreme inokuluma;

Y, P-sadržaj biosintetisanog ksantana.

Dobijeni rezultati sugerišu da je najniži sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu ostvaren kada je vreme prve faze pripreme inokuluma bilo u opsegu od 36 h do 48 h, odnosno kada je druga pasaza inokuluma inkubirana u najmanjem ispitivanom vremenskom periodu (24 h), što ukazuje da je, za veću produkciju biopolimera delovanjem soja PAP LIST 4 u primenjenim eksperimentalnim uslovima, neophodno da druga faza pripreme inokuluma traje duže od 24 h.

#### 5.4.4.2. Generisanje modela za oglede izvedene sa ciljem definisanja vremena trajanja pripreme inokuluma

Kako bi se definisalo optimalno vreme trajanja pripreme inokuluma za ostvarivanje maksimalne produkcije ksantana prilikom kultivacije soja PAP LIST 4 na medijumu sa sirovim glicerolom, nakon uspešno izvedenih statistički dizajniranih eksperimenata potrebno je generisati adekvatan model koji opisuje uticaj variranih parametara na posmatrani odziv. U cilju dobijanja detaljnijih informacija o uticaju ispitivanih faktora na uspešnost izvođenja biosinteze ksantana u primenjenim eksperimentalnim uslovima, kao i u cilju kvantifikacije faktorskih efekata i njihovih interakcija, vršena je analiza eksperimentalnih podataka primenom odgovarajućih softverskih paketa.

U nastavku istraživanja izvedeno je matematičko modelovanje eksperimentalno dobijenih rezultata za sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu prikazanih u tabeli 5.35. Uspešnost fitovanja dobijenih podataka odabranim modelom (jednačina 4.11), ali i adekvatnost generisanog modela procenjeni su na osnovu vrednosti statističkih parametara. Rezultati analize varijanse modelovanog odziva i koeficijent determinacije prikazani su u tabeli 5.36.



Tabela 5.36. Analiza varijanse modelovanog odziva: sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumu za pripremu inokuluma optimizovane formulacije u različitom trajanju

Odziv	Poreklo								
	Rezidual			Model					
	SS	DF	MS	SS	DF	MS	F-vrednost	p-vrednost	R <sup>2</sup>
Y	0,933	5	0,187	875,0790	6	145,846	781,961	<0,000001	0,918

*SS – suma kvadrata; DF – stepen slobode; MS – srednja vrednost kvadrata; R<sup>2</sup> – koeficijent determinacije.*

Rezultati prikazani u tabeli 5.36. ukazuju na to da vrednost koeficijenta determinacije iznosi 0,918, što govori da je ostvarena jaka veza između eksperimentalnih i modelom predviđenih vrednosti sadržaja biosintetisanog ksantana. Definisanim matematičkim modelom nije moglo biti objašnjeno 8,22% ukupnih varijacija, koje predstavljaju efekte onih faktora koji nisu uključeni u modelovanje, te nisu bili od interesa u ovom istraživanju. Pogodnost primenjenog modela za opisivanje uticaja vremena pripreme inokuluma na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu potvrđena je i prema grafički prikazanim rezultatima na slici 8.4. (Prilog 2).

Adekvatnost odabranog matematičkog modela procenjena je pomoću Fišerovog testa, a njegova statistička značajnost, u intervalu poverenja od 95%, potvrđena analizirajući *p*-vrednosti. Posmatrajući *F*-vrednosti prikazane u tabeli 5.36, može se ustanoviti da su manje od tabličnih vrednosti za odgovarajući stepen slobode primenjenog eksperimentalnog plana, što znači da je definisani model pogodan za opisivanje uticaja variranih faktora na odabrani odziv. Pored toga, model polinoma drugog reda modelovanog odziva je statistički značajan u intervalu poverenja od 95%, na šta ukazuje izuzetno niska *p*-vrednosti prikazana u istoj tabeli.

### Matematički model za sadržaj ksantana

Nakon izvršenog fitovanja eksperimentalnih podataka, koji se odnose na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku bioprocasa (tabela 5.35) polinomom drugog reda (jednačina 4.11) dobijena je regresiona jednačina koja opisuje uticaj variranih faktora na pomenuti odziv:

$$Y = -2,06973 + 0,36694 \cdot X_1 + 0,17058 \cdot X_2 - 0,00514 \cdot X_1^2 - 0,00096 \cdot X_2^2 - 0,00002 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad (5.4)$$

gde su:

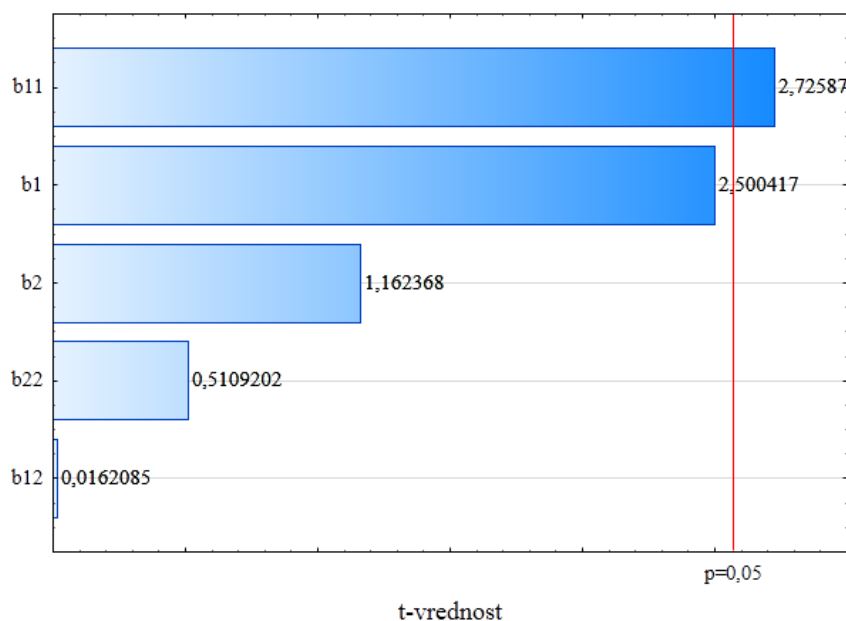
Y- sadržaj biosintetisanog ksantana,

X<sub>1</sub>, - vreme trajanja prve faze pripreme inokuluma i

X<sub>2</sub> - vreme trajanja druge faze pripreme inokuluma.

Statistička značajnost koeficijenata u jednačini 5.4. procenjena je na osnovu *p*-vrednosti, dok je intenzitet njihovog uticaja određen poređenjem *t*-vrednosti prikazanih na Pareto grafiku. Pareto grafik standardizovanih efekata na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim

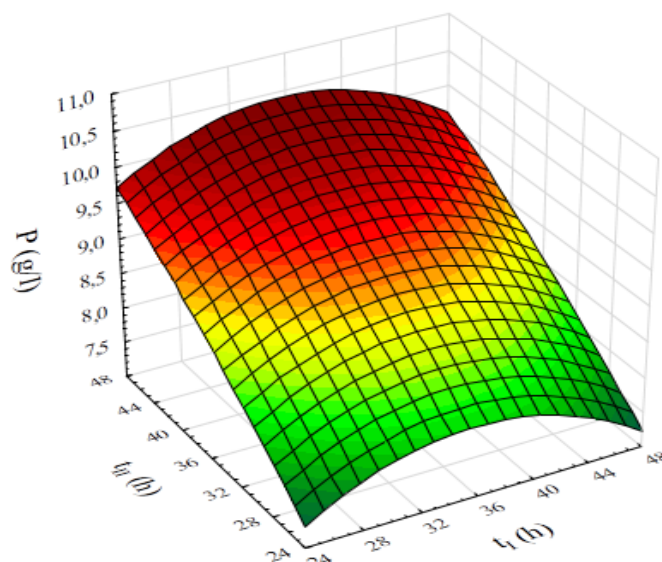
glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4, prethodno umnoženog na medijumu za pripremu inokuluma optimizovane formulacije u različitom trajanju, prikazan je na slici 5.34.



Slika 5.34. Pareto grafik standardizovanih efekata na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumu za pripremu inokuluma optimizovane formulacije u različitom trajanju

Analizom rezultata prikazanih na slici 5.34. može se uočiti da kvadratni član vremena trajanja prve faze pripreme inokuluma ( $b_{11}$ ) statistički značajno utiče na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku bioprocasa. Pored toga, dobijeni rezultati ukazuju da efekti linearnog ( $b_2$ ) i kvadratnog člana vremena trajanja druge faze pripreme inokuluma ( $b_{22}$ ), linearni član vremena trajanja prve faze pripreme inokuluma ( $b_1$ ), kao i član koji ukazuje na interakciju variranih parametara ( $b_{12}$ ) nisu pokazali statistički značajan uticaj na vrednost posmatranog odziva u intervalu poverenja od 95%.

Odzivna površina, koja prikazuje modelom (jednačina 5.4) predviđenu zavisnost sadržaja ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom od vremena trajanja prve i druge faze pripreme inokuluma, data je na slici 5.35.



Slika 5.35. Sadržaj ksantana (P) u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumu za pripremu inokuluma optimizovane formulacije u funkciji vremena trajanja prve ( $t_I$ ) i druge faze pripreme inokuluma ( $t_{II}$ )

Slika 5.35. ilustruje modelom predviđen uticaj vremena trajanja prve i duge faze pripreme inokuluma na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumu za pripremu inokuluma optimizovane formulacije u različitom trajanju. Sa prikazane odzivne površine jasno se zapaža da se sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku bioprocasa ne menja značajno u celokupnom ispitivanom opsegu vremena trajanja prve faze pripreme inokuluma. Međutim, pri maksimalnim vrednostima trajanja druge faze pripreme inokuluma (42-48 h) sa povećanjem vremena trajanja prve faze pripreme inokuluma od 24 h do 36 h dolazi do blagog porasta vrednosti posmatranog odziva. Promena vremena trajanja druge faze pripreme inokuluma od 24 h do 48 h u značajnoj meri utiče na povećanje sadržaja ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom, u čitavom ispitivanom opsegu vremena trajanja prve faze umnožavanja. Primenjeni model predviđa da se maksimalan sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu od oko 10,50 g/l može ostvariti ukoliko se vreme trajanja prve faze pripreme inokuluma nalazi u intervalu od 32 h do 40 h, a vreme trajanja druge faze pripreme inokuluma bude u opsegu od 40 h do 48 h.

#### 5.4.4.3. Optimizacija vremena trajanja pripreme inokuluma

Za optimizaciju vremena trajanja pripreme inokuluma korišćena je metoda željene funkcije zajedno u kombinaciji sa prethodno generisanim matematičkim modelom (jednačina 5.4). Kao jedini uslov optimizacije zadato je postizanje maksimalnog sadržaja ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumu za pripremu inokuluma optimalne formulacije. Optimalne vrednosti

variranih faktora, kao i procenjena vrednost posmatranog odziva za najveću moguću vrednost ukupne željene funkcije prikazani su u tabeli 5.37.

Tabela 5.37. Optimalne vrednosti variranih parametara i predviđeni odziv: definisanje vremena trajanja pripreme inokuluma

Promenljive	Uslovi	Granične vrednosti	Optimalne vrednosti
$t_I$ (h)	u opsegu	24-48	36,04
$t_{II}$ (h)	u opsegu	24-48	48,00
Odziv			Predviđene vrednosti
P (g/l)	maksimalan	7,41-10,46	10,41
<b>Ukupna željena funkcija</b>			<b>0,983</b>

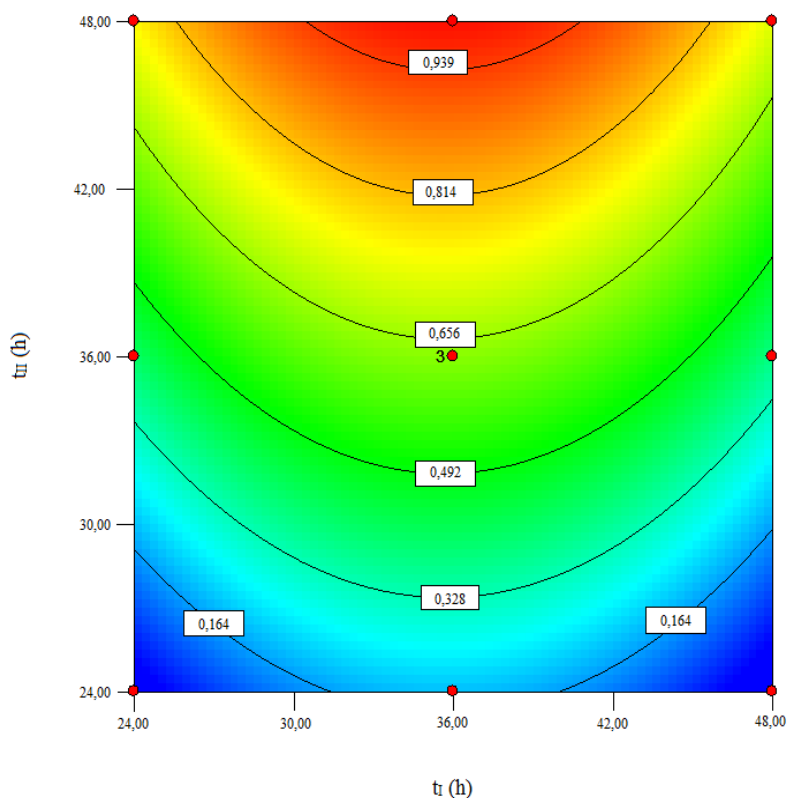
$t_I$ , vreme trajanja prve faze pripreme inokuluma;  $t_{II}$ , vreme trajanja druge faze pripreme inokuluma; P-sadržaj biosintetisanog ksantana.

Podaci prikazani u tabeli 5.37. pokazuju da, ako se kao jedini cilj optimizacije definiše ostvarivanje najveće moguće koncentracije, vrednost posmatranog odziva je najveća (10,41 g/l) ukoliko vreme trajanja prve i druge faze pripreme inokuluma iznose 36,04 h i 48,00 h, redom. Prema rezultatima prikazanim u tabeli 5.37. ukupna željena funkcija u ovom slučaju ima vrednost 0,983.

Optimizacioni rezultati prikazani su i grafički, konturnim dijagramom koji pokazuje zavisnost vrednosti ukupne željene funkcije od vremena trajanja prve i druge faze pripreme inokuluma, a koji je dat na slici 5.36.

Posmatrajući grafički predstavljene rezultate na slici 5.36. može se uočiti da, ako se vreme trajanja prve faze pripreme inokuluma održava na konstantnoj vrednosti iz variranog opsega (od 24 h do 48 h), povećanje vremena trajanja druge faze pripreme inokuluma pozitivno utiče na biosintezu ksantana jer se vrednost ukupne željene funkcije tom prilikom povećava. Sa druge strane, kada se vreme druge faze pripreme inokuluma održava na konstantnoj vrednosti od 24 h do 42 h, povećanje vremena trajanja prve faze pripreme inokuluma nema značajan uticaj na vrednost posmatranog odziva. Međutim, ukoliko se vreme trajanja druge faze pripreme inokuluma održava na gotovo maksimalnoj vrednosti (42-48 h) iz ispitivanog opsega, vrednost ukupne željene funkcije raste sa povećanjem vremena trajanja prve faze pripreme inokuluma u opsegu od 24 h do 36 h.

Rezultati dobijeni u okviru ovih istraživanja sugerišu da je, za ostvarivanje najveće koncentracije ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom primenom soja PAP LIST 4 po završetku bioprocesa, neophodno prethodno umnožiti proizvodni soj PAP LIST 4 u dve faze pri čemu optimalno vreme trajanje prve faze iznosi 36 h, a druge 48 h (tabela 5.37). Iako je sadržaj ksantana koji je dobijen u ovoj fazi istraživanja nepromenjen u poređenju sa sadržajem ksantana ostvarenim u prethodnom ispitivanju (tabela 5.33), izvršen je značajan korak u optimizaciji pripreme inokuluma u pogledu smanjenja vremena trajanja umnožavanja proizvodnog mikroorganizma u prvoj fazi pripreme inokuluma. Ovo je značajno sa ekonomskog aspekta jer dovodi do smanjenja troškova pripreme inokuluma, a samim tim i ukupnih proizvodnih troškova.



Slika 5.36. Zavisnost vrednosti ukupne željene funkcije od vremena trajanja prve ( $t_I$ ) i druge faze pripreme inokuluma ( $t_{II}$ )

Optimizovani rezultati vremena trajanja pripreme inokuluma za biosintezu ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom primenjeni su u daljim istraživanjima u okviru ove doktorske disertacije.

## 5.5. FORMULACIJA SASTAVA MEDIJUMA SA SIROVIM GLICEROLOM ZA BIOSINTEZU KSANTANA

Nakon odabira proizvodnog soja i standardizacije pripreme inokuluma, sledeći korak u razvoju biotehnološkog postupka proizvodnje ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom jeste formulacija sastava medijuma za biosintezu, koja je u okviru ove doktorske disertacije izvedena u dve faze pa su tako i dobijeni rezultati prikazani u dva dela. U prvom delu ovog poglavlja prikazani su rezultati definisanja sadržaja glicerola i izvora azota u medijumu za biosintezu ksantana, dok drugi deo sadrži rezultate definisanja sadržaja izvora fosfora u istom medijumu.

### 5.5.1. Definisane sadržaja glicerola i izvora azota u medijumu za biosintezu ksantana

Kako bi došlo do produkcije ksantana, kultivacija proizvodnog mikroorganizma vrši se na medijumu čiji sastav favorizuje biosintezu ovog biopolimera uz ograničen rast biomase. Kultivacioni medijumi za biosintezu ksantana imaju jasno definisan sastav, i to tako da obezbeđuju neophodne makronutrijente, od kojih su najznačajniji ugljenik i azot, ali i brojne mikronutrijente, poput kalijuma, kalcijuma, magnezijuma i drugih (García-Ochoa i sar., 2000). Podaci iz dostupne naučne literature ukazuju na to da pojedini sojevi roda *Xanthomonas* na medijumu sa sirovim glicerolom, kao jedinim izvorom ugljenika, produkuju veću količinu ksantana boljeg kvaliteta nego kada je pri istim uslovima kultivacija vršena na polusintetičkom medijumu sa saharozom (Brandão i sar., 2013). U Brazilu je 2015. godine sprovedeno istraživanje u kome je ispitana mogućnost produkovanja ksantana na medijumima sa sirovim glicerolom, saharozom i mešavinom ove dve komponente primenom soja *X. campestris* pv. *magiferaeindicae* IBSBF 1230. Početna koncentracija ispitivanih izvora ugljenika iznosila je 50,00 g/l. Rezultati dobijeni u navedenom istraživanju pokazali su da je sadržaj ksantana u medijumu sa sirovim glicerolom (4,98 g/l) bio veći nego u medijumu sa saharozom (4,55 g/l), ali i u odnosu na medijum koji je sadržao obe komponente (4,07 g/l) (Trinidad i sar., 2015).

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije (poglavlje 5.3) takođe ukazuju da je sirovi glicerol pogodan izvor ugljenika u medijumu za biosintezu ksantana primenom različitih sojeva roda *Xanthomonas*, pri čemu je izolat PAP LIST 4 odabran kao najproduktivniji u primenjenim eksperimentalnim uslovima (poglavlje 5.3.3). Iz navedenog razloga je, u ovom koraku ispitivanja izvršena optimizacija sastava medijuma za biosintezu ksantana primenom soja PAP LIST 4 u pogledu sadržaja glicerola poreklom iz sirovog glicerola. Uzimajući u obzir da se ksantan produkuje na medijumu sa sirovim glicerolom u koncentraciji od 20,00 g/l (Brandão i sar., 2013) do 50,00 g/l (Trinidad i sar., 2015), ali i da se najbolji stepen konverzije izvora ugljenika u ksantan generalno postiže u medijumu sa oko 10,00 g/l izvora ugljenika (Moraine i Rogovin, 1971), u ovom istraživanju varirana je koncentracija sirovog glicerola u medijumu za biosintezu u opsegu od 10,00 g/l do 50,00 g/l.

Pored izvora ugljenika, za uspešno izvođenje biosinteze ksantana neophodno je prisustvo odgovarajućih izvora azota doziranih u precizno definisanim koncentracijama. Azot se u medijum za biosintezu dodaje u obliku organskih izvora, kao što su ekstrakt kvasca, hidrolizati kazeina, pepton i sojino brašno, ali i u obliku neorganskih soli kao što su amonijumove i nitratne soli (Palaniraj i Jayaraman, 2011). Prema dostupnim literaturnim navodima najveća koncentracija ksantana produkuje se kada se kao izvor azota u medijumu za biosintezu koriste ekstrakt kvasca (Kumara i sar., 2012) ili  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Salah i sar., 2010). Stoga je u ovoj fazi istraživanja varirana koncentracija upravo ova dva izvora azota u koncentraciji definisanoj prema zahtevima proizvodnog mikroorganizma (García-Ochoa i sar., 2000) i podacima iz dostupne naučne literature (Rončević i sar., 2014; Bajić i sar., 2017).

### 5.5.5.1. Eksperimentalni rezultati ogleđa izvedenih sa ciljem definisanja sadržaja glicerola i izvora azota u medijumu za biosintezu ksantana

U okviru ovih istraživanja eksperimenti su izvedeni u skladu sa statistički dizajniranim eksperimentalnim planom kako bi se smanjio broj ogleđa neophodnih za izvođenje relevantnih zaključaka. U konkretnom slučaju primenjen je Boks-Benkenov plan za tri faktora na tri nivoa i tri ponavljanja u centralnoj tački. Ovako kreirani eksperimenti podrazumevali su izvođenje 15 nezavisnih kultivacija soja PAP LIST 4, u primenjenim eksperimentalnim uslovima (poglavlje 4.4), na medijumima različite formulacije (tabela 4.6). Po završetku proizvodnog postupka, izvršena je analiza medijuma za biosintezu kako bi se potvrdila mogućnost biosinteze ksantana i procenila uspešnost izvođenja bioprocasa. Kako bi se utvrdilo da li je došlo do produkcije ksantana vršena su reološka merenja (poglavlje 4.6.2), dok su od pokazatelja uspešnosti bioprocasa u ovoj fazi istraživanja određivani sadržaj biosintetisanog ksantana (poglavlje 4.5), molekulska masa ksantana (poglavlje 4.6.3) i rezidualni sadržaji variranih nutrijenata (poglavlje 4.6.2). Dobijeni medijumi analizirani su i u pogledu vrednosti pH i sadržaja TDS (poglavlje 4.6.2).

Reološka svojstva medijuma za biosintezu, dobijenih po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 na medijumima sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota, prikazana su u tabeli 5.38.

Tabela 5.38. Reološke karakteristike medijuma za biosintezu na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota po završetku kultivacije soja PAP LIST 4

Redni broj ogleđa	Glycerol (g/l)	Ekstrakt kvasca (g/l)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/l)	K [Pa·s <sup>n</sup> ]	n [1]	η <sub>a</sub> [mPa·s]
1	10	0	1,5	0,2242	0,5200	24,58
2	50	0	1,5	0,6799	0,3916	41,27
3	10	6	1,5	0,2815	0,4548	22,86
4	50	6	1,5	0,4015	0,4384	30,23
5	10	3	0	0,2792	0,4627	23,51
6	50	3	0	0,4879	0,4131	32,70
7	10	3	3,0	0,2994	0,4743	26,60
8	50	3	3,0	0,4879	0,4131	32,70
9	30	0	0	0,3126	0,4606	26,07
10	30	6	0	0,5767	0,4054	37,30
11	30	0	3,0	0,6364	0,4028	40,67
12	30	6	3,0	0,3271	0,4604	27,26
13	30	3	1,5	0,6621	0,3938	32,30
14	30	3	1,5	0,3131	0,4938	30,43
15	30	3	1,5	0,3512	0,4765	31,52

*K* – faktor konzistencije; *n* – indeks toka; η<sub>a</sub> – prividni viskozitet.

Vrednosti indeksa toka medijuma za biosintezu analiziranih u ovoj fazi istraživanja prikazane u tabeli 5.38. kreću se u intervalu od 0,3916 do 0,5200. Ove vrednosti su u saglasnosti sa svim prethodno diskutovanim vrednostima ovog reološkog parametra (poglavlja 5.3 i 5.4). S obzirom da se vrednosti indeksa toka prikazane u tabeli 5.41. nalaze između 0 i 1, može se zaključiti da svi ispitivani medijumi za biosintezu po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 u primenjenim eksperimentalnim uslovima poseduju pseudoplastične karakteristike, što predstavlja pouzdan

pokazatelj produkcije ksantana. Vrednosti faktora konzistencije medijuma za biosintezu analiziranih u ovoj fazi istraživanja kretale su se u intervalu od 0,2242 Pa·s<sup>n</sup> do 0,6799 Pa·s<sup>n</sup> (tabela 5.38). S obzirom da je faktor konzistencije direktno proporcionalan viskozitetu i da viskozitet rastvora ksantana zavisi od kvantiteta i kvaliteta biosintetisanog ksantana (García-Ochoa i sar., 2000), različite vrednosti faktora konzistencije prikazane u tabeli 5.38. ukazuju na razliku u količini i kvalitetu ksantana biosintetisanog u primenjenim eksperimentalnim uslovima prilikom kultivacije soja PAP LIST 4 na medijumima sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota. Prividni viskoziteti medijuma za biosintezu izračunati su na osnovu vrednosti indeksa toka i faktora konzistencije.

Rezultati iz tabele 5.38. ukazuju na to da su se vrednosti prividnog viskoziteta medijuma za biosintezu dobijenih u ovoj fazi istraživanja kretale u opsegu od 22,86 mPa·s do 41,27 mPa·s. Na osnovu tabelarno prikazanih rezultata može se primetiti da je prilikom biosinteze ksantana na medijumu formulacije iz ogleđa broj 2 (50 g/l glicerola i 1,50 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ostvarena najveća vrednost prividnog viskoziteta u poređenju rezultatima dobijenim u ostalim ogleđima. Najmanja vrednost prividnog viskoziteta kultivacionog medijuma ostvarena je kada je kao medijum za biosintezu korišćen medijum formulacije iz ogleđa broj 3 (10,00 g/l glicerola, 0,60 g/l ekstrakta kvasca i 1,50 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

Proizvodni medijumi su nakon završetka biosinteze analizirani i u pogledu vrednosti pH i sadržaja TDS. Vrednosti pH ispitivanih uzoraka prikazane su u tabeli 8.15. koja je data u Prilogu 1. Izmerene vrednosti pH medijuma sa različitim početnim sadržajem nutrijenata kretale su se od 6,76 do 8,48. Rezultati prikazani u tabeli 8.15. ukazuju da u gotovo svim ogleđima dolazi do blagog porasta vrednosti pH medijuma prilikom biosinteze ksantana u primenjenim eksperimentalnim uslovima što je u saglasnosti sa prethodno dobijenim rezultatima iz poglavlja 5.3. i 5.4. i rezultatima istraživanja gde se vrednost pH medijuma dobijenih nakon biosinteze ksantana kretala u opsegu od 7,00 do 10,00 (Psomas i sar., 2007). Vrednosti sadržaja TDS u proizvodnim medijumima, dobijenim nakon biosinteze ksantana u primenjenim eksperimentalnim uslovima, takođe su prikazane u tabeli 8.15. (Prilog 1). Izmerene vrednosti sadržaja TDS u medijumima kretale su se od 1,17 g/l do 4,73 g/l. Dobijeni rezultati pokazuju da postoje drastične razlike u sadržaju TDS u kultivacionim medijumima dobijenim u primenjenim eksperimentalnim uslovima. Do ove razlike verovatno dolazi usled različite koncentracije glicerola koji se dodaje u medijum za biosintezu i sa sobom unosi određeni sadržaj soli zaostalih iz procesa transesterifikacije. Najniža vrednost sadržaja TDS je izmerena kada je kao medijum za biosintezu korišćen medijum formulacije iz ogleđa broj 5, koji je sadržao glicerol u najmanjoj ispitivanoj koncentraciji (10,00 g/l), dok je najveća vrednost sadržaja TDS detektovana kada je kao medijum za biosintezu korišćen medijum formulacije iz ogleđa broj 8, koji je sadržao glicerol u najvećoj ispitivanoj koncentraciji (50,00 g/l). Razlike u vrednosti ovog parametra mogu da budu uzrokovane i različitom inicijalnom koncentracijom neorganskog izvora azota.

Po završetku bioprocasa izvedenih u primenjenim eksperimentalnim uslovima sa medijumima različite formulacije, određen je sadržaj biosintetisanog ksantana, njegova molekulska masa, rezidualni sadržaj glicerola i rezidualni sadržaj ukupnog azota, a dobijeni rezultati predstavljeni su u tabeli 5.39.



Tabela 5.39. Uticaj različitog početnog sadržaja glicerola i izvora azota u medijumu na bazi sirovog glicerola na pokazatelje uspešnosti biosinteze ksantana primenom soja PAP LIST 4

Redni broj ogleda	Glicerol (g/l)	Ekstrakt kvasca (g/l)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/l)	P (g/l)		M <sub>w</sub> (10 <sup>5</sup> g/mol)		S (g/l)		N <sub>uk</sub> (mg/l)	
				Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>3</sub>	Y <sub>3</sub>	Y <sub>4</sub>		
1	10	0	1,5	8,37	4,75	0,80	280,00				
2	50	0	1,5	14,73	1,99	32,67	308,00				
3	10	6	1,5	3,09	3,34	5,12	766,00				
4	50	6	1,5	10,56	1,09	34,52	834,00				
5	10	3	0	3,91	4,39	4,42	490,00				
6	50	3	0	11,07	1,18	34,36	544,00				
7	10	3	3,0	6,96	3,97	7,21	768,00				
8	50	3	3,0	10,07	1,41	34,31	984,00				
9	30	0	0	5,44	2,43	23,43	220,00				
10	30	6	0	11,49	2,07	16,66	820,00				
11	30	0	3,0	13,62	2,25	14,96	320,00				
12	30	6	3,0	6,89	2,15	21,72	1110,00				
13	30	3	1,5	7,04	2,42	20,50	664,00				
14	30	3	1,5	7,13	2,46	20,99	622,00				
15	30	3	1,5	7,42	2,41	20,17	606,00				

Y<sub>1</sub>, P-sadržaj biosintetisanog ksantana; Y<sub>2</sub>, M<sub>w</sub>-srednja molekulska masa ksantana; Y<sub>3</sub>, S-rezidualni sadržaj izvora ugljenika; Y<sub>4</sub>, N<sub>uk</sub>-rezidualni sadržaj ukupnog azota.

Rezultati prikazani u tabeli 5.39. pokazuju da je u svim ogledima došlo do produkcije ksantana i da se sadržaj produkovanog biopolimera u medijumima za biosintezu kretao od 3,09 g/l do 14,73 g/l. Najveći sadržaj ksantana ostvaren je kada se kao medijum za biosintezu koristio medijum formulacije iz ogleda redni broj 2. U ovom ogledu glicerol je dodat od 50,00 g/l, a kao izvor azota korišćen je (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> u koncentraciji od 1,50 g/l. Dobijena vrednost značajno je veća u poređenju sa rezultatima brazilskih naučnika koji su prilikom kultivacije soja *X. campestris mangiferaeindicae* 2103 na medijumu sa sirovim glicerolom (20 g/l) kao izvorom ugljenika i ureom (0,1 g/l) kao izvora azota ostvarili produkciju ksantana od 7,23 g/l (Brandão i sar., 2014). Relativno velike koncentracije ksantana u medijumu za biosintezu od 13,62 g/l, 11,49 g/l, 11,07 g/l i 10,07 g/l ostvarene su i u ogledima broj 11 (30,00 g/l sirovog glicerola i 3,00 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 10 (30,00 g/l glicerola i 6,00 g/l ekstrakta kvasca), 6 (50,00 g/l i 3,00 g/l ekstrakta kvasca) i 8 (50,00 g/l, 3,00 g/l ekstrakta kvasca i 3,00 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Prema rezultatima prikazanim u tabeli 5.39, najmanja koncentracija ksantana ostvarena je kada se kao medijum za biosintezu koristio medijum formulacije iz ogleda broj 3 (10,00 g/l glicerola, 6,00 g/l ekstrakta kvasca i 1,50 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Dobijeni rezultati sugerišu da je za veću produkciju ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom neophodno dodati glicerol u koncentraciji većoj od 10,00 g/l, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih istraživanja (Brandão i sar., 2013; Bajić i sar., 2015b; Wang i sar., 2016).

Srednje vrednosti molekulske mase ksantana dobijenih u ovoj fazi istraživanja kretale su se u opsegu od 1,09·10<sup>5</sup> g/mol do 4,75·10<sup>5</sup> g/mol (tabela 5.39). Najveća vrednost molekulske mase ksantana ostvarena je prilikom izvođenja ogleda broj 1 u kojem je medijum za biosintezu sadržao 10 g/l sirovog glicerola i 1,50 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Visoke vrednosti molekulske mase biosintetisanog ksantana od 4,37·10<sup>5</sup> g/mol i 3,97·10<sup>5</sup> g/mol ostvarene su i u ogledima broj 5 (10,00 g/l glicerola i 3,00 g/l ekstrakta kvasca) i 7 (10,00 g/l glicerola, 3,00 g/l ekstrakta kvasca i 3,00 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), redom. Sa druge strane, ksantan najmanje molekulske mase biosintetisan je u ogledu broj 4 (50,00 g/l, 6,00 g/l ekstrakta kvasca i 1,50 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Iz tabele 5.39. je evidentno da je ksantan male molekulske mase dobijen u ogledima 6 (1,18·10<sup>5</sup> g/mol),

8 ( $1,41 \cdot 10^5$  g/mol) i 2 ( $1,99 \cdot 10^5$  g/mol). U navedenim ogledima glicerol je dodat u maksimalnoj koncentraciji (50,00 g/l), dok je koncentracija izvora azota u medijumima za biosintezu u okviru ovih ogleda bila različita. Iz dobijenih rezultata se može zaključiti da niže koncentracije glicerola u medijumu za biosintezu pogoduju proizvodnji ksantana veće molekulske mase, dok povećanje inicijalne koncentracije glicerola u ovom medijumu dovode do smanjenja molekulske mase biopolimera. Do istih zaključaka došli su i drugi autori tokom svojih istraživanja kada su ispitivali uticaj inicijalne koncentracije komercijalnog glicerola u medijumu za biosintezu na kvalitet ksantana kojeg produkuje referentni soj *X. campestris* ATCC 13951 (Rončević i sar., 2014).

Rezidualni sadržaj glicerola u medijumu za biosintezu po završetku produkcije ksantana ostvaren u ovom istraživanju kretao se od 0,80 g/l do 34,52 g/l. Najmanji sadržaj glicerola zaostao je u proizvodnom medijumu po završetku ogleda broj 1. U ovom ogledu je glicerol inicijalno dodat u najmanjoj ispitivanoj koncentraciji (10,00 g/l). Mali sadržaj glicerola zaostao je i u proizvodnim medijumima u okviru ogleda broj 5 (4,42 g/l), 3 (5,12 g/l) i 7 (7,21 g/l). I u ovim ogledima glicerol je u medijum za biosintezu dodat koncentraciji od 10,00 g/l. Prema rezultatima prikazanim u tabeli 5.39. najveći sadržaj glicerola od 34,52 g/l zaostao je u medijumu po završetku ogleda broj 4. U ogledu broj 4 glicerol je dodat u medijum za biosintezu u maksimalnoj ispitivanoj koncentraciji (50,00 g/l). Dosta visok sadržaj glicerola zaostao je i u proizvodnim medijumima u okviru ogleda broj 6 (34,36 g/l) i 2 (32,67 g/l), gde je inicijalno u medijum za biosintezu dodat glicerol takođe u koncentraciji od 50 g/l. Dobijeni rezultati sugerišu da se maksimalna potrošnja glicerola od strane proizvodnog soja PAP LIST 4 u primenjenim eksperimentalnim uslovima ostvaruje ukoliko se glicerol u proizvodni medijum doda u koncentraciji od oko 10,00 g/l. Povećanje njegove koncentracije u medijumu na 50,00 g/l dovodi do male potrošnje ovog nutrijenta.

Rezultati prikazani u tabeli 5.39. pokazuju da se rezidualni sadržaj ukupnog azota u medijumu za biosintezu ksantana po završetku bioprocasa kretao od 280,00 mg/l do 1110,00 mg/l. Najmanji rezidualni sadržaj ukupnog azota ostvaren je u ogledu broj 1, u kojem je medijum za biosintezu inicijalno sadržao 10,00 g/l glicerola i 1,50 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Dosta nizak sadržaj ukupnog azota u medijumu za biosintezu zaostao je i u okviru ogleda broj 2 (308,00 mg/l) i 11 (320,00 mg/l). Kod ovih ogleda početni sadržaj izvora azota u medijumu za biosintezu ksantana iznosio je 1,50 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  i 3,00 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , redom. Najveći sadržaj ukupnog azota od 1110,00 mg/l zaostao je u medijumu za biosintezu ksantana iz ogleda broj 12. U ovom eksperimentu kao izvori azota u proizvodni medijum dodati su ekstrakt kvasca i  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u maksimalnim ispitivanim koncentracijama od 6,00 g/l i 3,00 g/l, redom. Dosta visok sadržaj ukupnog azota u proizvodnom medijumu od 984,00 mg/l zaostao je i pri izvođenju ogleda broj 8. Kod ovog ogleda kao izvori azota u proizvodni medijum dodati su ekstrakt kvasca i  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u koncentracijama od 3,00 g/l i 3,00 g/l, redom. Dobijeni rezultati sugerišu da se dodatkom  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  kao jedinog izvora azota u medijumu za biosintezu ksantana u koncentraciji od 1,50 g/l do 3,00 g/l postiže minimalan rezidualni sadržaj ukupnog azota po završetku bioprocasa.

Analizirajući sve rezultate prikazane u tabeli 5.39. može se primetiti da veće početne koncentracije nutrijenata u medijumu za biosintezu dovode do slabije produkcije ksantana. Sa druge strane, niže koncentracije sirovog glicerola i izvora azota u medijumu za biosintezu omogućavaju postizanje visokog sadržaja ksantana boljeg kvaliteta uz maksimalnu konverziju

nutrijenata, što je u saglasnosti sa literaturnim navodima gde je ukazano na to da niže koncentracije nutrijenata, pogotovo onih limitirajućih, povoljno utiču na uspešnost biosinteze ksantana (García-Ochoa i sar., 2000).

### 5.5.3.2. Generisanje modela za oglede izvedene sa ciljem definisanja sadržaja glicerola i izvora azota u medijumu za biosintezu ksantana

U cilju definisanja optimalnog početnog sadržaja glicerola i izvora azota u medijumu za biosintezu ksantana, čija je osnova sirovi glicerol, primenom soja PAP LIST 4, nakon uspešno izvedenih statistički dizajniranih eksperimenata neophodno je generisati adekvatne modele koji opisuju uticaj variranih parametara na posmatrane odzive. Kako bi se dobile detaljne informacije o uticaju ispitivanih faktora na uspešnost izvođenja biosinteze ksantana u primenjenim eksperimentalnim uslovima i izvršila kvantifikacija faktorskih efekata i njihovih interakcija, vršena je obrada eksperimentalnih podataka primenom odgovarajućih softverskih paketa.

U nastavku istraživanja izvedeno je matematičko modelovanje eksperimentalno dobijenih rezultata za sadržaj biosintetisanog ksantana ( $Y_1$ ), njegovu molekulsku masu ( $Y_2$ ), rezidualni sadržaj glicerola ( $Y_3$ ) i rezidualni sadržaj ukupnog azota ( $Y_4$ ), prikazanih u tabeli 5.39. Uspešnost fitovanja dobijenih podataka odabranim modelom (jednačina 4.10) procenjena je na osnovu vrednosti koeficijenata determinacije. Adekvatnost i značajnost generisanih matematičkih modela ispitane su primenom analize varijanse. Rezultati analize varijanse i koeficijenti determinacije prikazani su u tabeli 5.40.

Tabela 5.40. Analiza varijanse modelovanih odziva za biosintezu ksantana na medijumima sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota primenom soja PAP LIST 4

Odziv	Poreklo								
	Rezidual			Model					
	SS	DF	MS	SS	DF	MS	F-vrednost	p-vrednost	R <sup>2</sup>
Y <sub>1</sub>	11,593	5	2,319	1234,742	10	123,474	53,254	0,000191	0,926
Y <sub>2</sub>	5,017·10 <sup>9</sup>	5	1,003·10 <sup>9</sup>	1,144·10 <sup>12</sup>	10	1,144·10 <sup>11</sup>	113,977	0,000029	0,971
Y <sub>3</sub>	12,066	5	2,413	7493,090	10	749,309	310,507	0,000002	0,993
Y <sub>4</sub>	36888,000	5	7377,500	6763120,000	10	676312,000	91,672	0,000050	0,963

SS – suma kvadrata; DF – stepen slobode; MS – srednja vrednost kvadrata; R<sup>2</sup> – koeficijent determinacije;

Y<sub>1</sub>, P-sadržaj biosintetisanog ksantana; Y<sub>2</sub>, M<sub>w</sub>-srednja molekulsku masa ksantana; Y<sub>3</sub>, S-rezidualni sadržaj izvora ugljenika; Y<sub>4</sub>, N<sub>uk</sub>-rezidualni sadržaj ukupnog azota.

Rezultati prikazani u tabeli 5.40. pokazuju da su dobijene relativno visoke vrednosti koeficijenata determinacije, i to od 0,926, 0,971, 0,993 i 0,963 što ukazuje na to da je ostvarena veoma dobra veza između eksperimentalnih i modelom predviđenih vrednosti za sadržaj biosintetisanog ksantana, njegovu molekulsku masu, rezidualni sadržaj glicerola i rezidualni sadržaj ukupnog azota, redom, te da definisanim matematičkim modelima nije moglo biti objašnjeno 7,40%, 2,90%, 0,7% i 3,70% od ukupnih varijacija, redom. Ove varijacije predstavljaju efekte onih faktora koji nisu uključeni u modelovanje i nisu bili od interesa u ovom

istraživanju. Poređenje eksperimentalno dobijenih vrednosti i vrednosti predviđenih modelima prikazani su i grafički na slikama 8.5-8.8. (Prilog 2). Predstavljeni rezultati ukazuju da se eksperimentalne vrednosti ostvarene u ovom istraživanju za sadržaj biosintetisanog ksantana, njegovu molekulsku masu, rezidualni sadržaj glicerola i rezidualni sadržaj ukupnog azota nalaze veoma blizu linije najboljeg fitovanja.

Adekvatnost definisanih modela proverena je pomoću Fišerovog testa, a statistička značajnost u intervalu poverenja od 95% potvrđena analizom  $p$ -vrednosti. Posmatrajući sve  $F$ -vrednosti prikazane u tabeli 5.40, može se uočiti da su one manje od tabličnih vrednosti za odgovarajući stepen slobode primenjenog eksperimentalnog plana. Ovo ukazuje na to da se definisani kvadratni modeli smatraju pogodnim za opisivanje uticaja variranih faktora na posmatrane odzive. Izuzetno niske  $p$ -vrednosti prikazane u istoj tabeli potvrđuju da su modeli polinoma drugog reda modelovanih odziva statistički značajni u zadatom intervalu poverenja.

### Matematički model za sadržaj ksantana

Eksperimentalno dobijeni podaci koji se odnose na sadržaj ksantana u medijumima po završetku bioprocasa (tabela 5.39) su fitovani polinomom drugog reda (jednačina 4.10) pri čemu je generisana regresiona jednačina koja opisuje uticaj početnog sadržaja glicerola i izvora azota na pomenuti odziv:

$$Y_1 = 1,822750 + 0,139587 \cdot X_1 - 0,610528 \cdot X_2 + 2,960278 \cdot X_3 + 0,000795 \cdot X_1^2 + 0,185907 \cdot X_2^2 + 0,217185 \cdot X_3^2 + 0,004617 \cdot X_1 \cdot X_2 - 0,033717 \cdot X_1 \cdot X_3 - 0,710333 \cdot X_2 \cdot X_3 \quad (5.5)$$

gde su:

$Y_1$  - sadržaj biosintetisanog ksantana,

$X_1$ , - sadržaj glicerola,

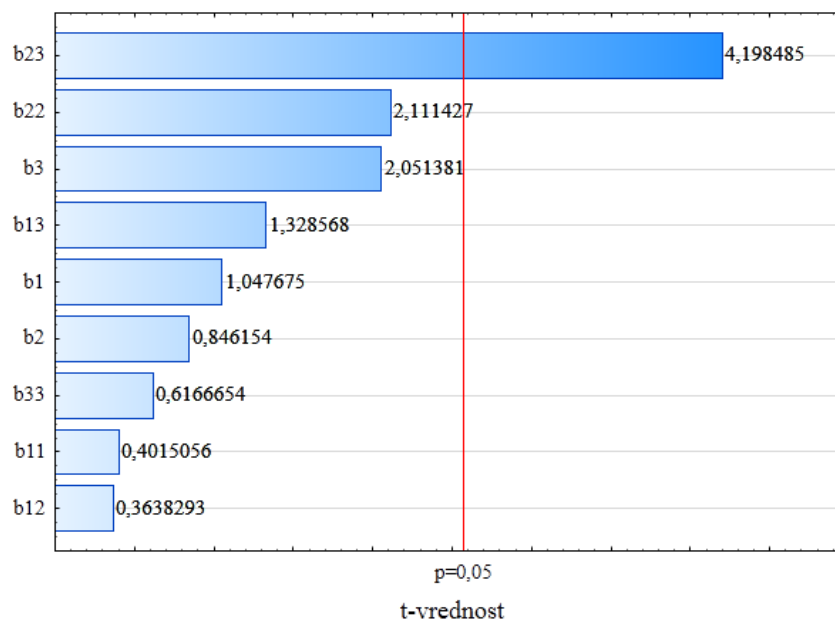
$X_2$  - sadržaj ekstrakta kvasca i

$X_3$  - sadržaj  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Statistička značajnost koeficijenata u generisanoj jednačini (5.5) procenjena je na osnovu  $p$ -vrednosti, dok je intenzitet njihovog uticaja određen poređenjem  $t$ -vrednosti prikazanih na Pareto grafiku. Pareto grafik standardizovanih efekata na sadržaj ksantana u medijumima za biosintezu na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prikazan je na slici 5.37.

Rezultati prikazani na slici 5.37. ukazuju na to da koeficijent interakcije početnog sadržaja ekstrakta kvasca i  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $b_{23}$ ) u medijumu na bazi sirovog glicerola statistički značajno utiče na sadržaj biosintetisanog ksantana u primenjenim eksperimentalnim uslovima. Negativan predznak ovog koeficijenta, koji se vidi u jednačini 5.5, ukazuje na antagonistički efekat ova dva izvora azota na produkciju željenog biopolimera. Ovi rezultati se mogu objasniti činjenicom da je ksantan sekundarni metabolit zbog čega medijumi za njegovo dobijanje sadrže limitiranu količinu nutrijenata koji favorizuju umnožavanje biomase (García-Ochoa i sar., 2000). Efekti linearnog ( $b_1$ ) i kvadratnog člana početnog sadržaja glicerola ( $b_{11}$ ), linearnog ( $b_2$ ) i kvadratnog člana početnog sadržaja ekstrakta kvasca ( $b_{22}$ ), linearnog ( $b_3$ ) i kvadratnog člana početnog

sadržaja  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $b_{33}$ ), kao i ostalih koeficijenata interakcije ( $b_{12}$  i  $b_{13}$ ) nisu pokazali statistički značajan uticaj na sadržaj produkovanog ksantana u primenjenim eksperimentalnim uslovima.

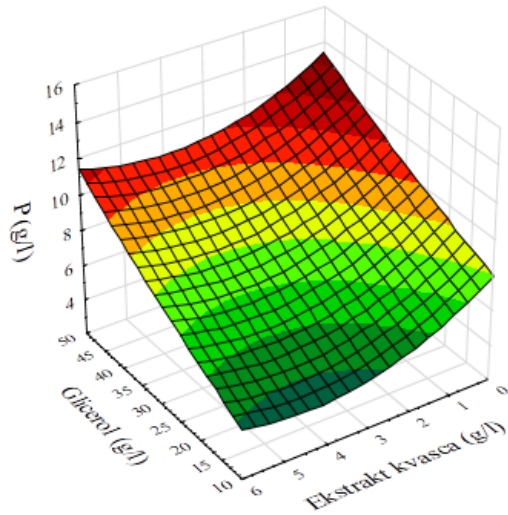


Slika 5.37. Pareto grafik standardizovanih efekata na sadržaj ksantana u medijumima za biosintezu na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota po završetku kultivacije soja PAP LIST 4

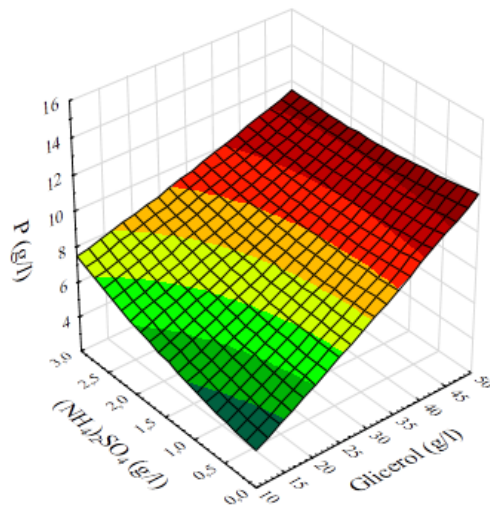
Radi boljeg razumevanja ustanovljenih efekata, generisan matematički model (jednačina 5.5) prikazan je i grafički, trodimenzionalnim odzivnim površinama na slikama 5.38.a-c. Svaki grafik prikazuje modelom predviđen uticaj dva faktora na posmatrani odziv pri konstantnoj vrednosti trećeg.

Na slici 5.38.a prikazan je modelom predviđen uticaj početnog sadržaja glicerola i ekstrakta kvasca u medijumu na bazi sirovog glicerola na sadržaj ksantana biosintetisanog primenom soja PAP LIST 4 pri konstantnoj početnoj koncentraciji  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  od 1,50 g/l. Analizom grafički predstavljenih rezultata može se uočiti da, pri konstantnoj koncentraciji glicerola u medijumu za biosintezu ksantana, promena sadržaja ekstrakta kvasca u istom medijumu ne utiče značajno na produkciju željenog biopolimera. Međutim, ukoliko se glicerol u medijum za biosintezu inicijalno doda u koncentraciji od 40,00 g/l do 50,00 g/l, sa povećanjem sadržaja ekstrakta kvasca dolazi do smanjenja sadržaja biosintetisanog ksantana. Sa druge strane, pri konstantnoj vrednosti sadržaja korišćenog organskog izvora azota u medijumu na bazi sirovog glicerola dolazi do povećanja sadržaja produkovanog ksantana sa povećanjem sadržaja glicerola u istom medijumu. Najveća predviđena koncentracija ksantana od oko 14,00 g/l ostvarila bi se kada bi medijum za biosintezu ksantana sadržao 50,00 g/l glicerola uz minimalan dodatak ekstrakta kvasca.

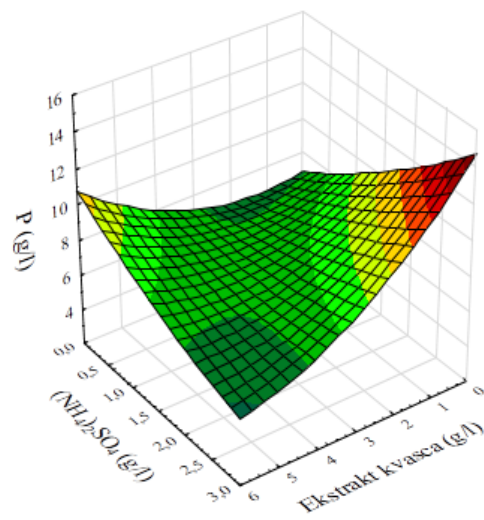
a)



b)



c)



Slika 5.38. Sadržaj ksantana (P) u medijumima za biosintezu na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 u funkciji dva faktora pri konstantnoj vrednosti trećeg:

- a) sadržaj  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1,50 g/l)
- b) sadržaj ekstrakta kvasca (3,00 g/l)
- c) sadržaj glicerola (30,00 g/l)

Slika 5.38.b ilustruje predikciju sadržaja ksantana biosintetisanog primenom soja PAP LIST 4 pri konstantnom početnom sadržaju ekstrakta kvasca od 3,00 g/l u medijumu na bazi sirovog glicerola i pri variranim vrednostima početnog sadržaja glicerola i  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Dobijeni rezultati predstavljeni na pomenutoj slici ukazuju da povećanjem inicijalnog sadržaja glicerola u medijumu za biosintezu, pri konstantnom sadržaju  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , dolazi do porasta produkcije biopolimera. Pored toga, evidentno je da prilikom povećanja sadržaja  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u medijumu za biosintezu, pri konstantnoj koncentraciji glicerola u opsegu od 10,00 g/l do 35,00 g/l, dolazi do blagog povećanja sadržaja produkovanog ksantana. Koncentracija ksantana u medijumu po završetku kultivacije odabranog proizvodnog soja veća od 11,00 g/l predviđena je pri početnoj koncentraciji glicerola od 50,00 g/l i pri svim ispitivanim koncentracijama  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Slika 5.38.c prikazuje modelom predviđen uticaj početnog sadržaja ekstrakta kvasca i  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u medijumu na bazi sirovog glicerola na sadržaj ksantana biosintetisanog pri konstantnom početnom sadržaju glicerola od 30,00 g/l. Grafički predstavljeni rezultati sugerišu da se vrednost posmatranog odziva povećava kada se koncentracija organskog izvora azota u medijumu za biosintezu povećava, a neorganskog smanjuje i obrnuto. Na antagonistički efekat izvora azota variranih u zadatom opsegu ukazuje i negativna vrednost koeficijenta interacije ove dve komponente medijuma u generisanom matematičkom modelu (jednačina 5.5). Ipak, može se primetiti da je najveća koncentracija ksantana od oko 14,00 g/l predviđena ako se kultivacija soja PAP LIST 4 izvodi na medijumu sa 3,00 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , bez dodatka ekstrakta kvasca.

### Matematički model za molekulska masu

Fitovanjem eksperimentalnih rezultata određivanja molekulske mase produkovanog ksantana prikazanih u tabeli 5.42. polinomom drugog reda (jednačina 4.10) dobijena je regresiona jednačina koja opisuje uticaj ispitivanih faktora na pomenuti odziv:

$$Y_2 = 611621,5 - 14757,0 \cdot X_1 - 15086,0 \cdot X_2 - 5660,6 \cdot X_3 + 109,3 \cdot X_1^2 - 850,9 \cdot X_2^2 - 5739,4 \cdot X_3^2 + 216,2 \cdot X_1 \cdot X_2 + 537,6 \cdot X_1 \cdot X_3 + 1415,0 \cdot X_2 \cdot X_3 \quad (5.6)$$

gde su:

$Y_2$  - molekulska masa ksantana,

$X_1$ , - sadržaj glicerola,

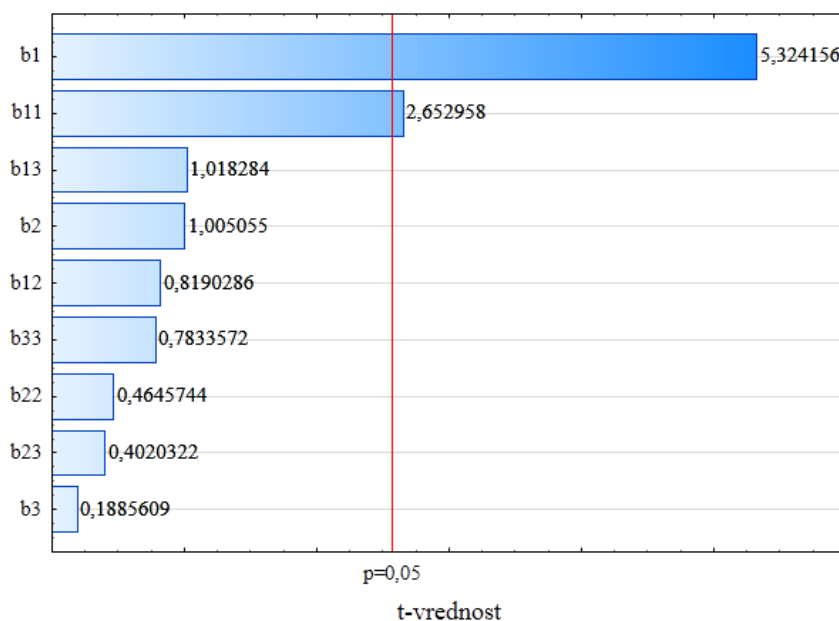
$X_2$  - sadržaj ekstrakta kvasca i

$X_3$  - sadržaj  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Statistička značajnost koeficijenata u prethodno generisanoj jednačini (5.6) procenjena je na osnovu  $p$ -vrednosti, a intenzitet njihovog uticaja određen je poređenjem  $t$ -vrednosti prikazanih na Pareto grafiku. Pareto grafik standardizovanih efekata na molekulska masu ksantana, koje na medijumima na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota biosintetiše soja PAP LIST 4, prikazan je na slici 5.39.

Rezultati sa slike 5.39. ukazuju da linearni ( $b_1$ ) i kvadratni član početnog sadržaja glicerola ( $b_{11}$ ) statistički značajno utiču na vrednost molekulske mase ksantana dobijenog po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 na medijumima na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota. Ako se uzme u obzir negativna vrednost linearnog

koeficijenta za početni sadržaj glicerola u generisanoj jednačini 5.6, jasno je da će se na medijumima sa manjim sadržajem izvora ugljenika proizvoditi biopolimer boljeg kvaliteta, što je u skladu sa literaturnim podacima (Rončević i sar., 2014). Posmatrajući ostale rezultate prikazane na slici 5.39, može se primetiti da efekti linearnog ( $b_2$ ) i kvadratnog člana ekstrakta kvasca ( $b_{22}$ ), linearnog ( $b_3$ ) i kvadratnog člana  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $b_{33}$ ), kao i svih koeficijenata interakcije ( $b_{12}$ ,  $b_{13}$  i  $b_{23}$ ) nisu pokazali statistički značajan uticaj na vrednost molekulske mase ksantana biosintetisanog u primenjenim eksperimentalnim uslovima.



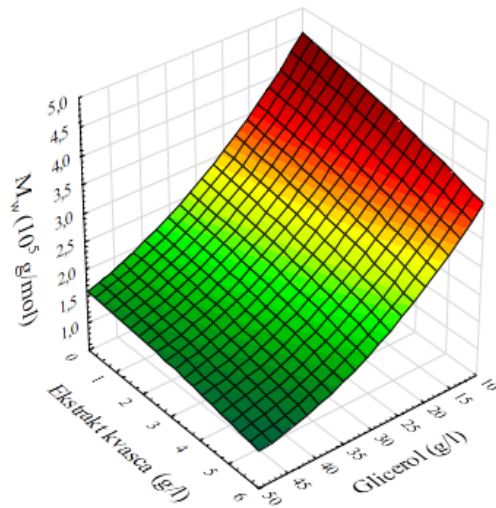
Slika 5.39. Pareto grafik standardizovanih efekata na molekulsku masu ksantana koje na medijumima na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota biosintetiše soj PAP LIST 4

Kako bi se bolje razumeli utvrđeni efekti, generisan matematički model (jednačina 5.6) prikazan je i grafički. Odzivne površine koje prikazuju modelom predviđenu zavisnost analiziranog odziva od dva faktora pri konstantnoj vrednosti trećeg date su na slikama 5.40.a-c.

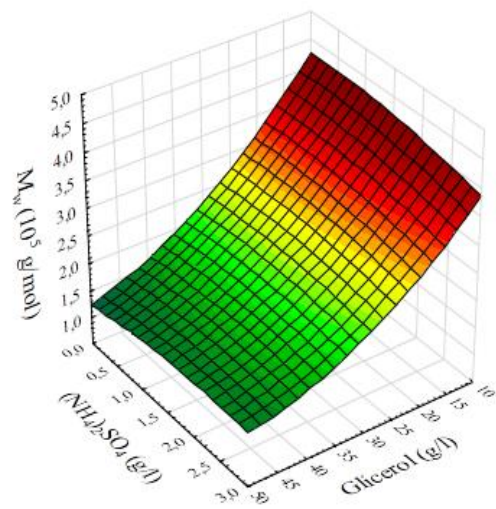
Na slici 5.40.a prikazan je modelom predviđen uticaj početnog sadržaja glicerola i ekstrakta kvasca u medijumu na bazi sirovog glicerola na molekulsku masu ksantana biosintetisanog primenom soja PAP LIST 4 pri konstantnoj vrednosti početnog sadržaja  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  od 1,50 g/l. Grafički predstavljeni rezultati ukazuju da, pri konstantnoj koncentraciji pomenutog organskog izvora azota u medijumu za biosintezu, sa povećanjem sadržaja glicerola dolazi do smanjenja molekulske mase produkovanog ksantana. Pored toga, evidentno je i da, pri konstantnoj vrednosti sadržaja glicerola u proizvodnom medijumu, povećanje sadržaja ekstrakta kvasca ne utiče značajno na kvalitet biopolimera. Najveća vrednost molekulske mase ksantana od oko  $4,50 \cdot 10^5$  g/mol predviđena je pri sadržaju glicerola od 10 g/l, bez dodatka ekstrakta kvasca u medijum za biosintezu.



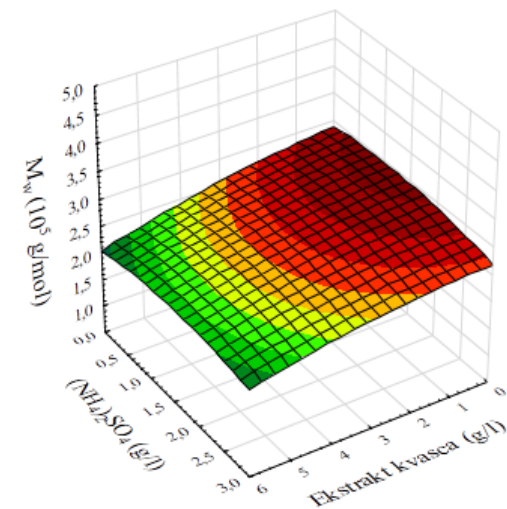
a)



b)



c)



Slika 5.40. Molekulska masa ksantana ( $M_w$ ) biosintetisanih na medijumima na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 u funkciji dva faktora pri konstantnoj vrednosti trećeg:

a) sadržaj  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1,50 g/l)

b) sadržaj ekstrakta kvasca (3,00 g/l)

c) sadržaj glicerola (30,00 g/l)

Slika 5.40.b ilustruje modelom predviđen uticaj početnog sadržaja glicerola i  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u medijumu na bazi sirovog glicerola na molekulsku masu ksantana produkovanog primenom soja PAP LIST 4 pri konstantnom sadržaju ekstrakta kvasca od 3,00 g/l. Rezultati prikazani na pomenutoj slici sugerišu da, pri konstantnoj koncentraciji  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u medijumu za biosintezu, povećanje sadržaja glicerola dovodi do produkcije biopolimera lošijeg kvaliteta. Predstavljene rezultati ukazuju i da povećanje sadržaja  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u analiziranom intervalu, pri konstantnoj vrednosti sadržaja glicerola, ne utiče značajno na vrednost posmatranog odziva. Maksimalna vrednost molekulske mase ksantana, odnosno veća od  $4 \cdot 10^5$  g/mol predviđena je pri sadržaju glicerola od 10,00 g/l, bez dodatka  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u medijum za biosintezu.

Slika 5.40.c prikazuje modelom predviđen uticaj početnog sadržaja ekstrakta kvasca i  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u medijumu na bazi sirovog glicerola na molekulsku masu ksantana dobijenog kultivacijom soja PAP LIST 4 pri konstantnoj vrednosti početnog sadržaja glicerola od 30,00 g/l. Rezultati predstavljeni na pomenutoj slici ukazuju da, pri konstantnoj koncentraciji ekstrakta kvasca u medijumu za biosintezu, sa povećanjem sadržaja  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u istom medijumu dolazi do blagog smanjenja molekulske mase ovog biopolimera, ali samo pri koncentraciji korišćenog organskog izvora azota od 0 g/l do 1,00 g/l. Sa slike 5.40.c je evidentno da, pri konstantnoj vrednosti sadržaja  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u medijumu za biosintezu, sa povećanjem sadržaja ekstrakta kvasca u istom medijumu dolazi do smanjenja vrednosti molekulske mase produkovanog ksantana u čitavom ispitivanom intervalu. Najveća vrednost molekulske mase ksantana od oko  $3 \cdot 10^5$  g/mol predviđena je pri sadržaju  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  od 1,00 g/l, bez dodatka ekstrakta kvasca u medijum za biosintezu.

### Matematički model za rezidualni sadržaj glicerola

Eksperimentalni rezultati određivanja rezidualnog sadržaja glicerola (tabela 5.42) fitovani su polinomom drugog reda (jednačina 4.10) pri čemu je dobijena regresiona jednačina koja opisuje uticaj ispitivanih faktora na rezidualni sadržaj glicerola koji zaostaje u medijumu po završetku bioprocesa:

$$Y_3 = -3,85106 + 0,91030 \cdot X_1 + 0,49200 \cdot X_2 - 1,89733 X_3 - 0,00174 \cdot X_1^2 - 0,17553 \cdot X_2^2 + 0,09744 \cdot X_3^2 - 0,01036 \cdot X_1 \cdot X_2 - 0,02362 \cdot X_1 \cdot X_3 + 0,75244 \cdot X_2 \cdot X_3 \quad (5.7)$$

gde su:

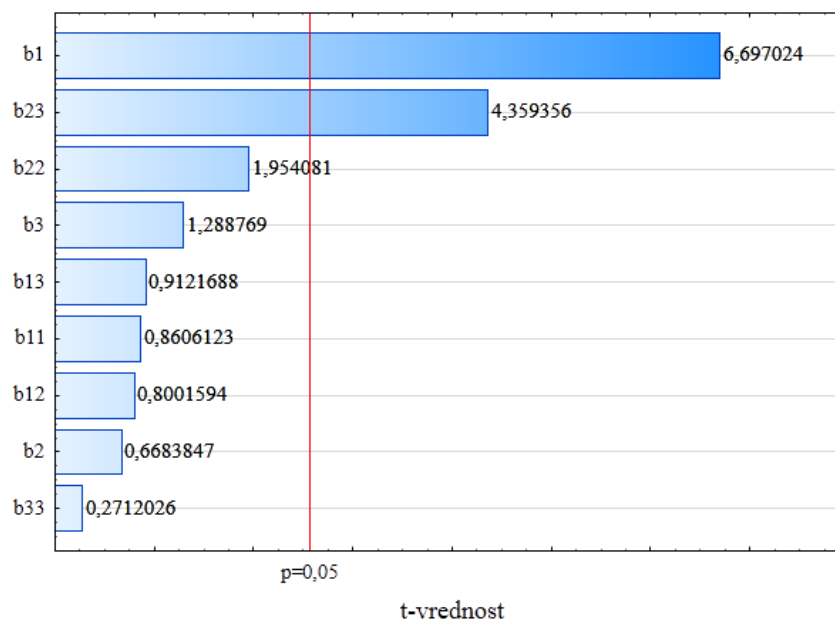
$Y_3$  - rezidualni sadržaj glicerola,

$X_1$ , - inicijalni sadržaj glicerola,

$X_2$  - sadržaj ekstrakta kvasca i

$X_3$  - sadržaj  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Statistička značajnost koeficijenata u prethodno generisanoj jednačini (5.7) procenjena je na osnovu  $p$ -vrednosti, a intenzitet njihovog uticaja određen je poređenjem  $t$ -vrednosti prikazanih na Pareto grafiku. Pareto grafik standardizovanih efekata na rezidualni sadržaj glicerola, koji je u medijumima na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota određen po završetku kultivacije soja PAP LIST 4, prikazan je na slici 5.41.

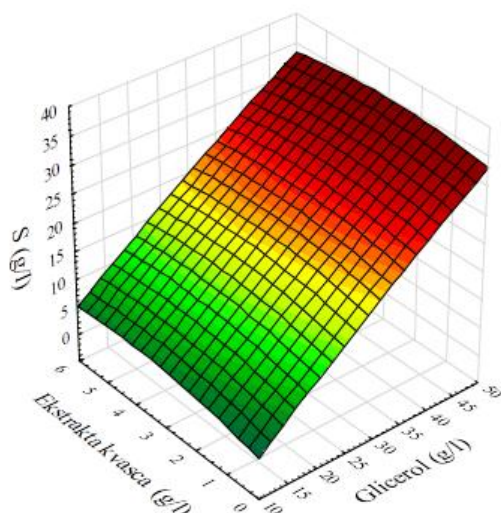


Slika 5.41. Pareto grafik standardizovanih efekata na rezidualni sadržaj glicerola u medijumima za biosintezu na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota po završetku kultivacije soja PAP LIST 4

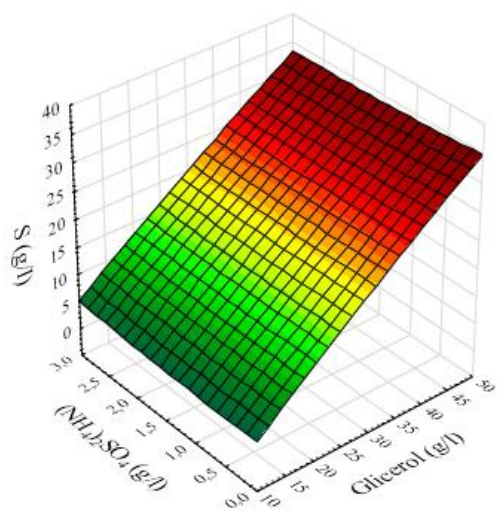
Na osnovu rezultata prikazanih na slici 5.41. može se primetiti da na vrednost posmatranog odziva statistički značajno utiče linearni član početnog sadržaja glicerola ( $b_1$ ) u medijumu za biosintezu, kao i član interakcije početnog sadržaja ekstrakta kvasca i  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $b_{23}$ ) u istom medijumu. Pozitivan predznak pomenutog člana interakcije prikazan u jednačini 5.7. ukazuje na sinergistički efekat ova dva izvora azota. Linearni koeficijent za početni sadržaj glicerola takođe ima pozitivan znak (jednačina 5.7) što ukazuje na to da količina zaostalog izvora ugljenika zavisi od njegove inicijalne koncentracije. Efekti linearnog ( $b_2$ ) i kvadratnog člana početnog sadržaja ekstrakta kvasca ( $b_{22}$ ) i  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $b_3$  i  $b_{33}$ ), kvadratnog člana početnog sadržaja glicerola ( $b_{11}$ ), kao i ostalih koeficijenata interakcije ( $b_{12}$  i  $b_{13}$ ) nisu pokazali statistički značajan uticaj na vrednost posmatranog odziva u primenjenim eksperimentalnim uslovima.

U cilju boljeg razumevanja ustanovljenih efekata, generisan matematički model (jednačina 5.7) prikazan je i grafički, trodimenzionalnim odzivnim površinama koje prikazuju modelom predviđenu zavisnost analiziranog odziva od dva faktora pri konstantnoj vrednosti trećeg, a date su na slikama 5.42.a-c.

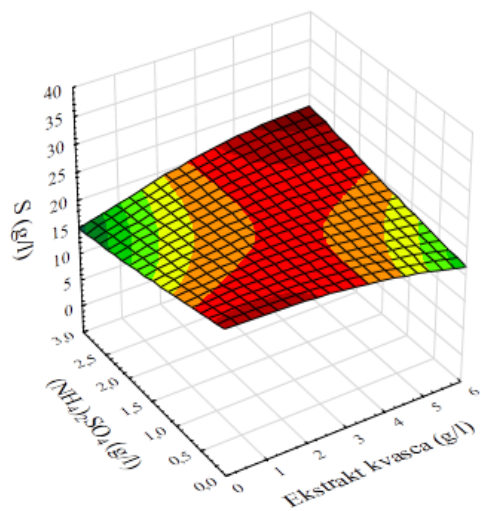
a)



b)



c)



Slika 5.42. Rezidualni sadržaj glicerola (S) u medijumima na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 u funkciji dva faktora pri konstantnoj vrednosti trećeg:

- a) sadržaj  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1,50 g/l)
- b) sadržaj ekstrakta kvasca (3,00 g/l)
- c) sadržaj glicerola (30,00 g/l)

Odzivna površina prikazana na slici 5.42.a ilustruje modelom predviđen uticaj početnog sadržaja glicerola i izvora azota u medijumu za biosintezu na bazi sirovog glicerola sa konstantnim sadržajem  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  od 1,50 g/l na rezidualni sadržaj glicerola koji je određen po završetku kultivacije soja PAP LIST 4. Sa date odzivne površine zapaža se da povećanjem sadržaja glicerola u medijumu za biosintezu, pri konstantnoj vrednosti sadržaja ekstrakta kvasca u istom medijumu, dolazi do porasta rezidualnog sadržaja glicerola. Odzivna površina prikazana na slici 5.42.a takođe ukazuje da povećanje sadržaja izvora azota prilikom konstantnog sadržaja glicerola u medijumu za biosintezu u ispitivanom opsegu ne utiče značajno na sadržaj glicerola određen po završetku bioprocasa. S obzirom da je težnja ovog istraživanja usmerena ka maksimalnom iskorišćenju nutrijenata, može se ustanoviti da je minimalna vrednost rezidualnog sadržaja glicerola od oko 5,00 g/l modelom predviđena pri minimalnom ispitivanom sadržaju glicerola u medijumu za biosintezu (10,00 g/l), a bez dodatka ekstrakta kvasca.

Na slici 5.42.b predstavljen je modelom predviđen uticaj početnog sadržaja glicerola i  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u medijumu za biosintezu na bazi sirovog glicerola sa konstantnim sadržajem ekstrakta kvasca od 3,00 g/l na rezidualni sadržaj glicerola koji je određen po završetku kultivacije soja PAP LIST 4. Analizom prikazane odzivne površine zapaža se da povećanje inicijalnog sadržaja glicerola u medijumu za biosintezu u zadatom opsegu, a pri konstantnoj vrednosti sadržaja  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  utiče značajno na vrednost posmatranog odziva. Sa druge strane, povećanje sadržaja  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u istom medijumu pri konstantnoj koncentraciji sadržaja glicerola, ne utiče na sadržaj izvora ugljenika koji će biti određen po završetku bioprocasa. Minimalna vrednost rezidualnog sadržaja glicerola (oko 5,00 g/l) modelom je predviđena kada medijum za biosintezu inicijalno sadrži 10,00 g/l glicerola, bez dodatka  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Slika 5.42.c ilustruje modelom predviđen uticaj početnog sadržaja ekstrakta kvasca i  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u medijumu za biosintezu na bazi sirovog glicerola sa konstantnim sadržajem glicerola od 30,00 g/l na rezidualni sadržaj glicerola koji je detektovan po završetku kultivacije soja PAP LIST 4. Analizom prikazane odzivne površine može se videti da prilikom povećanja sadržaja ekstrakta kvasca, pri konstantnom sadržaju  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  iz opsega od 0 g/l do 2,00 g/l, dolazi do smanjenja rezidualnog sadržaja glicerola u proizvodnom medijumu, dok pri konstantnom sadržaju neorganskog izvora azota u opsegu od 2,00 g/l do 3,00 g/l povećanje sadržaja organskog izvora azota rezultuje povećanjem zaostale koncentracije izvora ugljenika. Pored toga, može se primetiti i da povećanje sadržaja  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u proizvodnom medijumu, pri konstantnom sadržaju ekstrakta kvasca iz opsega od 0 g/l do 3,00 g/l, dovodi do smanjenja rezidualnog sadržaja glicerola. Sa druge strane, sa povećanjem sadržaja amonijumove soli, pri konstantnom sadržaju korišćenog organskog izvora azota u opsegu od 3,00 g/l do 6,00 g/l, dolazi do povećanja rezidualne koncentracije izvora ugljenika. Ovakvi rezultati posledica su sinergističkog delovanja ispitivanog organskog i neorganskog izvora azota, na šta ukazuje i pozitivan znak koeficijenta interakcije ova dva parametra u jednačini 5.7. Minimalni rezidualni sadržaj glicerola u medijumu po završetku biosinteze od oko 15,00 g/l predviđen je ako medijum za biosintezu sadrži 3,00 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , bez dodatka ekstrakta kvasca.

### Matematički model za rezidualni sadržaj ukupnog azota

Rezultati određivanja rezidualnog sadržaja ukupnog azota predstavljeni u tabeli 5.42. fitovani su polinomom drugog reda (jednačina 4.10) pri čemu je dobijena regresiona jednačina koja opisuje uticaj ispitivanih faktora na sadržaj ukupnog azota koji zaostaje u medijumu po završetku biosinteze:

$$Y_4 = 228,1265 + 0,1124 \cdot X_1 + 133,4721 \cdot X_2 - 70,7224 \cdot X_3 - 0,0058 \cdot X_1^2 - 9,0370 \cdot X_2^2 + 30,2963 \cdot X_3^2 + 0,1667 \cdot X_1 \cdot X_2 + 1,3500 \cdot X_1 \cdot X_3 + 10,5556 \cdot X_2 \cdot X_3 \quad (5.8)$$

gde su:

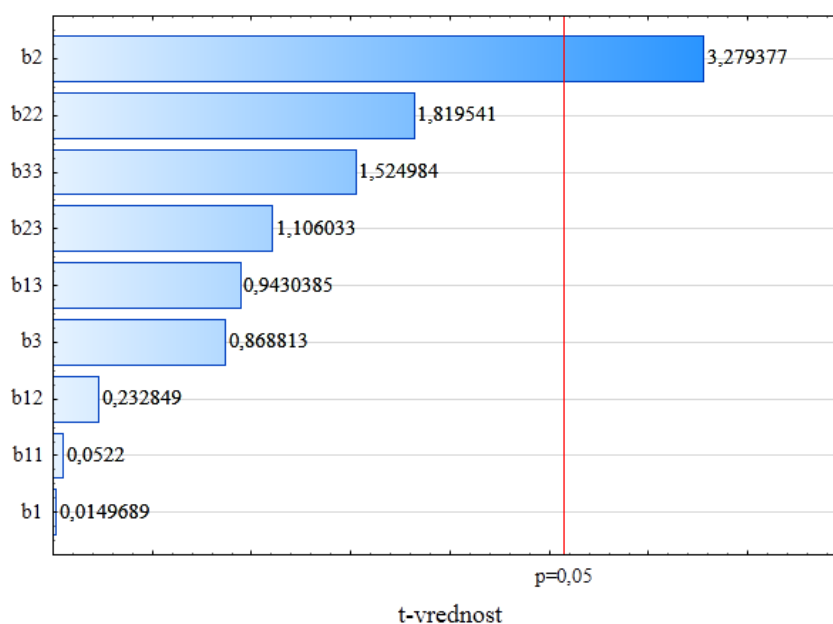
$Y_3$  - rezidualni sadržaj ukupnog azota,

$X_1$ , - sadržaj glicerola,

$X_2$  - sadržaj ekstrakta kvasca i

$X_3$  - sadržaj  $(NH_4)_2SO_4$ .

Statistička značajnost koeficijenata u generisanoj jednačini (5.8) procenjena je na osnovu  $p$ -vrednosti, a intenzitet njihovog uticaja određen je poređenjem  $t$ -vrednosti prikazanih na Pareto grafiku. Pareto grafik standardizovanih efekata na rezidualni sadržaj ukupnog azota, koji je u medijumima za biosintezu na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota određen po završetku kultivacije soja PAP LIST 4, prikazan je na slici 5.43.



Slika 5.43. Pareto grafik standardizovanih efekata na rezidualni sadržaj ukupnog azota u medijumima za biosintezu na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota po završetku kultivacije soja PAP LIST 4

Rezultati na slici 5.43. pokazuju da jedino linearni član sadržaja ekstrakta kvasca ( $b_2$ ) statistički značajno utiče na vrednost posmatranog odziva. Pozitivan znak ovog koeficijenta u jednačini 5.8. upućuje na konstataciju da količina neutrošenog azota zavisi od njegovog inicijalnog

sadržaja u medijumu za biosintezu. Efekti linearnog ( $b_1$ ) i kvadratnog člana sadržaja glicerola ( $b_{11}$ ), kvadratnog člana ekstrakta kvasca ( $b_{22}$ ), linearnog ( $b_3$ ) i kvadratnog člana  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $b_{33}$ ), kao i svi koeficijenti interakcije ( $b_{12}$ ,  $b_{13}$  i  $b_{23}$ ) nisu pokazali statistički značajan uticaj na vrednost posmatranog odziva u intervalu poverenja od 95%.

Radi boljeg razumevanja ustanovljenih efekata, generisan matematički model (jednačina 5.8) predstavljen je i grafički, trodimenzionalnim odzivnim površinama na slikama 5.44.a-c.

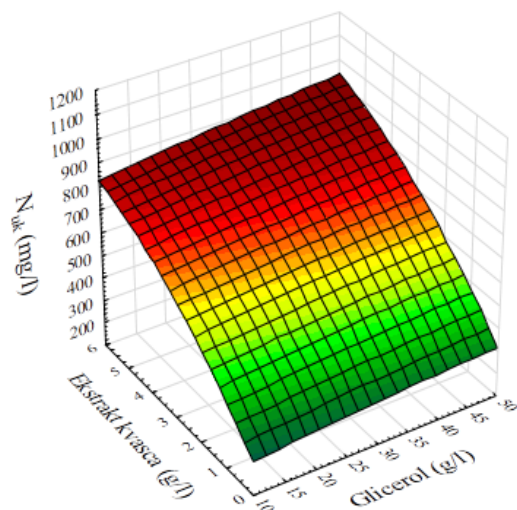
Na slici 5.44.a prikazan je modelom predviđen uticaj početnog sadržaja glicerola i ekstrakta kvasca u medijumu za biosintezu na bazi sirovog glicerola sa konstantnim sadržajem  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  od 1,50 g/l na rezidualni sadržaj ukupnog azota koji je određen po završetku kultivacije soja PAP LIST 4. Analizom grafički prikazanih rezultata može se uočiti da vrednost posmatranog odziva isključivo zavisi od inicijalne koncentracije organskog izvora azota u medijumu za biosintezu. Dakle, ukoliko se sadržaj glicerola održava konstantnim na bilo kojoj vrednosti iz analiziranog intervala dolazi do intenzivnog povećanja rezidualnog sadržaja ukupnog azota sa porastom sadržaja ekstrakta kvasca. Prema predviđanjima modela, minimalan rezidualni sadržaj ukupnog azota od oko 200,00 mg/l bio bi ostvaren ako bi medijum za biosintezu inicijalno sadržao glicerol u koncentraciji od 10,00 g/l, bez dodatka ekstrakta kvasca.

Slika 5.44.b prikazuje predikciju rezidualnog sadržaja ukupnog azota u medijumu na bazi sirovog glicerola sa konstantnim sadržajem ekstrakta kvasca od 3,00 g/l i pri variranim vrednostima sadržaja glicerola i  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u medijumu za biosintezu ksantana, a koji je određen po završetku kultivacije soja PAP LIST 4. Sa prikazane odzivne površine može se videti da, pri konstantnoj vrednosti sadržaja  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , variranje sadržaja glicerola u medijumu za biosintezu u čitavom ispitivanom opsegu ne utiče značajno na vrednost posmatranog odziva. Međutim, sa povećanjem sadržaja glicerola u pomenutom medijumu pri konstantnom sadržaju  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  iz opsega od 2,00 g/l do 3,00 g/l, dolazi do povećanja rezidualnog sadržaja ukupnog azota. Pored toga, povećanje sadržaja  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u medijumu za biosintezu, pri konstantnom sadržaju glicerola, dovodi do blagog povećanja rezidualnog sadržaja ukupnog azota pri čemu je ovaj trend nešto intenzivniji kada se primenjuju medijumi sa većom početnom koncentracijom glicerola (35-50 g/l). Kako je predviđeno modelom, minimalan rezidualni sadržaj ukupnog azota postiže se ako medijum za biosintezu sadrži 10,00 g/l glicerola, bez dodatka neorganskog izvora azota.

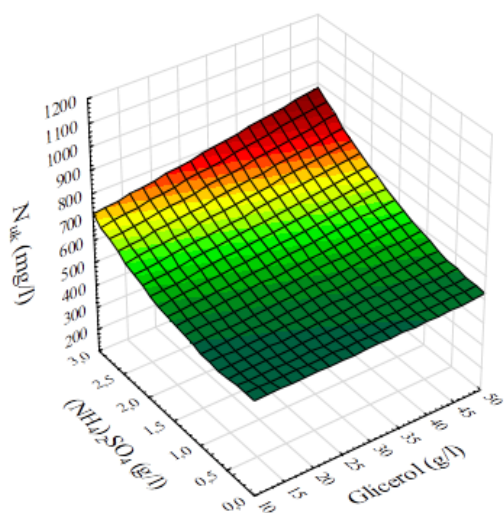
Odzivna površina prikazana na slici 5.44.c ilustruje modelom predviđen uticaj početnog sadržaja ekstrakta kvasca i  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u medijumu za biosintezu na bazi sirovog glicerola sa konstantnim sadržajem glicerola od 30,00 g/l na rezidualni sadržaj ukupnog azota koji je određen po završetku kultivacije soja PAP LIST 4. Rezultati sa pomenute slike ukazuju da, prilikom povećanja sadržaja ekstrakta kvasca pri konstantnom sadržaju  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , dolazi do povećanja količine zaostalih azotnih komponenti s tim da je ovaj trend nešto izraženiji ukoliko medijumi za biosintezu inicijalno sadrže  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u koncentraciji većoj od 2,00 g/l. Analizom grafički prikazanih rezultata primećuje se i da povećanje sadržaja  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u proizvodnom medijumu, pri konstantnom sadržaju ekstrakta kvasca u opsegu od 0 g/l do 3,00 g/l, neznatno utiče na vrednost posmatranog odziva, dok sa povećanjem inicijalne koncentracije pomenutog organskog izvora azota sa 3,00 g/l na 6,00 g/l dolazi do porasta neutrošenih azotnih komponenti. Prema predviđanjima modela, minimalan rezidualni sadržaj ukupnog azota od oko 200,00 mg/l postiže se pri minimalnim koncentracijama korišćenih izvora azota.



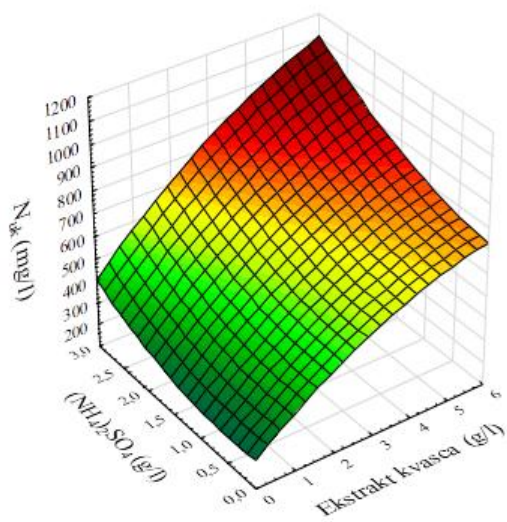
a)



b)



c)



Slika 5.44. Rezidualni sadržaj ukupnog azota ( $N_{uk}$ ) u medijumima na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 u funkciji dva faktora pri konstantnoj vrednosti trećeg:

a) sadržaj  $(NH_4)_2SO_4$  (1,50 g/l)

b) sadržaj ekstrakta kvasca (3,00 g/l)

c) sadržaj glicerola (30,00 g/l)



### 5.5.3.3. Optimizacija sadržaja glicerola i izvora azota u medijumu za biosintezu ksantana

Nakon generisanja matematičkih modela, za koje je ustanovljeno da su statistički značajni i da adekvatno opisuju uticaj nezavisnih promenljivih (početni sadržaj glicerola, početni sadržaj ekstrakta kvasca i početni sadržaj  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) na posmatrane odzive (sadržaj biosintetisanog ksantana, molekulska masa ksantana, rezidualni sadržaj glicerola i rezidualni sadržaj ukupnog azota), u sledećem koraku potrebno je definisati optimalne vrednosti variranih parametara pri kojima se ostvaruju željene vrednosti odabranih odziva. Za optimizaciju sastava medijuma za biosintezu na bazi sirovog glicerola u pogledu početnog sadržaja glicerola i izvora azota korišćena je metoda željene funkcije u kombinaciji sa prethodno generisanim matematičkim modelima (jednačine 5.5-5.8). U okviru ove faze istraživanja zadato je ostvarivanje više optimizacionih ciljeva, i to postizanje maksimalnog sadržaja ksantana, biosinteza ksantana čije srednje vrednosti molekulske masa nisu manje od  $2,75 \cdot 10^5$  g/mol, kao i dobijanje medijuma sa rezidualnim sadržajem glicerola ne većim od 5,00 g/l i minimalnim rezidualnim sadržajem ukupnog azota. Opseg željenih vrednosti za molekulska masu biopolimera definisan je prema vrednosti ovog pokazatelja kvaliteta ksantana koja je dobijena prilikom inicijalnog skrininga mogućnosti biosinteze ksantana primenom soja PAP LIST 4 na medijumu sa sirovim glicerolom (tabela 5.19). Maksimalna vrednost rezidualnog sadržaja glicerola postavljena je na 5,00 g/l shodno činjenici da je za uspešnu biotehnošku proizvodnju neophodno da rezidualni sadržaj izvora ugljenika iznosi manje od 5,00 g/l. Za definisane pojedinačne željene funkcije izvedena je optimizacija analiziranih faktora. Optimalne vrednosti ispitivanih parametara, kao i vrednosti predviđenih odziva koje su dobijene kao rezultat optimizacije pri zadatim ograničenjima prikazane su u tabeli 5.41.

Tabela 5.41. Optimalne vrednosti variranih parametara i predviđeni odzivi: sadržaj glicerola i izvora azota u medijumu za biosintezu

Promenljive	Uslovi	Granične vrednosti	Optimalne vrednosti
Glicerol (g/l)	u opsegu	10-50	16,15
Ekstrakt kvasca (g/l)	u opsegu	0-6	0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/l)	u opsegu	0-3	3,00
Odzivi			Predviđene vrednosti
P (g/l)	maksimalan	3,09-14,73	13,49
$M_w$ ( $10^5$ g/mol)	u opsegu	2,75-4,75	3,59
S (g/l)	u opsegu	0,80-5	4,43
$N_{uk}$ (mg/l)	minimalan	220,00-1110,00	354,31
<b>Ukupna željena funkcija</b>			<b>0,871</b>

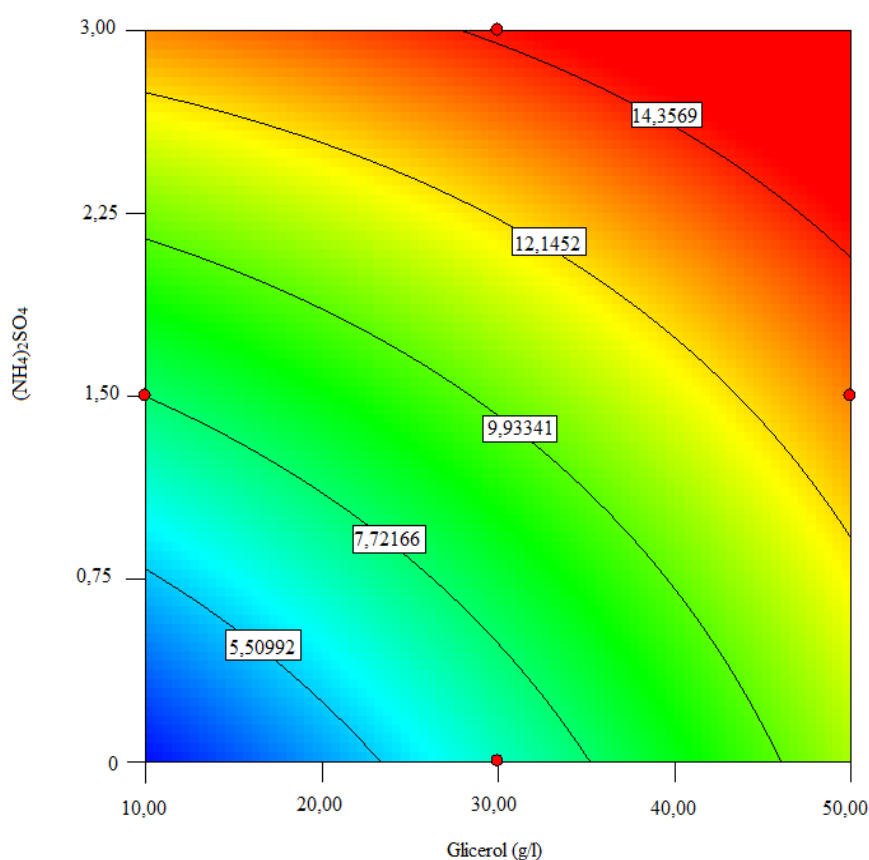
*P-sadržaj biosintetisanog ksantana;  $M_w$ -srednja molekulska masa ksantana; S-rezidualni sadržaj izvora ugljenika;  $N_{uk}$ -rezidualni sadržaj ukupnog azota.*

Rezultati prikazani u tabeli 5.41. pokazuju da je za definisane pojedinačne željene funkcije maksimalna vrednost ukupne željene funkcije zadovoljavajuće visoka i iznosi 0,871. Optimizovane vrednosti ispitivanih faktora, pri kojima željena funkcija ima najveću vrednost, su sadržaj glicerola od 16,15 g/l i sadržaj  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  od 3,00 g/l. Izvođenjem kultivacije soja

PAP LIST 4 na medijumu ovako definisanog sastava model predviđa proizvodnju ksantana molekulske mase od  $3,59 \cdot 10^5$  g/mol u koncentraciji od 13,49%, pri čemu u dobijenim kultivacionim medijumima po završetku biosinteze zaostaju male količine neutrošenog glicerola (4,43 g/l) i ukupnog azota (354,31 mg/l).

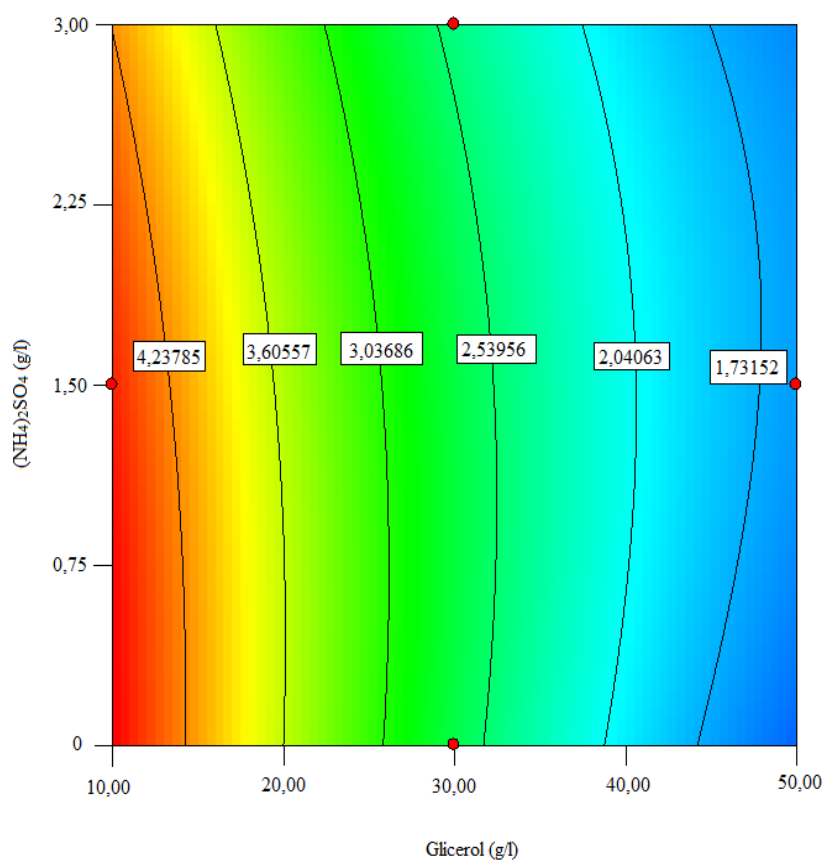
Optimizacioni rezultati prikazani su i grafički, konturnim dijagramima koji pokazuju zavisnost vrednosti posmatranih odziva od početnog sadržaja glicerola i  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u medijumu za biosintezu bez dodatka ekstrakta kvasca, a dati su na slikama 5.45-5.47.

Konturni dijagram prikazan na slici 5.45. pokazuje zavisnost sadržaja ksantana u medijumu za biosintezu na bazi sirovog glicerola, koji je određen po završetku kultivacije soja PAP LIST 4, od početnog sadržaja glicerola i  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u istom medijumu bez dodatka ekstrakta kvasca. Analizom grafički predstavljenih rezultata može se uočiti da, ako je sadržaj  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u medijumu za biosintezu konstantan, sa povećanjem sadržaja glicerola u istom medijumu dolazi i do blagog povećanja sadržaja produkovanog ksantana. Sa slike 5.45. se vidi i da ukoliko je sadržaj glicerola u medijumu za biosintezu konstantan, povećanje sadržaja  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  dovodi do blagog porasta koncentracije biosintetisanog ksantana. Prema rezultatima prikazanim na slici 5.45. proizvodni soj PAP LIST 4 će proizvoditi ksantani u najvećoj količini ukoliko inicijalni sadržaj glicerola u medijumu za biosintezu bude u opsegu od 30,00 g/l do 50,00 g/l, a sadržaj  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u opsegu od oko 2,00 g/l do 3,00 g/l.



Slika 5.45. Zavisnost sadržaja ksantana u medijumu za biosintezu na bazi sirovog glicerola po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 od početnog sadržaja glicerola i  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u medijumu za biosintezu bez dodatka ekstrakta kvasca

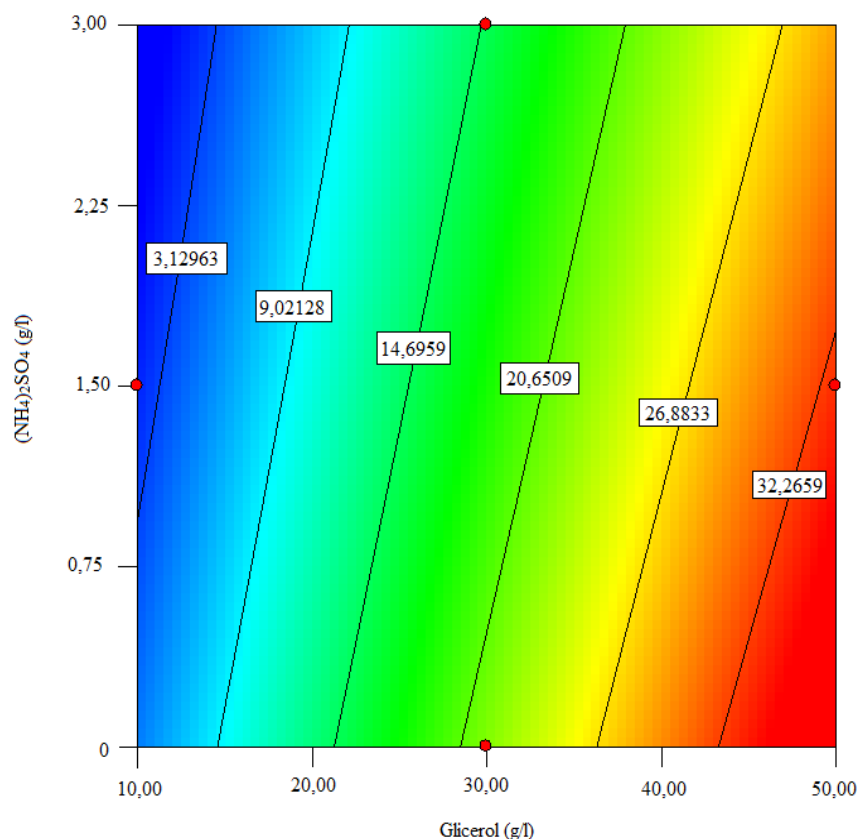
Na slici 5.46. prikazan je konturni dijagram zavisnosti molekulske mase ksantana, biosintetisanih na medijumu za biosintezu na bazi sirovog glicerola primenom soja PAP LIST 4, od početnog sadržaja glicerola i  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u istom medijumu bez dodatka ekstrakta kvasca. Analizom grafički predstavljenih rezultata može se uočiti da, ukoliko se sadržaj  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u medijumu za biosintezu održava konstantnim, povećanje sadržaja glicerola u istom medijumu dovodi do produkcije ksantana sve manjih molekulskih masa. Sa druge strane, ukoliko je sadržaj glicerola u medijumu za biosintezu konstantan, povećanje sadržaja  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u istom medijumu gotovo da ne utiče na vrednost posmatranog odziva. Prema rezultatima prikazanim na slici 5.46. ksantan najveće molekulske mase biće produkovan ukoliko sadržaj glicerola u medijumu za biosintezu ksantana bude u opsegu od 10,00 g/l do 15,00 g/l, a sadržaj  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u opsegu od 0 g/l do 2,00 g/l.



Slika 5.46. Zavisnost molekulske mase ksantana biosintetisanih na medijumu na bazi sirovog glicerola primenom soja PAP LIST 4 od početnog sadržaja glicerola i  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u medijumu za biosintezu bez dodatka ekstrakta kvasca

Konturni dijagram zavisnosti rezidualnog sadržaja glicerola u medijumu za biosintezu na bazi sirovog glicerola, koji je određen po završetku kultivacije soja PAP LIST 4, od početnog sadržaja glicerola i  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u istom medijumu bez dodatka ekstrakta kvasca predstavljen je na slici 5.47. Analizom grafički prikazanih rezultata uočava se da, ukoliko se sadržaj  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u medijumu za biosintezu održava konstantnim, povećanje sadržaja glicerola u istom medijumu

dovodi do povećanja rezidualnog sadržaja pomenutog izvora ugljenika. Međutim, ukoliko je sadržaj glicerola u medijumu za biosintezu konstantan, povećanjem sadržaja  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u istom medijumu neće doći do promene u zaostaloj količini analiziranog izvora ugljenika. Najveća vrednost rezidualnog sadržaja glicerola u medijumu za biosintezu predviđena je pri sadržaju  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  od 0 g/l do 1,50 g/l i maksimalnom ispitivanom sadržaju glicerola (50,00 g/l), dok je najniža vrednost rezidualnog sadržaja glicerola pri minimalnoj vrednosti sadržaja glicerola i maksimalnoj vrednosti sadržaja  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .



Slika 5.47. Zavisnost rezidualnog sadržaja glicerola u medijumu za biosintezu na bazi sirovog glicerola po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 od početnog sadržaja glicerola i  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  u medijumu za biosintezu

Primenom generisanih matematičkih modela (jednačine 5.5-5.8) u kombinaciji sa metodom željene funkcije izvršena je optimizacija sastava medijuma na bazi sirovog glicerola za biosintezu ksantana primenom soja PAP LIST 4, pri čemu je procenjeno da je medijum najpogodnije formulacije onaj sa 16,15 g/l glicerola i 3,00 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (tabela 5.41). Medijum navedenog sastava korišćen je kao proizvodni medijum u narednoj fazi istraživanja.

Optimizaciono rešenje generisano u okviru ovih ispitivanja doprinosi razvoju ekonomski isplativog postupka proizvodnje ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom, koja se može uočiti ukoliko se izvrši poređenje cena ekstrakta kvasca i  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , koje iznose oko 250 €/kg i 105 €/kg ([www.sigmaaldrich.com/RS/en:3.7.2021](http://www.sigmaaldrich.com/RS/en:3.7.2021)), redom, jer je u ovom koraku istraživanja skupoceni ekstrakt kvasca u potpunosti zamenjen dvostruko jeftinijim izvorom azota bez

negativnog uticaja na prinos željenog bioproizvoda. Tome ide u prilog podatak da se kultivacijom odabranog proizvodnog soja na medijumu sa sirovim glicerolom optimizovane formulacije biosintetiše ksantan u koncentraciji koja je za 29,59% veća u odnosu na prethodnu fazu istraživanja (tabela 5.37). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se Boks-Benkenov dizajn pokazao kao funkcionalan eksperimentalni plan za kreiranje ogleda koji su za cilj imali definisanje sadržaja glicerola i izvora azota u medijumu na bazi sirovog glicerola za biosintezu ksantana primenom soja PAP LIST 4.

### 5.5.2. Definisanje sadržaja izvora fosfora u medijumu za biosintezu ksantana

Medijum za biosintezu ksantana pored ugljenika i azota sadrži i druge važne nutrijente, kao što su fosfor, sumpor, kalijum, kalcijum i magnezijum. Ovi nutrijenti se u medijume za biosintezu najčešće dodaju u obliku soli fosforne ili sumporne kiseline (García-Ochoa i sar., 2000). Sastav sirovog glicerola prikazan u tabeli 5.13. (poglavljje 5.2) ukazuje na to da se dodatkom ove sirovine u medijum za biosintezu ksantana u prethodno optimizovanoj koncentraciji (tabela 5.41) unose i zadovoljavajuće količine sumpora, magnezijuma, kalijuma i kalcijuma. U skladu sa tim, prilikom pripreme medijuma za biosintezu ksantana u nastavku ispitivanja nije više dodavan  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (poglavljje 4.2.2). Međutim, količina fosfora (u vidu fosfata) koja se na pomenuti način dovodi u proizvodni medijum nije u saglasnosti sa količinom preporučenom u literaturnim navodima (Lo i sar., 1997; Carignatto i sar., 2011; Rončević i sar., 2019). Prema dostupnim podacima, izvor fosfora se u proizvodni medijum dodaje u obliku soli  $K_2HPO_4$  u količini od 1,00 g/l do 3,00 g/l (Brandão i sar., 2013; Bajić i sar., 2015b). Bitno je napomenuti da u dostupnoj naučnoj literaturi ne postoje podaci koji se odnose na ispitivanje uticaja koncentracije fosfora i jedinjenja koja sadrže fosfor u proizvodnom medijumu sa glicerolom, kao jedinim izvorom ugljenika, na uspešnost biosinteze ksantana. Iz navedenog razloga je u okviru ovog istraživanja ispitana uspešnost biosinteze ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom sa različitim početnim sadržajem izvora fosfora primenom soja PAP LIST 4 nakon čega je definisana koncentracija pomenutog nutrijenta koja je najpogodnija za uspešno izvođenje bioprocasa.

U skladu sa definisanim ciljem, u ovoj fazi istraživanja korišćen je medijum za biosintezu prethodno optimizovanog sastava, u pogledu sadržaja izvora ugljenika i azota (tabela 5.41), u kom su varirane koncentracije  $K_2HPO_4$  u opsegu od 0 g/l do 3,00 g/l, sa korakom od 0,50 g/l. Ovako definisani ogledi podrazumevali su izvođenje sedam nezavisnih kultivacija proizvodnog soja PAP LIST 4 na medijumima odgovarajuće formulacije (poglavljje 4.2) pri tačno definisanim procesnim uslovima (poglavljja 4.3 i 4.4).

Nakon završetka kultivacije proizvodnog soja, u primenjenim eksperimentalnim uslovima, izvršena je analiza dobijenih medijuma za biosintezu kako bi se potvrdila mogućnost produkcije ksantana i procenila uspešnost izvođenja bioprocasa. U cilju utvrđivanja da li je došlo do produkcije ksantana vršena su reološka merenja (poglavljje 4.6.2), a kao pokazatelji uspešnosti bioprocasa u ovoj fazi istraživanja određivani su sadržaj biosintetisanog ksantana (poglavljje 4.5), molekulska masa ksantana (poglavljje 4.6.3) i rezidualni sadržaj ukupnog fosfora (poglavljje 4.6.2). U analiziranim medijumima za biosintezu izmerene su i vrednost pH i sadržaj TDS (poglavljje 4.6.2).

Reološke karakteristike i prividni viskoziteti medijuma za biosintezu na bazi sirovog glicerola sa variranim početnim sadržajem izvora fosfora, dobijenih po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 u primenjenim eksperimentalnim uslovima, prikazani su u tabeli 5.42.

Pseudoplastične karakteristike proizvodnih medijuma, dobijenih biosintezom ksantana u primenjenim eksperimentalnim uslovima, su potvrđene vrednostima indeksa toka ( $n$ ) koje su date u tabeli 5.42. Vrednosti indeksa toka u svim analiziranim uzorcima bile su manje od 1, a kretale su se u intervalu od 0,4870 do 0,5653. Prikazane vrednosti potvrđuju pseudoplastične karakteristike medijuma za biosintezu na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem izvora fosfora, dobijenih po završetku kultivacije soja PAP LIST 4, što je ujedno i pouzdan pokazatelj produkcije ksantana. Vrednosti faktora konzistencije medijuma za biosintezu analiziranih u ovoj fazi istraživanja kretale su se u intervalu od 0,2421 Pa·s<sup>n</sup> do 0,4614 Pa·s<sup>n</sup> (tabela 5.42). Uzimajući u obzir da je faktor konzistencije direktno proporcionalan viskozitetu i da viskozitet rastvora ksantana zavisi od koncentracije biopolimera, njegove molekulske mase, dužine i sastava lanaca makromolekula, kao i stepena njihove umreženosti (García-Ochoa i sar., 2000), različite vrednosti faktora konzistencije prikazane u tabeli 5.42. ukazuju na razliku u količini i kvalitetu ksantana biosintetisanog u primenjenim eksperimentalnim uslovima prilikom kultivacije proizvodnog mikroorganizma na medijumima sa različitim sadržajem izvora fosfora. Na osnovu prethodno pomenutih vrednosti indeksa toka i faktora konzistencije izračunati su prividni viskoziteti medijuma za biosintezu dobijenih nakon završetka bioprocasa u primenjenim eksperimentalnim uslovima.

Tabela 5.42. Reološke karakteristike medijuma za biosintezu na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem izvora fosfora po završetku kultivacije soja PAP LIST 4

Redni broj ogleda	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/l)	K [Pa·s <sup>n</sup> ]	n [1]	η <sub>a</sub> [mPa·s]
1	0	0,2998	0,5238	29,98±4,02
2	0,5	0,2421	0,5653	31,04±2,47
3	1,0	0,3366	0,5120	34,36±0,38
4	1,5	0,3275	0,5383	36,77±0,77
5	2,0	0,4286	0,4870	37,52±2,62
6	2,5	0,4614	0,4838	38,77±3,53
7	3,0	0,4612	0,5027	40,93±4,52

*K – faktor konzistencije; n – indeks toka; η<sub>a</sub> – prividni viskozitet.*

Rezultati prikazani u tabeli 5.42. ukazuju na to da su se vrednosti prividnog viskoziteta medijuma za biosintezu na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem izvora fosfora, dobijene po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 u ovoj fazi istraživanja kretale od 29,98±4,02 mPa·s do 40,93±4,52 mPa·s. Najveća vrednost prividnog viskoziteta medijuma ostvarena je po završetku ogleda u kojem je koncentracija K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> u medijumu za biosintezu iznosila 3,00 g/l. Sa druge strane, najmanja vrednost prividnog viskoziteta medijuma ostvarena je u ogledu gde K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> nije dodavan u proizvodni medijum. Iz prethodno navedenog se može zaključiti da dodatak K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pozitivno deluje na porast prividnog viskoziteta medijuma po završetku biosinteze ksantana.

Po završetku kultivacije soja PAP LIST 4, uzorci medijuma za biosintezu, čija je osnova sirovi glicerol, a koji je inicijalno sadržao različitu koncentraciju izvora fosfora, su analizirani i u pogledu vrednosti pH i sadržaja TDS. Vrednosti pH kultivacionih medijuma dobijenih nakon biosinteze ksantana u primenjenim eksperimentalnim uslovima prikazane su u tabeli 8.16. (Prilog 1). Rezultati prikazani u pomenutoj tabeli pokazuju da su se vrednosti pH medijuma kretale od  $5,32 \pm 0,02$  do  $5,67 \pm 0,30$ . Evidentno je da dolazi do opadanja vrednosti ovog parametra u svim oglelima i da su one bliske kritičnoj vrednosti (5,5). Vrednosti sadržaja TDS u proizvodnim medijumima dobijenim nakon biosinteze ksantana u primenjenim eksperimentalnim uslovima takođe su prikazane u tabeli 8.16. (Prilog 1), a kretale su se od  $2,80 \pm 0,06$  g/l do  $3,87 \pm 0,03$  g/l. Dobijeni rezultati pokazuju da porastom inicijalne koncentracije fosfatne soli, koja je u medijumu za biosintezu ksantana dodata kao izvor fosfora, dolazi do očekivanog porasta vrednosti sadržaja TDS.

Kako bi se definisala najpogodnija koncentracija izvora fosfora u medijumu za biosintezu ksantana sojem PAP LIST 4 čija je osnova sirovi glicerol, izvršena je statistička obrada eksperimentalno određenih vrednosti pokazatelja uspešnosti bioprocasa. Rezultati sprovedene jednofaktorijalne analize varijanse uticaja različitog početnog sadržaja  $K_2HPO_4$  u medijumu za biosintezu na sadržaj biosintetisanog ksantana, njegovu molekulsku masu i rezidualni sadržaj ukupnog fosfora prikazani su u tabeli 5.43, a ukazuju na to da ispitivani parametar značajno utiče na vrednosti posmatranih odziva, što potvrđuju *p*-vrednosti niže od 0,05 za sva tri odziva. Rezultati statističke analize prikazani su i grafički, pravougaonim dijagramima koji su predstavljeni na slikama 5.48-5.50.

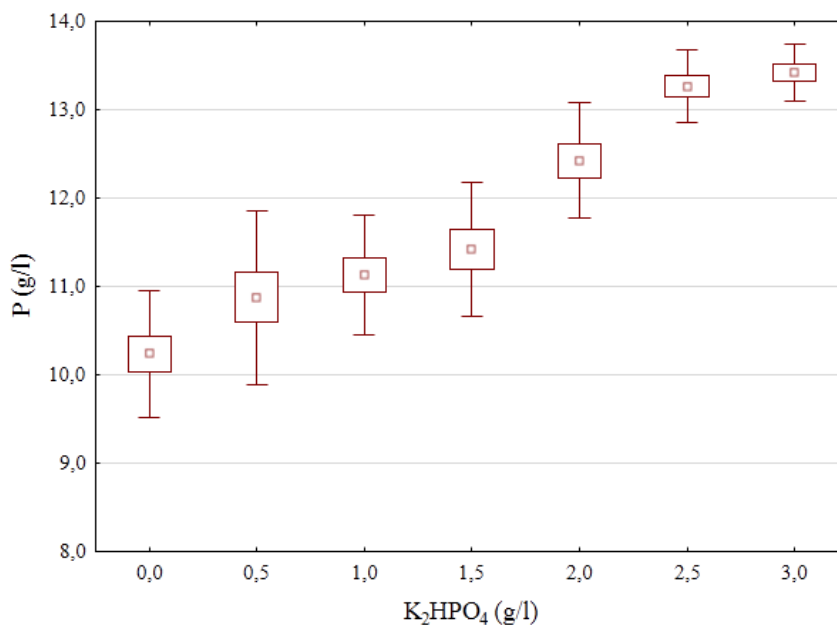
Tabela 5.43. Jednofaktorijalna analiza varijanse uticaja različitog početnog sadržaja  $K_2HPO_4$  u medijumu na bazi sirovog glicerola na pokazatelje uspešnosti biosinteze ksantana primenom soja PAP LIST 4

Odziv	Izvor varijabiliteta	SS	DF	MS	F-odnos	<i>p</i> -vrednost
<b>P (g/l)</b>	$K_2HPO_4$ (g/l)	27,155	6	4,526	39,280	< 0,000001
	Greška	1,613	14	0,115	-	-
<b><math>M_w</math> (<math>10^5</math> g/mol)</b>	$K_2HPO_4$ (g/l)	11,509	6	1,918	61,632	< 0,000001
	Greška	0,436	14	0,031	-	-
<b><math>P_{uk}</math> (mg/l)</b>	$K_2HPO_4$ (g/l)	78322,680	5	15664,540	615502,000	< 0,000001
	Greška	0,31	12	0,03		

*SS* – suma kvadrata; *DF* – stepen slobode; *MS* – srednja vrednost kvadrata; *P*-sadržaj biosintetisanog ksantana; *M<sub>w</sub>*-srednja molekulska masa ksantana; *P<sub>uk</sub>*-rezidualni sadržaj ukupnog fosfora.

Na slici 5.48. prikazani su rezultati statističke analize uticaja početne koncentracije  $K_2HPO_4$  na sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu na bazi sirovog glicerola po završetku kultivacije soja PAP LIST 4. Analizom dobijenih rezultata može se primetiti da se sadržaj ksantana produkovanih u primenjenim eksperimentalnim uslovima kretao od oko 9,50 g/l do oko 14,00 g/l. Posmatrajući rezultate prikazane na slici 5.48, može se primetiti da je najveći sadržaj

ksantana postignut prilikom kultivacije proizvodnog soja na medijumu za biosintezu koji je inicijalno sadržao 3,00 g/l  $K_2HPO_4$ . Neznatno manji sadržaj ksantana produkovan je tokom kultivacije soja PAP LIST 4 na medijumu za biosintezu koji je na početku bioprocasa sadržao 2,50 g/l  $K_2HPO_4$ . Ksantan u najmanjoj koncentraciji produkovan je u slučaju kada  $K_2HPO_4$  nije dodavan u medijum za biosintezu.



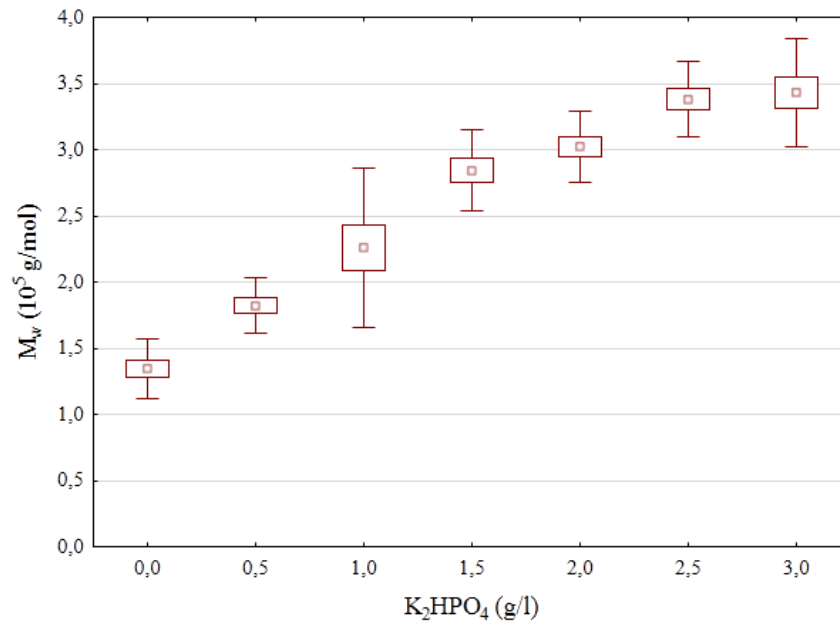
Slika 5.488. Uticaj početnog sadržaja  $K_2HPO_4$  na sadržaj ksantana (P) u medijumima za biosintezu na bazi sirovog glicerola po završetku kultivacije soja PAP LIST 4

Rezultati statističke analize uticaja početne koncentracije  $K_2HPO_4$  na molekulska masu ksantana, koje u medijumu za biosintezu na bazi sirovog glicerola produkuje soj PAP LIST 4, prikazani su na slici 5.49. Srednje vrednosti molekulske mase ksantana, biosintetisanih prilikom kultivacije odabranog proizvodnog soja u primenjenim eksperimentalnim uslovima, kretale su se u opsegu od oko  $1,00 \cdot 10^5$  g/mol do  $4,00 \cdot 10^5$  g/mol. Dobijeni rezultati ukazuju na to da je ksantan najveće molekulske mase produkovan prilikom kultivacije proizvodnog soja PAP LIST 4 na medijumu za biosintezu koji je inicijalno sadržao 3,00 g/l  $K_2HPO_4$ . Analizom rezultata predstavljenih na slici 5.49. se takođe može primetiti da je ksantan neznatno manje molekulske mase produkovan na medijumu koji je na početku kultivacije odabranog proizvodnog soja sadržao 2,50 g/l  $K_2HPO_4$ . Pored toga, evidentno je da je ksantan najmanje molekulske mase produkovan u slučaju kada  $K_2HPO_4$  nije dodavan u medijum za biosintezu.

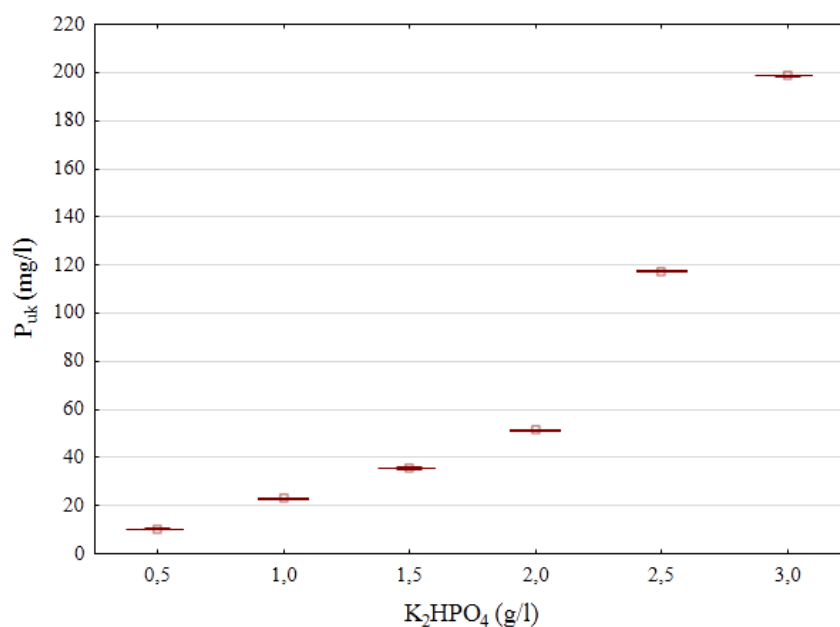
Na slici 5.50. prikazani su rezultati statističke analize uticaja početne koncentracije  $K_2HPO_4$  na rezidualni sadržaj ukupnog fosfora koji je u medijumu za biosintezu na bazi sirovog glicerola određen po završetku kultivacije soja PAP LIST 4. Vrednosti rezidualnog sadržaja ukupnog fosfora koje su određene po završetku bioprocasa u primenjenim eksperimentalnim uslovima kretale su se u opsegu od oko 10 mg/l do 200 mg/l. Rezultati prikazani na pomenutoj slici ukazuju na to da je najmanji sadržaj fosfora zaostao nakon kultivacije proizvodnog soja na medijumu za biosintezu koji je pripremljen bez dodatka  $K_2HPO_4$ . Suprotno tome, najveći



rezidualni sadržaj fosfora detektovan je u medijumu sa najvećom ispitivanom koncentracijom  $K_2HPO_4$  (3,00 g/l).



Slika 5.49. Uticaj početnog sadržaja  $K_2HPO_4$  na molekulska masu ksantana ( $M_w$ ) koje na medijumima na bazi sirovog glicerola biosintetiše soj PAP LIST 4



Slika 5.50. Uticaj početnog sadržaja  $K_2HPO_4$  na rezidualni sadržaj ukupnog fosfora ( $P_{uk}$ ) u medijumu za biosintezu na bazi sirovog glicerola po završetku kultivacije soja PAP LIST 4

Kako bi se odabrala početna koncentracija  $K_2HPO_4$  u medijumu za biosintezu, pri kojoj se ostvaruje najveća uspešnost bioprocasa u primenjenim uslovima, eksperimentalni podaci su

analizirani i primenom Dankanovog testa višestrukih poređenja. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 5.44.

Tabela 5.44. Dankanov test višestrukih poređenja: pokazatelji uspešnosti biosinteze ksantana primenom soja PAP LIST 4 na medijumima na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem  $K_2HPO_4$

Redni broj ogleda	$K_2HPO_4$ (g/l)	P (g/l)	$M_w$ ( $10^5$ g/mol)	$P_{uk}$ (mg/l)
1	0	10,24±0,36 <sup>a</sup>	1,35±0,11 <sup>a</sup>	-
2	0,50	10,87±0,49 <sup>b</sup>	1,82±0,10 <sup>b</sup>	10,25±0,13 <sup>a</sup>
3	1,00	11,13±0,34 <sup>b</sup>	2,26±0,30 <sup>c</sup>	22,86±0,13 <sup>b</sup>
4	1,50	11,42±0,38 <sup>b</sup>	2,84±0,15 <sup>d</sup>	35,52±0,25 <sup>c</sup>
5	2,00	12,42±0,33 <sup>c</sup>	3,02±0,13 <sup>d</sup>	51,24±0,09 <sup>d</sup>
6	2,50	13,26±0,20 <sup>d</sup>	3,38±0,14 <sup>e</sup>	117,39±0,16 <sup>e</sup>
7	3,00	13,42±0,17 <sup>d</sup>	3,43±0,21 <sup>e</sup>	198,73±0,14 <sup>f</sup>

\* Vrednosti u jednoj koloni obeležene istim slovima nalaze se na istom nivou značajnosti u intervalu poverenja od 95%; P-sadržaj biosintetisanog ksantana;  $M_w$ -srednja molekulska masa ksantana;  $P_{uk}$ -rezidualni sadržaj ukupnog fosfora.

Rezultati prikazani u tabeli 5.44. pokazuju da se sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu po završetku kultivacije odabranog proizvodnog soja u primenjenim eksperimentalnim uslovima kretao od 10,24±0,36 g/l do 13,42±0,17 g/l. Najbolja produkcija ovog biopolimera ostvarena je po završetku ogleada u kojem je medijum za biosintezu sadržao 3,00 g/l  $K_2HPO_4$ . Takođe, može se primetiti da se sadržaj ksantana koji je ostvaren u ovom ogleadu ne razlikuje značajno od sadržaja ksantana iz ogleada gde je početna koncentracija  $K_2HPO_4$  u medijumu za biosintezu ksantana iznosila 2,50 g/l (13,26±0,20 g/l), što potvrđuje *p*-vrednost od 0,584152. U ogleadu gde je medijum za biosintezu sadržao 2,00 g/l  $K_2HPO_4$  produkovan je ksantan u koncentraciji od 12,42±0,33 g/l. Pored toga, rezultati dati u tabeli 5.44. pokazuju da je dosta manja koncentracija ksantana (od 10,87±0,49 g/l do 11,42±0,38 g/l) ostvarena u okviru ogleada gde je početni sadržaj  $K_2HPO_4$  u medijumu za biosintezu ksantana iznosio 0,50 g/l, 1,00 g/l i 1,50 g/l. Vrednosti sadržaja biosintetisanog ksantana u prethodno pomenutim ogleadima nalaze se na istom nivou značajnosti, što potvrđuju *p*-vrednosti 0,366068, 0,081862 i 0,319180, redom. Najmanja količina ksantana detektovana je u medijumu za biosintezu koji nije sadržao  $K_2HPO_4$ . Dobijeni rezultati pokazuju veću uspešnost u poređenju sa rezultatima ranijeg istraživanja gde je prilikom kultivacije proizvodnog soja *X. campestris mangiferaeindicae* 2103 na medijumu sa sirovim glicerolom uz dodatak  $K_2HPO_4$  u koncentraciji od 1,00 g/l biosintetisan ksantan u koncentraciji od 7,23 g/l (Brandão i sar., 2013). Osim toga, proizvodni soj primenjen u ovim ispitivanjima pokazao je bolju produktivnost nego referentni soj *X. campestris* ATCC 13951 koji je prilikom kultivacije na medijumu sa sirovim glicerolom i sadržajem  $K_2HPO_4$  od 3,00 g/l produkovao 6,68 g/l ksantana (Zahović i sar., 2019). Rezultati ostvareni u ovoj fazi istraživanja sugerišu da povećanje inicijalne koncentracije  $K_2HPO_4$  u medijumu za biosintezu ksantana u ispitivanom intervalu ima pozitivan efekat na sadržaj produkovanog ksantana u primenjenim eksperimentalnim uslovima do koncentracije od 2,50 g/l, te da dalje povećanje sadržaja ove komponente medijuma ne utiče značajno na povećanje uspešnosti bioprocasa.

Prema rezultatima prikazanim u tabeli 5.44. srednje vrednosti molekulske mase ksantana biosintetisanih u primenjenim eksperimentalnim uslovima kretala se u opsegu od  $1,35 \pm 0,11 \cdot 10^5$  g/mol do  $3,43 \pm 0,21 \cdot 10^5$  g/mol. Rezultati dati u navedenoj tabeli ukazuju da je ksantan najveće molekulske mase produkovan na proizvodnom medijumu sa maksimalnom ispitivanom početnom koncentracijom  $K_2HPO_4$  (3,00 g/l). Ova vrednost nalazi se na istom nivou značajnosti kao i vrednost istog parametra koja je dobijena u okviru ogleda gde je početni sadržaj  $K_2HPO_4$  u proizvodnom medijumu iznosio 2,50 g/l ( $3,38 \pm 0,14 \cdot 10^5$  g/mol), na šta ukazuje *p*-vrednost od 0,737000. Ksantan nešto manje molekulske mase ( $2,84 \pm 0,15 \cdot 10^5$  g/mol i  $3,02 \pm 0,13 \cdot 10^5$  g/mol), dobijen je u okviru ogleda gde je koncentracija  $K_2HPO_4$  u proizvodnom medijumu inicijalno iznosila 1,50 g/l i 2,00 g/l, redom. Ove dve vrednosti nalaze se na istom nivou značajnosti, što potvrđuje *p*-vrednost od 0,232001. Dobijeni rezultati prikazani u tabeli 5.43. ukazuju da je ksantan najmanje molekulske mase produkovan u ogledu u okviru kojeg  $K_2HPO_4$  nije dodavan u medijum za biosintezu. Iz navedenih rezultata može se zaključiti da povećanje koncentracije  $K_2HPO_4$  u medijumu za biosintezu ksantana do 2,50 g/l ima pozitivan efekat na molekulsku masu ksantana biosintetisanog u primenjenim eksperimentalnim uslovima.

U tabeli 5.44. prikazani su i rezultati obrade podataka za rezidualni sadržaj ukupnog fosfora koji je u medijumima za biosintezu detektovan po završetku kultivacije soja PAP LIST 4. Prvi ogled je izuzet iz razmatranja u pogledu ovog parametra s obzirom da u ovom ogledu u medijum za biosintezu ksantana nije dodavan  $K_2HPO_4$  kao izvor fosfora. Posmatrajući rezultate prikazane u tabeli 5.44. može se primetiti da se rezidualni sadržaj ukupnog fosfora u u okviru ovog istraživanja kretao od  $10,25 \pm 0,13$  mg/l do  $198,73 \pm 0,14$  mg/l. Najmanja koncentracija ukupnog fosfora zaostala je nakon kultivacije proizvodnog soja na medijumu za biosintezu koji je inicijalno sadržao najmanje  $K_2HPO_4$  (0,5 g/l). Nešto veća vrednost rezidualnog sadržaja ukupnog fosfora od  $22,86 \pm 0,13$  mg/l određena je u medijumu koji je sadržao 1,0 g/l  $K_2HPO_4$ . Rezultati dati u tabeli 5.44. ukazuju da je porastom početne koncentracije  $K_2HPO_4$  u proizvodnom medijumu rastao i rezidualni sadržaj ukupnog fosfora u izvedenim ogledima. Shodno tome, prilikom kultivacije proizvodnog soja na medijumima za biosintezu koji su inicijalno sadržali  $K_2HPO_4$  u koncentraciji od 1,5, g/l, 2,0, g/l i 2,5, g/l zaostalo je više ukupnog fosfora, i to u koncentracijama od  $35,52 \pm 0,25$  mg/l,  $51,24 \pm 0,09$  mg/l i  $117,39 \pm 0,16$  mg/l, redom. Najveći sadržaj ukupnog fosfora, očekivano je zaostao prilikom kultivacije proizvodnog soja na medijumu koji je sadržao najveći ispitivani inicijalni sadržaj  $K_2HPO_4$  (3,00 g/l).

Rezultati dobijeni u ovoj fazi istraživanja sugerišu da povećanje početne koncentracije  $K_2HPO_4$  u medijumu za biosintezu u intervalu od 0 g/l do 2,50 g/l ima pozitivan efekat na kvantitet i kvalitet ksantana produkovanog u primenjenim eksperimentalnim uslovima. Dobijeni rezultati ukazuju da povećanjem sadržaja  $K_2HPO_4$  u medijumu za biosintezu sa 2,50 g/l na 3,00 g/l ne dolazi do statistički značajne promene u koncentraciji produkovanog ksantana, ali ni njegove molekulske mase. Rezidualni sadržaj ukupnog fosfora u medijumu očekivano raste sa povećanjem inicijalne koncentracije  $K_2HPO_4$  u medijumu za biosintezu.

Iako je u ovoj fazi istraživanja sadržaj biosintetisanog ksantana nepromenjen u odnosu na sadržaj ksantana koji je ostvaren u prethodnoj fazi istraživanja (tabela 5.41), bitno je napomenuti da je u ovom koraku optimizacije količina  $K_2HPO_4$  koja se dodaje u medijumu za biosintezu smanjena za 16,67%. Uzimajući u obzir sve navedeno, u daljem istraživanju kao medijum za biosintezu ksantana korišćen je medijum sa sirovim glicerolom prethodno optimizovanog sastava u pogledu sadržaja glicerola i izvora azota (tabela 5.41) obogaćen sa 2,50 g/l  $K_2HPO_4$ .

## 5.6. ISPITIVANJE TOKA BIOSINTEZE KSANTANA NA MEDIJUMU SA SIROVIM GLICEROLOM U UVEĆANIM RAZMERAMA

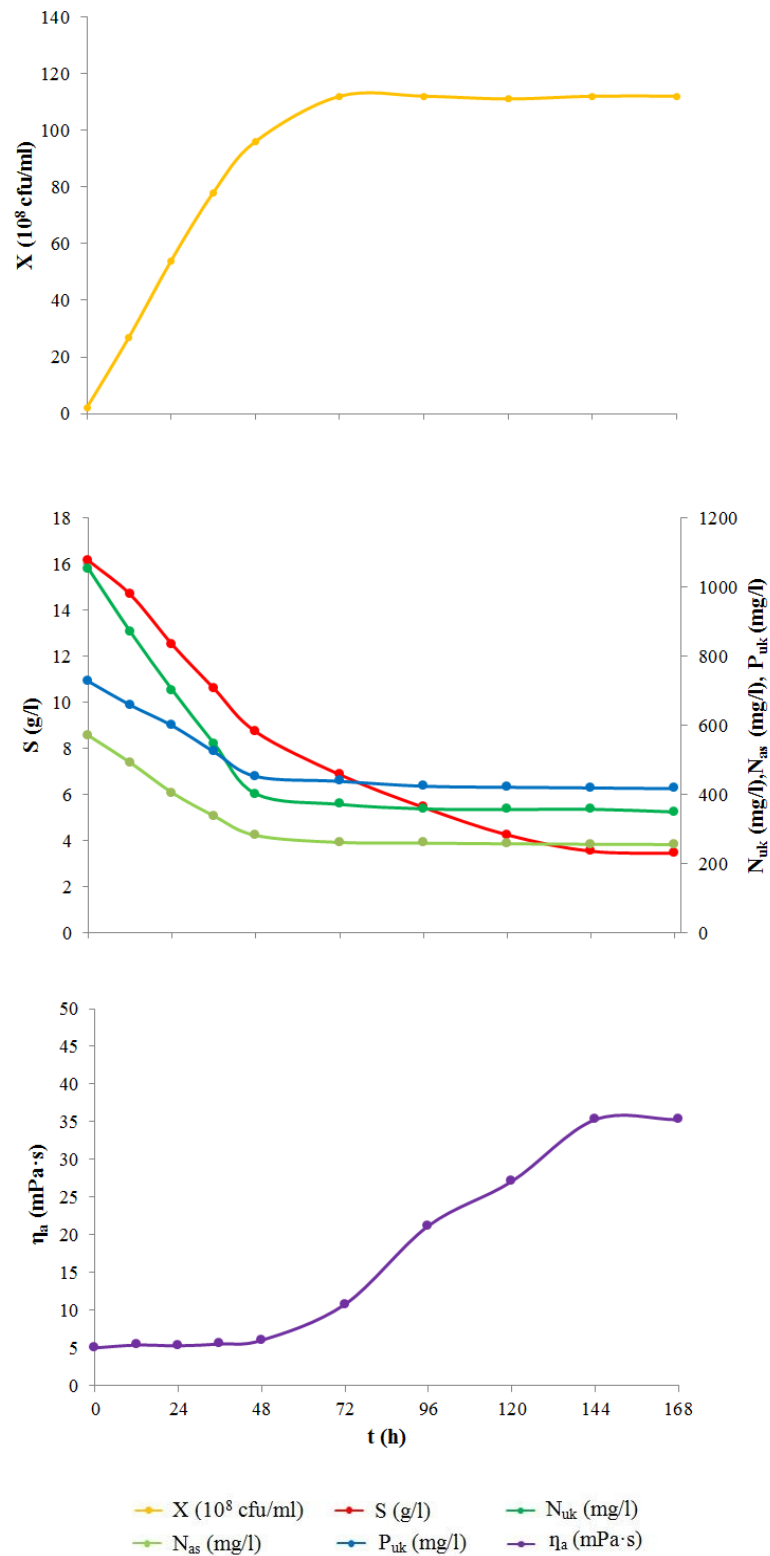
Nakon optimizacije procesa proizvodnje ksantana na laboratorijskom nivou sledeći korak predstavlja ispitivanje uspešnosti biosinteze u uvećanim razmerama, a izvodi se sa ciljem prevođenja bioprocesa sa laboratorijskog na industrijski nivo. Kako bi se ispitao tok biosinteze ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom u uvećanim razmerama, u okviru ovih istraživanja izvedena je kultivacija soja PAP LIST 4 u laboratorijskim bioreaktorima različitih zapremine (poglavlje 4.4), pri čemu su u određenim fazama proizvodnog postupka primenjivani medijumi prethodno optimizovanog sastava (poglavlja 5.4. i 5.5). S obzirom da je ksantan sekundarni metabolit bakterija roda *Xanthomonas*, intenziviranje sekundarnog metabolizma odabranog proizvodnog mikroorganizma izvedeno je vođenjem bioprocesa u dve faze. U prvoj fazi, temperatura, brzina mešanja i intenzitet aeracije podešeni su tako da omogućavaju intenzivan rast i umnožavanje ćelija, dok su u drugoj fazi njihove vrednosti korigovane tako da favorizuju biosintezu ksantana (García-Ochoa i sar., 2000). Korekcija vrednosti navedenih parametara vršena je nakon 48 h kultivacije. Tok biosinteze ksantana u primenjenim eksperimentalnim uslovima praćen je analizom uzoraka kultivacionog medijuma, uzetih u prethodno definisanim vremenskim intervalima, u pogledu sadržaja biomase, sadržaja najznačajnijih nutrijenata za biotehnošku proizvodnju ovog biopolimera i reoloških parametara. Dinamika uzorkovanja određena je prema zapremini bioreaktora u kojem se biosinteza odvijala. Eksperimentalno dobijene vrednosti analiziranih parametara toka biosinteze ksantana u laboratorijskim bioreaktorima zapremine 3 l i 14 l prikazane su grafički na slikama 5.51. i 5.52., redom. Uspešnost bioprocesa procenjena je na osnovu sadržaja biosintetisanog ksantana, njegove molekulske mase i stepena konverzije najznačajnijih nutrijenata.

Biosinteza ksantana u laboratorijskim bioreaktorima korišćenim u ovom istraživanju izvedena je u kontrolisanim uslovima, koji su podrazumevali merenje i regulaciju vrednosti pH i temperature, ali i sadržaja rastvorenog kiseonika kroz korekciju brzine mešanja i intenziteta aeracije. Već je navedeno da se optimalna vrednost pH za biosintezu ksantana nalazi u opsegu od 6,5 do 7,5 te da tokom izvođenja ovog biotehnoškog procesa dolazi do opadanja vrednosti pomenutog parametra usled produkcije organskih kiselina i ksantana koji ima kisele funkcionalne grupe (García-Ochoa i sar., 2000). Stoga je vrednost pH korigovana tokom trajanja bioprocesa, odnosno održavana je iznad 6,0 doziranjem odgovarajućeg rastvora baze. Sadržaj rastvorenog kiseonika je održavan iznad 30% tokom čitavog trajanja bioprocesa regulacijom intenziteta aeracije i brzine mešanja kako je i preporučeno u ranije sprovedenim istraživanjima (Rončević, 2016). Tokom trajanja biosinteze ksantana uzorci kultivacionog medijuma analizirani su i u pogledu sadržaja TDS pri čemu je ustanovljeno da nije došlo do drastične promene u koncentraciji ukupno rastvorenih soli i da se ona kretala oko 3,00 g/l.

Na slici 5.51. prikazana je promena sadržaja biomase, najvažnijih nutrijenata i prividnog viskoziteta medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom optimizovanog sastava tokom kultivacije soja PAP LIST 4 u laboratorijskom bioreaktoru ukupne zapremine od 3 l. Sa druge strane, promena sadržaja biomase, najvažnijih nutrijenata i prividnog viskoziteta medijuma za biosintezu sa sirovim glicerolom optimizovanog sastava tokom kultivacije istog proizvodnog soja u laboratorijskom bioreaktoru ukupne zapremine od 14 l data je na slici 5.52.

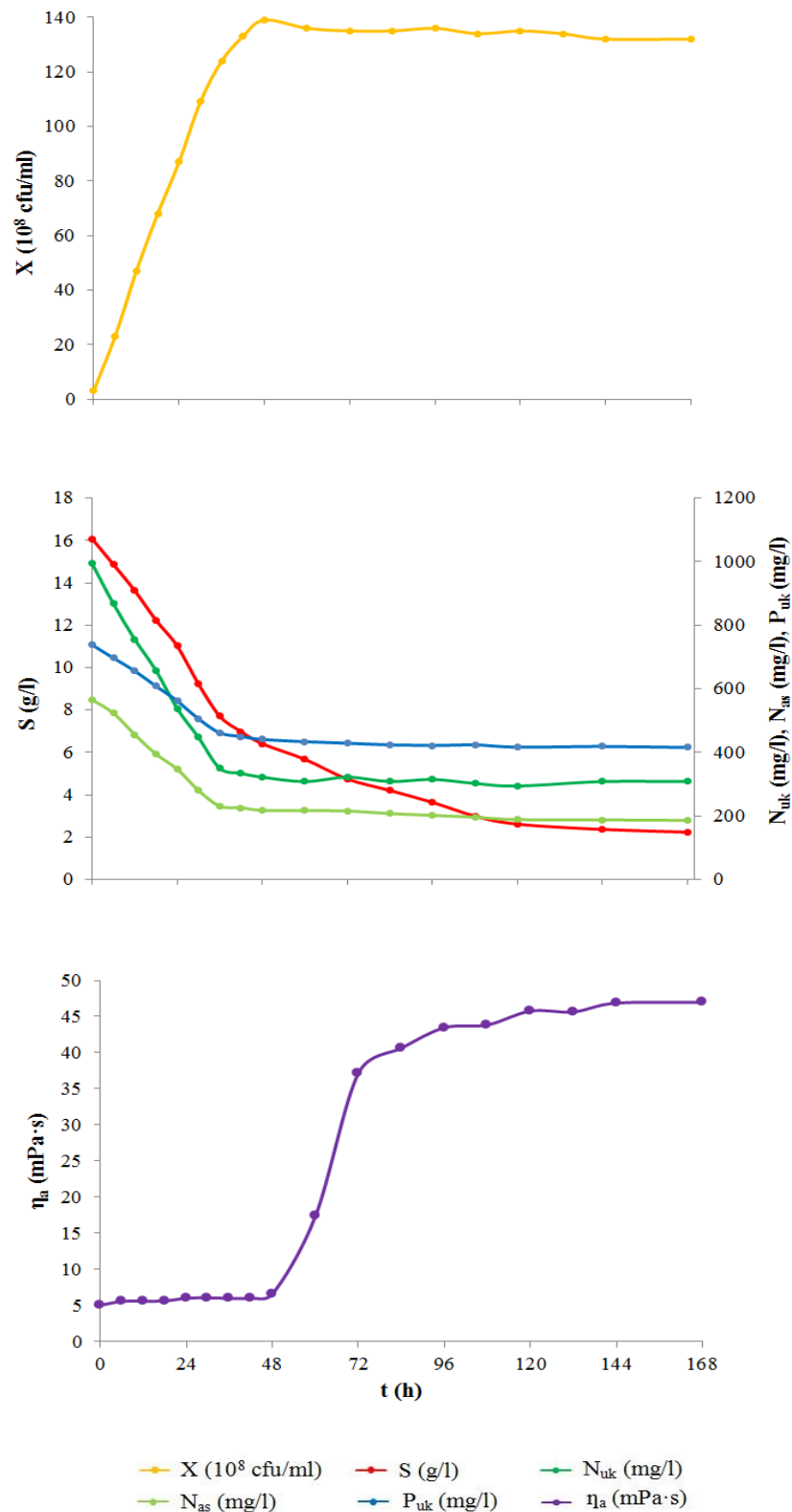
Rezultati određivanja sadržaja biomase prikazani na slikama 5.51. i 5.52. ukazuju na to da se koncentracija ćelija soja PAP LIST 4 povećavala od samog početka njegove kultivacije u oba bioreaktora na medijumu optimalne formulacije sa sirovim glicerolom kao izvorom ugljenika. Izostanak lag faze rasta proizvodnog mikroorganizma ukazuje na to da je priprema inokuluma adekvatno standardizovana u prethodnim fazama istraživanja (poglavlje 5.4). Rezultati za sadržaj biomase prikazani na slici 5.51. ukazuju na to da se u toku prvih 48 h kultivacije proizvodni mikroorganizam intenzivno umnožavao jer je sadržaj ćelija u medijumu za biosintezu sa inicijalnih  $2,18 \cdot 10^8$  cfu/ml porastao na oko  $96 \cdot 10^8$  cfu/ml. Između 48 h i 72 h primećen je sporiji rast sadržaja biomase, pri čemu njegova vrednost u 72 h dostiže maksimum i iznosi  $112 \cdot 10^8$  cfu/ml. Nakon 72 h ne dolazi do značajnije promene u sadržaju biomase, te se može zaključiti da je nastupila stacionarna faza rasta proizvodnog mikroorganizma. U 168 h biosinteze sadržaj biomase iznosio je  $112 \cdot 10^8$  cfu/ml. Posmatrajući rezultate prikazane na slici 5.52. može se uočiti sličan trend promene sadržaja biomase tokom biosinteze ksantana. Rezultati sadržaja biomase prikazani na navedenoj slici ukazuju na to da se soj PAP LIST 4 u toku prvih 36 h kultivacije intenzivno umnožavao jer je sadržaj ćelija sa inicijalnih  $3,1 \cdot 10^8$  cfu/ml porastao na oko  $124 \cdot 10^8$  cfu/ml. Nakon 36 h kultivacije evidentan je blaži rast sadržaja biomase koji je prisutan sve do 48 h. Sadržaj biomase u 48h biosinteze iznosio je  $139 \cdot 10^8$  cfu/ml. Analizom rezultata prikazanih na slici 5.52. može se primetiti da nakon 48 h ne dolazi do značajnije promene sadržaja biomase što upućuje na konstataciju da je nastupila stacionarna faza rasta proizvodnog mikroorganizma. U 168 h biosinteze sadržaj biomase iznosio je  $132 \cdot 10^8$  cfu/ml. Prema podacima iz dostupne literature, za uspešnu biotehnološku proizvodnju ksantana neophodno je da se vrednost početnog sadržaja biomase nalazi u opsegu od oko  $10^6$  cfu/ml do  $10^8$  cfu/ml (Pejin, 2003).

Rezultati prikazani na slikama 5.51. i 5.52. ukazuju na to da je sadržaj glicerola u medijumu za biosintezu tokom izvođenja bioprocesa u bioreaktorima ukupne zapremine 3 l i 14 l intenzivno opadao od samog početka kultivacije soja PAP LIST 4. Početni sadržaj glicerola u medijumima za biosintezu ksantana u bioreaktorima od 3 l i 14 l iznosio je 16,11 g/l i 16,08 g/l, redom. Posmatrajući rezultate predstavljene na slici 5.51. može se primetiti da je u toku prvih 48 h kultivacije došlo do intenzivnog smanjenja sadržaja glicerola i to do vrednosti od 8,69 g/l. Nakon 48 h sadržaj glicerola i dalje se smanjivao, ali nešto slabijim intenzitetom sve do 144 h, kada je prisustvo ove komponente medijuma detektovano u koncentraciji od 3,52 g/l. Nakon 144 h ne dolazi do značajne promene sadržaja glicerola u medijumu. Sa druge strane, grafički predstavljeni rezultati na slici 5.52. pokazuju da intenzivna potrošnja glicerola prilikom biosinteze ksantana u biorektoru od 14 l traje do 36 h kada je sadržaj ovog nutrijenta iznosio 7,71 g/l. Nakon 36 h sadržaj glicerola je i dalje opadao, ali blažim intenzitetom sve do 120 h, kada je njegova vrednost iznosila 2,61 g/l. Može se primetiti da nakon 120 h ne dolazi do značajne promene sadržaja glicerola u medijumu prilikom kultivacije odabranog proizvodnog soja u navedenom biorektoru. Analizirajući prethodno diskutovane rezultate može se zaključiti da je dinamika opadanja sadržaja glicerola u navedenim bioreaktorima slična, ali da je potrošnja glicerola zaustavljena ranije u biorektoru veće zapremine.



*X-sadržaj biomase; S-rezidualni sadržaj izvora ugljenika;  $N_{uk}$ -rezidualni sadržaj ukupnog azota;  $N_{as}$ -rezidualni sadržaj asimilabilnog azota;  $P_{uk}$ -rezidualni sadržaj ukupnog fosfora;  $\eta_a$ -prividni viskozitet;  $t$ -vreme trajanja bioprocesa.*

Slika 5.51. Tok biosinteze ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom primenom soja PAP LIST 4 u laboratorijskom bioreaktoru ukupne zapremine 3 l



*X*-sadržaj biomase; *S*-rezidualni sadržaj izvora ugljenika;  $N_{uk}$ -rezidualni sadržaj ukupnog azota;  $N_{as}$ -rezidualni sadržaj asimilabilnog azota;  $P_{uk}$ -rezidualni sadržaj ukupnog fosfora;  $\eta_a$ -prividni viskozitet; *t*-vreme trajanja bioprocesa.

Slika 5.52. Tok biosinteze ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom primenom soja PAP LIST 4 u laboratorijskom bioreaktoru ukupne zapremine 14

Promena sadržaja ukupnog azota u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom prethodno optimizovanog sastava tokom kultivacije soja PAP LIST 4 u bioreaktorima zapremine od 3 l i 14 l takođe je prikazana na slikama 5.51. i 5.52., redom. Grafički prikazani rezultati na pomenutim slikama ukazuju na to da je sadržaj ukupnog azota intenzivno opadao od samog početka izvođenja bioprocesa u oba ispitivana slučaja. Prilikom biosinteze ksantana u bioreaktoru ukupne zapremine 3 l sadržaj ukupnog azota je od inicijalnih 1050 mg/l do 48 h opao na vrednost od oko 400 mg/l. Sa druge strane, kada se ispitivani bioproces izvodio u bioreaktoru od 14 l sadržaj ukupnog azota od početnih 994 mg/l je do 36 h intenzivno opao na vrednost od 350 mg/l. Može se primetiti da period intenzivne potrošnje azotnih komponenti odgovara periodu u kom se odvijala eksponencijalna faza rasta proizvodnog mikroorganizma. U nastavku kultivacije soja PAP LIST 4 u oba izvedena ogleda nije došlo do značajnije promene sadržaja ukupnog azota što je posledica nastupanja stacionarne faze rasta proizvodnog mikroorganizma.

Na slikama 5.51. i 5.52. prikazana je i promena sadržaja asimilabilnog azota tokom kultivacije soja PAP LIST 4 na medijumu sa sirovim glicerolom u bioreaktorima ukupne zapremine 3 l i 14 l, redom. Posmatrajući predstavljene rezultate može se primetiti identičan trend promene kao kod sadržaja ukupnog azota u oba ispitivana slučaja. Naime, u oba ogleda je sadržaj asimilabilnog azota opadao od samog početka bioprocesa. Prilikom biosinteze ksantana u bioreaktoru od 3 l sadržaj asimilabilnog azota je od 568,40 mg/l do 48 h opao na vrednost od oko 280,00 mg/l. Sa druge strane, tokom 36 h kultivacije proizvodnog soja u bioreaktoru od 14 l sadržaj asimilabilnog azota je od 565,6 mg/l opao na vrednost od 230,74 mg/l. Prilikom biosinteze ksantana u bioreaktoru od 3 l nakon 48 h nije došlo do značajnije promene sadržaja asimilabilnog azota, dok je prilikom biosinteze u bioreaktoru od 14 l to slučaj nakon 36 h. Dobijeni rezultati potvrđuju da se prestanak intenzivnog smanjenja sadržaja asimilabilnog azota poklapa sa momentom prestanka potrošnje ukupnih azotnih komponenti. Međutim, veća potrošnja ukupnog azota u odnosu na asimilabilni ukazuje na to da su ćelije soja PAP LIST 4 za rast i razmnožavanje, pored amino i amonijačnog azota koristile i neka druga azotna jedinjenja.

Grafički prikazani rezultati na slikama 5.51. i 5.52. ukazuju na to da je tokom kultivacije soja PAP LIST 4 na medijumu sa sirovim glicerolom u bioreaktorima od 3 l i 14 l, redom, došlo do intenzivne potrošnje fosfora neposredno nakon inokulacije. S obzirom da je fosfor limitirajući nutrijent u medijumu za biosintezu ksantana očekuje se da promena sadržaja fosfora prati promenu sadržaja azota (García-Ochoa i sar., 1992). Analizirajući predstavljene rezultate može se primetiti da je promena sadržaja ukupnog fosfora slična promeni sadržaja ukupnog, ali i asimilabilnog azota tokom kultivacije proizvodnog mikroorganizma na medijumu sa sirovim glicerolom u bioreaktorima zapremine od 3 l i 14 l. Prilikom izvođenja biosinteze ksantana u bioreaktoru zapremine od 3 l inicijalni sadržaj fosfora od 725,09 mg/l intenzivno je opadao do 48 h, kada je njegov sadržaj iznosio oko 450,63 mg/l. Sa druge strane, prilikom biosinteze ksantana u bioreaktoru od 14 l inicijalni sadržaj ukupnog fosfora od 738,20 mg/l opadao je najvećom brzinom do 36 h, kada je njegova vrednost bila 461,36 mg/l. Prilikom biosinteze ksantana u bioreaktoru od 3 l nakon 48 h nije došlo do značajnije promene sadržaja ukupnog fosfora, dok je prilikom biosinteze u bioreaktoru od 14 l promena sadržaja ukupnog fosfora bila neznatna nakon 36 h.



Posmatrajući rezultate promene sadržaja najznačajnijih nutrijenata u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom, prilikom kultivacije soja PAP LIST 4 u bioreaktorima ukupne zapremine od 3 l i 14 l, može se zaključiti da se metabolička aktivnost primenjenog proizvodnog soja u eksperimentalnim uslovima nesmetano odvijala, odnosno da je došlo do umnožavanja biomase, i da su obezbeđeni svi uslovi za uspešno izvođenje biosinteze ksantana. U cilju utvrđivanja da li je u ispitivanim uslovima i uvećanim razmerama došlo do produkcije ksantana vršena su reološka merenja. Izmerene vrednosti fitovane su stepenim zakonom kako bi se definisale vrednosti indeksa toka i faktora konzistencije (tabele 8.17. i 8.18) na osnovu kojih je izračunat prividni viskozitet kultivacionih medijuma. Promena prividnog viskoziteta medijuma sa sirovim glicerolom tokom kultivacije soja PAP LIST 4 u bioreaktorima zapremine od 3 l i 14 l prikazana je na slikama 5.51. i 5.52., redom. Rezultati prikazani na slici 5.51. pokazuju da se vrednost prividnog viskoziteta medijuma prilikom biosinteze u bioreaktoru zapremine od 3 l nije značajno menjala do 72 h. U tom periodu, sa inicijalnih 4,50 mPa·s ova vrednost je porasla na 10,60 mPa. Prilikom biosinteze u bioreaktoru zapremine 14 l nije došlo do značajne promene viskoziteta u prvih 48 h. Inicijalna vrednost prividnog viskoziteta u ovom ogledu iznosila je 5,08 mPa·s, a nakon navedenog vremenskog perioda vrednost istog parametra bila je 6,55 mPa·s. Nakon 72 h kultivacije proizvodnog mikroorganizma u bioreaktoru zapremine od 3 l zabeležen je drastičan porast prividnog viskoziteta medijuma za biosintezu sve do 120 h, kada je njegova vrednost iznosila 32,89 mPa·s. Sa druge strane, prilikom biosinteze u bioreaktoru zapremine 14 l, do drastičnog rasta vrednosti prividnog viskoziteta došlo je nakon 60 h kultivacije. Ovaj intenzivan rast trajao je do 120 h i u tom trenutku vrednost ovog parametra iznosila je 35,74 mPa·s. Posmatrajući rezultate prikazane na slikama 5.51. i 5.52. može se uočiti da je rast prividnog viskoziteta medijuma u oba slučaja rastao manjim intenzitetom nakon 120 h kultivacije, a na kraju biosinteze vrednosti ovog parametra iznosile su 37,66 mPa·s i 41,10 mPa·s, redom. Iako grafički prikazani rezultati na slikama 5.51. i 5.52. pokazuju da nije došlo do značajnije potrošnje izvora ugljenika nakon 120 h, prividni viskozitet je blago rastao. Porast viskoziteta nakon 120 h najverovatnije je uzrokovan promenom kvaliteta produkovanog ksantana usled umrežavanja piruvatnih i acetatnih grupa unutar molekula ksantana (Reis i sar., 2010).

Vrednosti reoloških parametara proizvodnih medijuma dobijenih u ispitivanim eksperimentalnim uslovima ukazuju na pseudoplastični tip proticanja. Uz to, diskutovane promene vrednosti prividnog viskoziteta medijuma tokom kultivacije odabranog proizvodnog soja u bioreaktorima ukupne zapremine od 3 l i 14 l pouzdana su potvrda da je u primenjenim uslovima došlo do biosinteze ksantana. U cilju tačne procene uspešnosti biosinteze ksantana na medijumu sa sirovim glicerolu u bioreaktorima zapremine od 3 l i 14 l, određeni su odabrani pokazatelji uspešnosti bioprocasa. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 5.45.

Tabela 5.45. Pokazatelji uspešnosti biosinteze ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom primenom soja PAP LIST 4 u laboratorijski bioreaktorima

Ukupna zapremina bioreaktora	P (g/l)	$K_{P/S}$ (%)	$K_S$ (%)	$K_N$ (%)	$K_{Puk}$ (%)	$M_w$ ( $10^5$ g/mol)	$\eta_{a1\%}$
3 l	13,44	91,82	76,60	66,86	42,70	3,36	31,73
14 l	13,95	98,44	85,39	69,01	43,72	3,42	33,23

*P*-sadržaj biosintetisanog ksantana;  $K_{P/S}$ -stepen konverzije izvora ugljenika u ksantan;  $K_S$ -stepen konverzije izvora ugljenika;  $K_N$ -stepen konverzije ukupnog azota;  $K_{Puk}$ -stepen konverzije ukupnog fosfora;  $M_w$ -srednja molekulska masa ksantana;  $\eta_{a1\%}$ -prividni viskozitet 1%(w/v) rastvora ksantana u 0,1 M NaCl.

Rezultati prikazani u tabeli 5.45. pokazuju da zapremina bioreaktora u kojem se biosinteza ksantana odvija utiče na njenu uspešnost. Prema podacima iz navedene tabele veća količina ksantana produkovana je prilikom kultivacije soja PAP LIST 4 u bioreaktoru zapremine 14 l, a njegov sadržaj u medijumu za biosintezu po završetku bioprocasa iznosio je 13,95 g/l. Dobijeni rezultat je u skladu sa očekivanjima s obzirom na to da je po završetku bioprocasa u ovom bioreaktoru zabeležena veća vrednost prividnog viskoziteta medijuma za biosintezu (slike 5.51. i 5.52). U poređenju sa prethodno dobijenim rezultatima ostvarenih u okviru ove doktorske disertacije i istraživanjima naučnika iz Brazila, u kojima je prilikom biosinteze ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom (20 g/l) u bioreaktoru zapremine od 4,5 l primenom proizvodnog soja *X. campestris mangiferaeindicae* 2103 ostvaren sadržaj ksantana od 5,59 g/l (Assis i sar., 2014), može se konstatovati da je postignuta velika uspešnost bioprocasa ako se kao indikator posmatra količina produkovanog biopolimera.

Iako se uspešnost izvođenja bioprocasa uglavnom procenjuje na osnovu vrednosti sadržaja željenog bioproizvoda, konverzija supstrata u proizvod takođe je jedan od značajnih pokazatelja uspešnosti. Prema dobijenim rezultatima (tabela 5.45) velika količina glicerola, od čak 98,44%, konvertovana je u ksantan prilikom izvođenja bioprocasa u bioreaktoru zapremine od 14 l. Iako manja od prethodno pomenute vrednosti, vrednost stepena konverzije izvora ugljenika u ksantan za ogled izveden u bioreaktoru zapremine od 3 l bila je visoka, a iznosila je 91,82%. Ukoliko se uzme u obzir da se u industrijskim uslovima stepen konverzije izvora ugljenika u ksantan kreće u intervalu od 50-85% (Rosalam i England, 2006) može se zaključiti da je tokom izvođenja biosinteze ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom u korišćenim laboratorijskim bioreaktorima i u primenjenim eksperimentalnim uslovima postignuta visoka uspešnost.

Ukupna konverzija nutrijenata u medijumu je još jedan pokazatelj uspešno izvedenog bioprocasa. Od analiziranih nutrijenata, glicerol je konvertovan u najvećem stepenu usled njegovog trošenja za rast ćelija proizvodnog mikroorganizma, ali i za biosintezu ksantana (Elsayed i sar., 2016). Ukupna konverzija glicerola prilikom izvođenja bioprocasa u korišćenim laboratorijskim bioreaktorima znatno se razlikovala među izvedenim ogledima (tabela 5.45). Veća konverzija ovog nutrijenta uočena je prilikom izvođenja bioprocasa u bioreaktoru zapremine od 14 l i iznosila je 85,39%, dok je prilikom izvođenja bioprocasa u bioreaktoru zapremine od 3 l ova vrednosti bila 76,60%. Iz navedenog se može zaključiti da uvećane razmere povoljno deluju na povećanje stepena konverzije ukupnog glicerola prilikom biosinteze ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom u primenjenim eksperimentalnim uslovima što je u saglasnosti sa podacima iz dostupne naučne literature koji sugerišu da uvećanje razmera bioprocasa pozitivno deluje na razvoj primarnih i sekundarnih metaboličkih aktivnost proizvodnog mikroorganizma (Elsayed i sar., 2016).

Pored izvora ugljenika, izvori azota i fosfora takođe predstavljaju značajne nutrijente u biotehnološkoj proizvodnji ksantana. Vrednosti konverzije ovih nutrijenata prikazane su u tabeli 5.45. Prema rezultatima datim u navedenoj tabeli jasno je da je veći stepen konverzije ukupnog azota ostvaren prilikom biosinteze ksantana u bioreaktoru zapremine od 14 l, kada je vrednost konverzije ovog nutrijenta iznosila 69,01%. Vrednost stepena konverzije ukupnog azota ostvarena prilikom biosinteze ksantana u bioreaktoru zapremine od 3 l bila je nešto manja i iznosila je 66,86%. Posmatrajući rezultate prikazane u tabeli 5.45. može se primetiti da se stepen konverzije izvora fosfora prilikom biosinteze ksantana u primenjenim bioreaktorima razlikuje za

1% (tabela 5.45). Konverzija fosfora od 43,72% ostvarena je tokom biosinteze ksantana u bioreaktoru zapremine od 14 l, dok je ova vrednost nakon izvođenja istog bioprocesa u bioreaktoru zapremine od 3 l iznosila 42,70%.

Srednje vrednosti molekulske mase ksantana, biosintetisanih tokom kultivacije soja PAP LIST 4 na medijumu sa sirovim glicerolom u primenjenim bioreaktorima, prikazane u tabeli 5.45. i sugerišu da postoji razlika u strukturi produkovanog ksantana. Navedeni rezultati pokazuju da je ksantan veće molekulske mase produkovan nakon biosinteze ksantana u bioreaktoru zapremine od 14 l i da je ova vrednost iznosila  $3,42 \cdot 10^5$  g/mol. Molekulska masa ksantana produkovanog prilikom izvođenja bioprocesa u bioreaktoru zapremine od 3 l bila je nešto manja i iznosila je  $3,36 \cdot 10^5$  g/mol. Razliku u vrednosti molekulske mase izdvojenog ksantana, a samim tim i njegovoj strukturi potvrđuju i razlike u vrednosti prividnog viskoziteta pripremljenih rastvora izdvojenih ksantana. Vrednost prividnog viskoziteta rastvora ksantana produkovanog nakon biosinteze u bioreaktoru zapremine od 14 l bila je nešto veća i iznosila je 33,23 mPa·s, dok je vrednost rastvora ksantana produkovanog nakon biosinteze u bioreaktoru zapremine od 3 l iznosila 31,73 mPa·s. Iako su primećene, razlike u vrednostima određivanih pokazatelja kvaliteta produkovanog biopolimera nisu tokoliko značajne.

Analizom svih dobijenih rezultata datih u tabeli 5.45. utvrđeno je da je veća uspešnost bioprocesa ostvarena prilikom biosinteze u bioreaktoru zapremine od 14 l na osnovu čega se može zaključiti da uvećanje razmera kultivacije soja PAP LIST 4 na medijumu sa sirovim glicerolom prethodno optimizovanog sastava u primenjenim eksperimentalnim uslovima pozitivno utiče na uspešnost ovog bioprocesa.

U poređenju sa rezultatima ostvarenim prilikom kultivacije soja PAP LIST 4 na medijumu sa sirovim glicerolom u manjim razmerama (tabele 5.16. i 5.21) može se primetiti da se sadržaj ksantana u medijumu za biosintezu sa sirovim glicerolom optimizovanog sastava po završetku bioprocesa u uvećanim razmerama povećao za nešto više od 39%, odnosno 44%, redom, prilikom čega je konverzija glicerola u ksantan u navedenim slučajevima uvećana za 60,30% i 38,66%, redom. Kultivacija soja PAP LIST 4 u uvećanim razmerama na medijumu sa sirovim glicerolom, izvršena nakon optimizacije odabranih segmenata biotehnoškog postupka, rezultovala je biosintezom ksantna čija je molekulska masa veća za oko 19,50% u odnosu na ksantan produkovan u fazi inicijalnog skrininga biosinteze ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom primenom istog proizvodnog soja u smanjenim razmerama (tabela 5.19). U pogledu konverzija nutrijenata, može se primetiti da je prilikom izvođenja optimizovanog procesa proizvodnje ksantana primenom soja PAP LIST 4 u uvećanim razmerama ostvarena mnogo veća konverzija nutrijenata u poređenju sa rezultatima ostvarenim kada je kultivacija pomenutog soja vršena u manjim razmerama u okviru odabira proizvodnog soja za biosintezu ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom (tabela 5.21). Konverzija glicerola i ukupnog fosfora uvećane su za više od 29%, dok je konverzija ukupnog azota uvećana za 59,70%. Dobijeni rezultati sugerišu da se prilikom kultivacije soja PAP LIST 4 u bioreaktoru zapremine od 3 l nakon 120 h nisu odvijale značajne promene u pogledu prethodno diskutovanih pokazatelja uspešnosti biosinteze ksantana. Sa druge strane, prilikom kultivacije soja PAP LIST 4 u bioreaktoru zapremine od 14 l ne dolazi do značajnih promena ovih pokazatelja već nakon 96 h. Razlog tome leži u činjenici da se prilikom izvođenja optimizovanog procesa proizvodnje ksantana u uvećanim razmerama, odnosno u bioreaktoru odgovarajućih konstrukcionih karakteristika,

biosinteza brže završava usled intenzivnijih uslova mešanja i aeracije. Ovo je značajno sa ekonomskog aspekta jer postoji mogućnost smanjenja vremena trajanja kultivacije i to za čak 72 h, što direktno utiče na smanjenje ukupnih troškova proizvodnog postupka. Međutim, neophodno je izvršiti dalja ispitivanja usmerena ka izvođenju biosinteze ksantana u još većim razmerama.

Na osnovu svega navedenog može se konstatovati da sirovi glicerol ima veliki potencijal za primenu kao sirovine u ekonomski isplativoj biotehnološkoj proizvodnji ksantana primenom soja *X. euvesicatoria* PAP LIST 4. Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije predstavljaju pouzdan izvor informacija za dalji razvoj i unapređenje ispitivanog biotehnološkog postupka.

## 6. ZAKLJUČCI

Istraživanja realizovana u okviru ove doktorske disertacije proistekla su iz potražnje za odgovarajućom sirovinom, što niže tržišne vrednosti, koja bi u biotehnološkoj proizvodnji ksantana predstavljala adekvatnu zamenu za standardno primenjivane izvore ugljenika u medijumima za biosintezu, ali i iz potrebe za razvojem održivog postupka za iskorišćenje sirovog glicerola iz proizvodnje biodizela, čije se generisanje intenzivira usled proširenja kapaciteta za dobijanje ovog biogoriva. Optimizacijom proizvodnje ksantana u primenjenim eksperimentalnim uslovima, metaboličkom aktivnošću lokalnog izolata *X. euvesicatoria* PAP LIST 4, na sirovom glicerolu kojeg generiše industrija biodizela na teritoriji Republike Srbije, standardizovan je postupak pripreme inokuluma i formulisan je sastav medijuma za biosintezu. Standardizacijom pripreme inokuluma definisani su optimalni odnosi najpogodnijih sastojaka medijuma za drugu fazu umnožavanja odabranog proizvodnog soja, utvrđene su njihove optimalne početne koncentracije, kao i koncentracija inokuluma u medijumu za biosintezu, a skraćeno je i ukupno vreme trajanja pripreme inokuluma. Nakon formulacije sastava medijuma za biosintezu čija je osnova sirovi glicerol, gde su definisane optimalne početne koncentracije makronutrijenata, potvrđena je uspešnost izvođenja bioprocasa u uvećanim razmerama uz mogućnost skraćanja vremena trajanja bioprocasa. Rezultati ovih istraživanja imaju naučni značaj jer doprinose razumevanju uticaja ispitivanih parametara iz pojedinih segmenata bioprocasa na željenu metaboličku aktivnost lokalnog izolata *X. euvesicatoria* PAP LIST 4, dok sa tehnološkog aspekta predstavljaju pouzdan izvor informacija za dodatno uvećanje razmera bioprocasa i dalji razvoj ispitivanog biotehnološkog postupka za iskorišćenje sirovog glicerola u cilju dobijanja biopolimera široke upotrebne i značajne tržišne vrednosti.

U nastavku su navedeni specifični zaključci izvedeni na osnovu rezultata istraživanja iz okvira ove disertacije.

- Rezultati istraživanja koja su obuhvatala skrining mogućnosti biosinteze ksantana na polusintetičkim medijumima sa različitim izvorima ugljenika, primenom referentnog soja *X. campestris* ATCC 13951, sojeva roda *X. campestris*, izolovanih sa listova biljaka iz porodice kupusnjača i sojeva *X. euvesicatoria*, izolovanih sa listova paprika, ukazuju da svi ispitivani sojevi roda *Xanthomonas* poseduju sposobnost produkcije ksantana na medijumima sa glukozom i komercijalnim glicerolom. Pored toga, utvrđeno je i da su lokalni izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača produktivniji u prisustvu glukoze, dok lokalni izolati sa listova paprika u većoj meri biosintetišu ksantan na medijumu sa komercijalnim glicerolom. Dobijeni rezultati pokazuju i da je prilikom kultivacije ispitivanih izolata roda *Xanthomonas* na medijumu sa komercijalnim glicerolom došlo do biosinteze ksantana koji su, prema srednjim vrednostima molekulske mase, boljeg kvaliteta u odnosu na ksantane koje su isti proizvodni sojevi, u primenjenim eksperimentalnim uslovima, biosintetisali na medijumu sa glukozom. Na kraju ove faze istraživanja konstatovano je da su se među ispitivanim sojevima, kao najproduktivniji na medijumu sa komercijalnim glicerolom, izdvojili soj KUPUS iz grupe izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača, i soj PAP LIST 4, iz grupe izolata sa listova paprika.
- Sirovi glicerol, koji je korišćen u ovim istraživanjima kao sirovina za pripremu kultivacionih medijuma za različite faze biotehnološke proizvodnje ksantana, sadrži

izvora ugljenika i fosfora, kao i određene mineralne materije, koji su neophodni za rast i razmnožavanje proizvodnog mikroorganizma, ali i za biosintezu ksantana. Sve pomenute komponente, osim izvora azota, prisutne su u sirovom glicerolu u koncentraciji koja omogućava neometano odvijanje metaboličkih aktivnosti bakterija roda *Xanthomonas*.

- Rezultati skrininga mogućnosti biosinteze ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom, primenom referentnog soja i lokalnih izolata roda *Xanthomonas*, pokazuju da je kultivacija svih ispitivanih sojeva, u primenjenim eksperimentalnim uslovima, rezultovala produkcijom ksantana različitog kvaliteta. Utvrđeno je i da je vreme trajanja kultivacije za koje se postiže maksimalna koncentracija biopolimera odgovarajućeg kvaliteta kraće za sojeve izolovane sa listova paprika u odnosu na pripadnike istog bakterijskog roda izolovane sa listova biljaka iz porodice kupusnjača. Među izolatima sa listova paprika, ksantan u najvećoj količini produkovao je soj PAP LIST 4, dok su ksantan najboljeg kvaliteta biosintetisali sojevi PAP LIST 3 i PAP LIST 4. Najproduktivniji sojevi iz grupe izolata sa listova biljaka iz porodice kupusnjača na medijumu sa sirovim glicerolom bili su sojevi ATCC 13951, 12-2, KARFIOL, KUPUS, Am i Xp 7-2, a ksantan najboljeg kvaliteta biosintetisali su sojevi Xp 3-1, Am i KARFIOL.
- Budući da se, prilikom skrininga mogućnosti biosinteze ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom, nijedan od ispitivanih sojeva nije izdvojio značajno, a kako bi se odabrao soj koji će se koristiti u nastavku istraživanja za unapređenje predloženog biotehnološkog postupka za iskorišćenje pomenutog efluenta industrije biodizela, izvršeno je poređenje uspešnosti biosinteze ksantana u uvećanim razmerama (Vulfova boca ukupne zapremine 2 l) primenom pojedinih proizvodnih sojeva. Kao najpogodniji, u ovoj fazi istraživanja, istakao se soj PAP LIST 4 koji je u daljim ispitivanjima korišćen kao proizvodni mikroorganizam.
- Rezultati prve faze optimizacije sastava medijuma za pripremu inokuluma, koja je izvršena u cilju supstitucije dela glukoze u medijumu za drugu fazu umnožavanja soja PAP LIST 4 sa glicerolom, konstatovano je da je medijum najpogodnije formulacije onaj sa 40% glukoze i 60% sirovog glicerola. Utvrđeno je da, uvođenjem ovog medijuma u pripremne faze biotehnološkog postupka proizvodnje ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom, dolazi do povećanja sadržaja produkovanog biopolimera za nešto više od 20%, u odnosu na prethodnu fazu istraživanja.
- U drugoj fazi optimizacije sastava medijuma za pripremu inokuluma, koja je izvedena kako bi se u medijumu za drugu fazu umnožavanja soja PAP LIST 4 definisao odnos sastojaka sa azotom, utvrđeno je da je medijum najpogodnije formulacije onaj sa 100% sladnog ekstrakta, uz dodatak 40% glukoze i 60% sirovog glicerola. Ovom modifikacijom postignuto je da se sadržaj ksantana u proizvodnom medijumu sa sirovim glicerolom po završetku bioprocasa poveća za nešto više od 10%, u odnosu na prethodnu fazu istraživanja.
- Treća faza optimizacije sastava medijuma za pripremu inokuluma imala je za cilj definisanje optimalnog početnog sadržaja odabranih sastojaka medijuma za drugu fazu umnožavanja soja PAP LIST 4, kao i optimalne koncentracije inokuluma koja se dodaje u medijum za biosintezu. Rezultati sprovedene optimizacije ukazuju da je za drugu fazu pripreme inokuluma najpogodnije primeniti medijum sa 5 g/l glukoze i sirovog glicerola (dodatih u odnosu 40:60) i 5 g/l sladnog ekstrakta, dok je optimalna koncentracija

inokuluma koja se dodaje u medijum za biosintezu 5%(v/v). Vrednosti svih variranih parametara smanjene su za 50% u odnosu na prethodnu fazu istraživanja bez negativnog uticaja na količinu produkovanog biopolimera.

- Prilikom optimizacije vremena trajanja pripreme inokuluma konstatovano je da optimalno vreme trajanja prve faze umnožavanja soja PAP LIST 4 iznosi 36 h, a druge 48 h. U odnosu na prethodnu fazu istraživanja, u ovom koraku ostvareno je smanjenje vremena trajanja umnožavanja proizvodnog mikroorganizma u prvoj fazi pripreme inokuluma za 25%, što se nije odrazilo na uspešnost izvođenja celog proizvodnog postupka.
- Optimizacija sastava medijuma sa sirovim glicerolom za biosintezu ksantana, u pogledu početnog sadržaja glicerola i početnog sadržaja izvora azota (ekstrakt kvasca i  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), rezultovala je zaključkom da je medijum najpogodnije formulacije onaj sa 16,15 g/l glicerola i 3,00 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Kultivacijom soja PAP LIST 4 na medijumu sa sirovim glicerolom optimizovane formulacije, u primenjenim eksperimentalnim uslovima, biosintetiše se ksantan u koncentraciji koja je za 29,59% veća u odnosu na prethodnu fazu istraživanja.
- Prilikom optimizacije medijuma sa sirovim glicerolom za biosintezu ksantana, u pogledu početnog sadržaja izvora fosfora, konstatovano je da je medijum najpogodnije formulacije onaj sa 2,5 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . U poređenju sa prethodnom fazom istraživanja može se zaključiti da je u ovom koraku količina fosfatne soli koja se dodaje u medijum za biosintezu smanjena za 16,67% bez negativnog uticaja na metaboličku aktivnost soja PAP LIST 4 i prinos biopolimera.
- Poslednja faza istraživanja obuhvatala je umnožavanje soja PAP LIST 4 u standardizovanim uslovima, a zatim i njegovu kultivaciju u uvećanim razmerama (laboratorijski bioreaktori ukupne zapremine 3 l i 14 l) na medijumu sa sirovim glicerolom optimizovane formulacije. Na osnovu dobijenih rezultata konstatovano je da je veća uspešnost bioprocasa ostvarena prilikom biosinteze u laboratorijskom bioreaktoru ukupne zapremine 14 l zbog povoljnijih uslova mešanja i aeracije, te da se vreme trajanja biosinteze u tom slučaju može skratiti za 72 h. U navedenom ogledu biosintetisan je ksantan odgovarajućeg kvaliteta u koncentraciji od 13,95 g/l, čime je ostvaren značajan stepen konverzije glicerola u ksantan, i to od 98,44%. Vrednosti konverzije glicerola, ukupnog azota i ukupnog fosfora ostvarene u ovoj fazi istraživanja iznosile su 85,39%, 69,01% i 43,72%, redom.
- Kultivacija soja PAP LIST 4 u laboratorijskom bioreaktoru ukupne zapremine 14 l, na medijumu sa sirovim glicerolom optimizovane formulacije, rezultuje biosintezom ksantana čiji su sadržaj i molekulska masa veći za oko 39% i 20% u odnosu na ksantan produkovan u fazi inicijalnog skrininga mogućnosti biosinteze ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom primenom istog proizvodnog soja. Pored toga, utvrđeno je da se prilikom izvođenja optimizovanog postupka proizvodnje ksantana primenom soja PAP LIST 4 u uvećanim razmerama (laboratorijski bioreaktor zapremine 14 l) ostvaruje stepen konverzije glicerola i ukupnog fosfora veći za više od 29%, dok je konverzija ukupnog azota veća za gotovo 60% u odnosu na vrednosti ostvarene kada je kultivacija pomenutog soja vršena u manjim razmerama (Vulfova boca ukupne zapremine 2 l) u okviru odabira proizvodnog soja za biosintezu ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom.

## 7. LITERATURA

1. Aiello, D., Scuderi, G., Vitale, A., Firrao, G., Polizzi, G., Cirvilleri, G. (2013). A pith necrosis caused by *Xanthomonas perforans* on tomato plants. *European Journal of Plant Pathology*, 137, 29-41.
2. Albiter, V., Torres, L.G., Galindo, E. (1994). Recovery of xanthan from fermentation broths by precipitation in a stirred tank. *Process Biochemistry*, 29, 187-196.
3. Aleksandrova, K., Ganeva, D., Bogatzevska, N. (2014). *Xanthomonas gardneri* – Characterization and Resistance of Bulgarian Tomato Varieties. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences*, 2, 1540-1545.
4. Amanullah, A., Tuttien, B., Nienow, A.W. (1998). Agitator speed and dissolved oxygen effects in xanthan fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 57, 198-210.
5. Anbuselvi, S.S., Kumar, M., Vikram, M., Padmaja (2012). A comparative study on biosynthesis of xanthan gum using three different *Xanthomonas* strains isolated from diseased plants. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 3, B1-B6.
6. AOAC (2000). *Official methods of analysis of AOAC* (International 17th edition), Gaithersburg, MD, USA Association of Analytical Communities.
7. Assis, D.J., Brandão, L.V., Costa, L.A. S., Figueredo, T.V.B., Sousa, L.S., Padilha, F. F., Druzian, J. I. (2014). A study of the effects of aeration and agitation on the properties and production of xanthan gum from crude glycerin derived from biodiesel using the response surface methodology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(5), 2769-2785.
8. Ayoub, M., Abdullah, A.Z. (2012). Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16, 2671–2686.
9. Bajić, B., Dodić, J., Rončević, Z., Grahovac, J., Dodić, S., Vučurović, D., Tadijan, I. (2014). Biosynthesis of xanthan gum on wastewater from confectionary industry. *Analecta*, 8 (2), 13-17.
10. Bajić, B., Rončević, Z., Puškaš, V., Miljić, U., Dodić, S., Grahovac, J., Dodić, J. (2015a) White wine production effluents used for biotechnological production of xanthan. *Journal on processing and energy in agriculture*, 19 (1), 52-55.
11. Bajić, B., Rončević, Z., Dodić, S., Grahovac, J., Dodić, J. (2015b). Glycerol as a carbon source for xanthan production by *Xanthomonas campestris* isolates. *Acta Periodica Technologica*, 46, 197-206.
12. Bajić, B.Ž., Vučurović, D.G., Dodić, S. N., Rončević, Z.Z., Grahovac, J.A., Dodić, J.M. (2017). The Biotechnological Production of Xanthan on Vegetable Oil Industry Wastewaters. Part I: Modelling and Optimization. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 23(3), 329-339.
13. Banković-Ilić, I.B., Stamenković, O.S., Veljković, V.B. (2012). Biodiesel production from non-edible plant oils. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16, 3621– 3647.
14. Baras, J., Veljković, V., Popov, S., Lazić, M., Zlatković, B. (2009). *Osnovi bioprocenog inženjerstva*. Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet Leskovac, Leskovac.
15. Baş, D., Boyacı, I.H. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78, 836-845.



16. Becker, A., Katzen, F., Pühler, A., Ielpi, L. (1998). Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50, 145-152.
17. Berninger, T., Dietz, N., López, O.G. (2021). Water-soluble polymers in agriculture: xanthan gum as eco-friendly alternative to synthetics. *Microbial Biotechnology*, 14 (5), 1-16.
18. Biswa, P.C., Amonkar, M., Jose, A., Almeida, D., Acharya, K., Nasir, N., De, O., Agera, R., Darne, R. (2015). Utility of Xanthan Gum Produced from Agro Food Waste. *Proceedings of the India International Science Festival- Young Scientists' Meet Department of Science and Technology*, Waste-23.
19. Björn, A., Karlsson, A., Svensson, B.H., Ejlertsson, J., de la Monja, P.S. (2012). *Rheological Characterization* (1st ed.), INTECH Open Access Publisher.
20. Borges, C.D., Moreira, A.D.S., Vendruscolo, C.T., Ayub, M.A.Z. (2008). Influence of agitation and aeration in xanthan production by *Xanthomonas campestris* pv *pruni* strain 101. *Revista Argentina de Microbiología*, 40, 81-85.
21. Born, K., Langendorff, V., Boulenger, P. (2005). Xanthan. In Steinbüchel A., Rhee S.K. (Eds.) *Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry*, (Volume I, pp. 481-519), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
22. Brandão, L.V., Assis, D.J., López, J.A., Espiridião, M.C.A., Echevarria, E.M., Druzian, J.I. (2013). Bioconversion from crude glycerin by *Xanthomonas campestris* 2103: xanthan production and characterization. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 20, 737-746.
23. Brandão, L.B., Lopez, J.A., Assis, D.J., Echevarria, E.M., Druzian, J.I. (2014). Biosynthesis of xanthan gum from residual glycerin from biodiesel production for drilling fluids. *BMC Proceedings*, 8 (4), P187.
24. Brereton, R.G. (2003). *Applied chemometrics for scientists*. John Wiley & Sons Ltd.
25. Carignatto, C.R., Oliveira, K.S., de Lima, V.M., de Oliva Neto, P. (2011). New Culture Medium to Xanthan Production by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Indian journal of microbiology*, 51(3), 283-288.
26. Casas, J.A., Santos, V.E., García-Ochoa, F. (2000). Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 282-291.
27. Chaitali, M., Kapadi, M., Suraishkumar, G.K., Gudi, R.D. (2003). Productivity improvement in xanthan gum fermentation using multiple substrate optimization. *Biotechnology Progress*, 19, 1190-1198.
28. Choubisa, B., Patel, H., Patel, M., Dholakiya, B. (2012). Microbial Production of Lactic Acid by Using Crude Glycerol from Biodiesel. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 2 (1), 90-93.
29. Coronado, R., Carvalho, A., Quispe, A., Sotomonte, R. (2014). Ecological efficiency in glycerol combustion. *Applied Thermal Engineering*, 63, 97-104.
30. Costa, N.R., Lourenço, J., Pereira, Z.L. (2011). Desirability function approach: A review and performance evaluation in adverse conditions. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 107 (2), 234-244.

31. Crosse, A.J., Brady, D., Zhou, N., Rumbold, K. (2019). Biodiesel's trash is a biorefineries' treasure: the use of "dirty" glycerol as an industrial fermentation substrate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(1), 2.
32. Ćirić, J. (2017). *Mikrobiološko iskorištenje otpadnog glicerola iz proizvodnje bodizela* [Doktorska disertacija, Univerzitet u Nišu]. Tehnološki fakultet u Leskovcu, Leskovac, Srbija.
33. Da Silva, G.P., Mack, M., Contiero, J. (2009), Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, 27, 30-39.
34. Da Silva, J.A., Cardoso, L.G., Assis, D.J., Gomes, G.V.P., Oliveira, M.B.P.P., de Souza, C.O., and Druzian, J.I. (2018). Xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* IBSBF 1866 and 1867 from lignocellulosic agroindustrial wastes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 186(2), 750–763.
35. Da Silva Ruy, A.D., Ferreira, A.L.F., Bresciani, A.E., de Brito Alves, R.M., Pontes L.A.M. (2020). Market Prospecting and Assessment of the Economic Potential of Glycerol from Biodiesel. In T. P. Basso, T. O. Basso, L. C. Basso (Eds.) *Biotechnological Applications of Biomass* (1st ed.), IntechOpen.
36. De Monaco Lopes, B., Lopes L.V., Silva, B., Carvalho, M. A., Schnitzler, E., Lacerda, L. (2015). Xanthan gum: Properties, production conditions, quality and economic perspective. *Journal of Food and Nutrition Research*, 54. 185-194.
37. Demirci, A.S., Palabiyik, I., Altan, D.D., Apaydin, D., Gumus, T. (2017). Yield and rheological properties of exopolysaccharide from a local isolate: *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 30, 18-23.
38. Demirci, A.S., Palabiyik, I., Apaydin, D., Mirik, M., Gumus, T. (2019). Xanthan gum biosynthesis using *Xanthomonas* isolates from waste bread: Process optimization and fermentation kinetics. *LWT - Food Science & Technology*, 101, 40–47.
39. Dodić, J. (2000). *Prilog proučavanju biosinteze ksantana* [Magistarska teza, Univerzitet u Novom Sadu], Tehnološki fakultet Novi Sad.
40. Dodić, J.M., Vučurović, D.G., Grahovac, J.A., Dodić, S.N., Popov, S.D., Jokić, A.I. (2011). Utilisation of maltose enriched spent grains liquor for xanthan production. *Acta Periodica Technologica*, 42, 211–221.
41. Dodić, J., Grahovac, J. (2013). *Industrijska mikrobiologija:praktikum*, Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
42. Đaković, Lj. (1990). Koloidna hemija. Tehnološki fakultet Novi Sad, Zavod za izdavanje udžbenika, Novi Sad.
43. Elsayed, E.A., Othman, N.Z., El Enshasy, H.A. (2016). Bioprocess optimization of Xanthan production by *Xanthomonas campestris* using semi-defined medium in batch and fed-batch culture. *Der Pharmacia Lettre*, 8 (19), 288-296.
44. Ferreira, S.L.C., Bruns, R.E., Ferreira, H.S., Matos, G.D., David, J.M., Brandão, G.C., da Silva, E.G.P., Portugal, L.A., dos Reis, P.S., Souza, A.S., dos Santos, W.N.L. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597 (2), 179-186.
45. Flores Candia, J.L., Deckwer, W.D. (1999). Effect of the Nitrogen Source on Pyruvate Content and Rheological Properties of Xanthan. *Biotechnology Progress*, 15, 446-452.

46. Gales, M.E.J., Julian, E.C., Kroner, R.C. (1966). Method for quantitative determination of total phosphorus in water. *Journal of the American Water Works Association*, 58, 1363-1368.
47. Garcá-Ochoa, F., Santos, V.E., Fritsch, A.P. (1992). Nutritional study of *Xanthomonas campestris* in xanthan gum production by factorial design of experiments. *Enzyme and Microbial Technology*, 14 (12), 991-996.
48. García-Ochoa, F., Santos, V.E., Casas, J.A., Gómez, E. (2000). Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances*, 18, 549-579.
49. Ghashghaei, T., Soudi, M.R., Hoseinkhani, S. (2016). Optimization of Xanthan Gum Production from Grape Juice Concentrate Using Plackett-Burman Design and Response Surface Methodology. *Applied Food Biotechnology*, 30 (1), 15-23.
50. Gilani, S. L., Heydarzadeh, H.D., Mokhtarian, N., Alemian, A., Kolaei, M. (2011). Effect of Preparation Conditions on Xanthan Gum Production and Rheological Behavior using Cheese Whey by *Xanthomonas Campestris*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(10), 855-859.
51. Gomashe, A.V., Dharmik, P.G., Fuke, P.S. (2013). Optimization and production of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1449 from sugar beet molasses. *The International Journal of Engineering and Science*, 2, 52-55.
52. Grahovac, J. (2011). *Optimizacija dobijanja etanola fermentacijom međuproizvoda tehnologije prerade šećerne repe* [Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu]. Tehnološki fakultet Novi Sad.
53. Gumus, T., Demirci, A.S., Mirik, M., Arici, M., Aysan, Y. (2010). Xanthan gum production of *Xanthomonas* spp. isolated from different plants. *Food Science and Biotechnology*, 19 (1), 201-206.
54. Guo, N.N., Zheng, Z.M., Mai, Y.L., Liu, H.J., Liu, D.H. (2009). Consequences of cps mutation of *Klebsiella pneumoniae* on 1,3-propanediol fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86 (2), 701-707.
55. Habibi, H., Khosravi-Darani, K. (2017). Effective variables on production and structure of xanthan gum and its food applications: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 10, 130-140.
56. Hájek, M., Skopal, F. (2010). Treatment of glycerol phase formed by biodiesel production. *Bioresource technology*, 101 (9), 3242-3245.
57. Hejna, A., Kosmela, Paulina, Formela, K., Piszczyk, L., Haponiuk, J. T. (2016). Potential applications of crude glycerol in polymer technology—Current state and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66(C), 449-475.
58. Helrich, K. (1990): *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists* (15th ed.), Association of Official Analytical Chemists, Arlington.
59. Hsu, C.H., Lo, Y.M. (2003). Characterization of xanthan gum biosynthesis in a centrifugal, packed-bed reactor using metabolic flux analysis. *Process Biochemistry*, 38 (11), 1617-1625.
60. <https://www.biomarket.rs/:3.7.2021>.
61. <https://www.sigmaaldrich.com/RS/en:3.7.2021>.
62. Hu, S., Luo, X., Wan, C., Li, Y. (2012). Characterization of crude glycerol from biodiesel plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 5915– 5921.

63. Hublik, G. (2012). Xanthan. In J. E. McGrath, M. A. Hickner, R. Höfer (Eds.) *Polymer Science: A Comprehensive Reference* (10<sup>th</sup> ed. p.221–229), Elsevier Science.
64. Ignjatov, M., Gašić, K., Ivanović, M., Šević, M., Obradović, A., Milošević, M. [2010]. Karakterizacija sojeva *Xanthomonas euvesicatoria*, patogena paprike u Srbiji. *Pesticidi i fitomedicina*, 25(2), 139-149.
65. Ivanović, A.T., Trumić, B.T., Ivanov, S.Lj., Marjanović, S.R. (2014). Modelovanje uticaja temperature i vremena homogenizacionog žarenja na tvrdoću PdNi<sub>5</sub> legure, *Hemijska industrija*, 68 (5), 597-603.
66. Janse, J.D., Rossi, M.P., Gorkink, R.F.J., Derks, J.J., Swings, J., Janssens, D., Scortichini, M. (2001). Bacterial leaf blight of strawberry (*Fragaria* (×) *ananassa*) caused by a pathovar of *Xanthomonas arboricola*, not similar to *Xanthomonas fragariae* Kennedy & King. Description of the causal organism as *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae* (pv. nov., comb. nov.). *Plant Pathology*, 50, 653– 665.
67. Jayathilakan, K., Sultana, K., Radhakrishna, K., Bawa, A.S. (2012). Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 49(3), 278-293.
68. Johnson, D.T., Taconi, K.A. (2007). The glycerin glut: Options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. *Environmental Progress*, 26, 338-348.
69. Jones, J.B., Lacy, G.H., Bouzar, H., Stall, R.E., Schaad, N.W. (2004). Reclassification of the *Xanthomonas* associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(6), 755-762.
70. Jokić, A. (2010). *Modelovanje "cross-flow" mikrofiltracije suspenzija kvasca primenom koncepta neuronskih mreža i postupka odzivne površine* [Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu]. Tehnološki fakultet Novi Sad, Novi Sad, Srbija.
71. Kassim, M.B. (2011). Production and characterization of the polysaccharide ‘‘xanthan gum’’ by a local isolate of the bacterium *Xanthomonas campestris*. *African Journal of Biotechnology*, 10, 16909-16914.
72. Kaur, J., Sarma, A.K., Jha, M.K., Gera, P. (2020). Valorisation of crude glycerol to value-added products: Perspectives of process technology, economics and environmental issues. *Biotechnology Reports*, 27, e00487.
73. Kennedy, J.F., Bradshaw, I.J. (1984). Production, properties and applications of xanthan. *Progress in Industrial Microbiology*, 19, 319-371.
74. Kong, P., Aroua, M.K., Daud, W. (2016). Conversion of crude and pure glycerol into derivatives: A feasibility evaluation. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 63, 533-555.
75. Konstantinovic, S., Danilović, R.B., Ciric, T.J., Ilić, B.S., Savic, S., Veljkovic, B.V. (2016). Valorization of crude glycerol from biodiesel production. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, 22, 461-489.
76. Markó, Z.L., Ibrić, S. (2015). Primena dizajna smeše u formulaciji i karakterizaciji čvrstih samo-nanoemulgujućih terapijskih sistema sa karbamazepinom. *Hemijska industrija*, 70 (5), 525–537.
77. Kumar, P., Sharma, R., Ray, S., Mehariya, S., Patel, S., Lee, J., Kalia, V. (2015). Dark fermentative bioconversion of glycerol to hydrogen by *Bacillus thuringiensis*. *Bioresource technology*, 182, 383-388.

78. Kumar, A., Rao, K.M., Han, S.S. (2018). Application of xanthan gum as polysaccharide in tissue engineering: A review. *Carbohydrate Polymers*, 180, 128–144.
79. Kumar, L.R., Yellapu, S.K., Tyagi, R.D., Zhang, X. (2019). A review on variation in crude glycerol composition, bio-valorization of crude and purified glycerol as carbon source for lipid production. *Bioresource Technology*, 293 (5), 122155.
80. Kumara Swamy, M., Khan Behlol, A., Rohit, K, C., Purushotham, B. (2012). Effect of carbon and nitrogen sources on the production of xanthan gum from *Xanthomonas campestris* isolated from soil. *Archives of Applied Science Research*, 4, 2507-2512.
81. Kurbanoglu, E.B., Kurbanoglu, N. (2007). Ram horn hydrolysate as enhancer of xanthan production in batch culture of *Xanthomonas campestris* EBK-4 isolate. *Process Biochemistry*, 42, 1146-1149.
82. Leela, J.K., Sharma, G. (2000). Studies on Xanthan production from *Xanthomonas campestris*. *Bioprocess Engineering*, 23, 687-689.
83. Li, C., Lesnik, K.L., Liu, H. (2013). Microbial conversion of waste glycerol from biodiesel production into value-added products. *Energies*, 6, 4739-4768.
84. Li, P., Li, T., Zeng, Y., Li, X., Jiang, X., Wang, Y., Xie, T., Zhang, Y. (2016). Biosynthesis of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* LREL1-1 using kitchen waste as the sole substrate. *Carbohydrate Polymers*, 151, 684-691.
85. Liu, X., Jensen, P.R., Workman, M. (2012). Bioconversion of crude glycerol feedstocks into ethanol by *Pachysolen tannophilus*. *Bioresource technology*, 104, 579-586.
86. Lo, Y.M., Yang, S.T., Min, D.B. (1997). Effects of yeast extract and glucose on xanthan production and cell with in batch culture of *Xanthomonas campestris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47,689-694.
87. Lochhead, R.Y. (2017). The Use of Polymers in Cosmetic Products. In T. Quinten, T. De Beer, J.P. Remon, C. Vervaet (eds.) *Cosmetic Science and Technology* (1st ed. pp.171-221), Nova Science Publishers, Ghent.
88. Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B., Nyström, A., Pertensen, J., Bergman, R. (1998). Experimental design and optimization. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 42, 3–40.
89. Luyten, H. (1993). Sedimentation of a single particle in systems of xanthan with locust bean gum in relation to the rheological behavior. *Food Hydrocolloids*, 7, 107-113.
90. Makkar, R.S., Cameotra, S.S., Banat, I.M. (2011). Advances in Utilization of Renewable Substrates for Biosurfactant Production. *AMB Express*, 1, 5.
91. Metsoviti, M., Zeng, A.P., Koutinas, A.A., Papanikolaou, S. (2013). Enhanced 1,3-propanediol production by a newly isolated *Citrobacter freundii* strain cultivated on biodiesel-derived waste glycerol through sterile and non-sterile bioprocesses. *Journal of Biotechnology*, 163(4), 408–18.
92. Milas, M., Rinaudo, M., Tinland, B. (1985). The viscosity dependence on concentration, molecular weight and shear rate of xanthan solutions. *Polymer Bulletin*, 14 (2), 157- 164.
93. Miranda, A.L., Costa, S., Assis, D.J., Jesus, C.S., Guimaraes, A.G., Druzian, J. (2020). Influence of strain and fermentation time on the production, composition, and properties of xanthan gum. *Journal of Applied Polymer Science*, 137, 48557.
94. Mirik, M., Demirci, A.S., Gumus, T., Arici, M. (2011). Xanthan gum production under different operational conditions by *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* isolated from pepper plant. *The Food Science and Biotechnology*, 20, 1243-1247.

95. Montgomery, D.C. (2013). Response surface method and designs. In *Design and Analysis of Experiments* (8th ed.). John Wiley and Sons, Hoboken.
96. Moosavi-Nasab, M., Pashangeh, S., Rafsanjani, M. (2010). Effect of Fermentation Time on Xanthan Gum Production from Sugar Beet Molasses. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 4, 599-602.
97. Moraine, R.A., Rogovin, P. (1971). Growth of *Xanthomonas campestris* Is Not Simply. *Canadian Journal of Microbiology*, 17(11), 1473-1474.
98. Moreira, A.S., Vendruscolo, J. L. S., Gil-Turnes, C., Vendruscolo, C. T. (2001). Screening among 18 novel strains of *Xanthomonas campestris* pv *pruni*. *Food Hydrocolloids*, 15 (4-6), 469-474.
99. Nanda, M.R., Poirier, M. (2014). Purification of Crude Glycerol using Acidification: Effects of Acid Types and Product Characterization. *Austin Journal of Chemical Engineering*, 1 (1), 7.
100. Niknezhad, S.V., Asadollahi, M.A., Zamani, A., Biria, D. (2016). Production of xanthan gum by free and immobilized cells of *Xanthomonas campestris* and *Xanthomonas pelargonii*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 751–756.
101. Nitschke, M., Thomas, R.W.S.P. (1995). Xanthan gum production by wild-type isolates of *Xanthomonas campestris*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11, 502-504.
102. Nordin, N.Z., Rashidi, A.R., Dailin, D.J., Malek, R., Azelee, N.I.W., Manas, N.H., Selvamanil, S., Zaidel, D.N.A., Alsaheb, R.A., Sukmawati, D., El Enshasy, H. (2020). Xanthan biopolymer in pharmaceutical and cosmeceutical applications: critical review. *Bioscience Research*, 17 (1), 205-220.
103. Nwachukwu, R., Shahbazi, A., Wang, L., Ibrahim, S., Worku, M., Schimmel, K. (2012). Bioconversion of glycerol to ethanol by a mutant *Enterobacter aerogenes*. *AMB Express*, 2 (1), 20.
104. Ogunkunle, O., Ahmed, N.A. (2019). A review of global current scenario of biodiesel adoption and combustion in vehicular diesel engines. *Energy Reports*, 5, 1560-1579.
105. Olivera, F., Coelho, S. (2017). History, evolution, and environmental impact of biodiesel in Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 75, 168-179.
106. Öner, E.T. (2013). Microbial production of extracellular polysaccharides from biomass. In Fang, Z. (Eds.), *Pretreatment Techniques for Biofuels and Biorefineries* (1st ed., pp. 35-56), Springer, Berlin.
107. Pajčin, I., Vlajkov, V., Frohme, M., Grebinyk, S., Grahovac, M., Mojićević, M., Grahovac, J. (2020). Pepper Bacterial Spot Control by *Bacillus velezensis*: Bioprocess Solution. *Microorganisms*, 8(10), 1463.
108. Palaniraj, A., Jayaraman, V. (2011). Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. *Journal of Food Engineering*, 106, 1–12.
109. Papagianni, M., Psomas, S.K., Batsilas, L., Paras, S.V., Kyriakidis, D.A., Liakopoulou-Kyriakides, M.T. (2001). Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in batch cultures. *Process Biochemistry*, 37, 73-80.
110. Pejčin, D. (2003). *Industrijska mikrobiologija*, Tehnološki fakultet Novi Sad.
111. Petri, D.F.S. (2015). Xanthan Gum: A versatile biopolymer for biomedical and technological applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 132 (23), 42035.

112. Psomas, S.K., Liakopoulou-Kyriakides, M., Kyriakidis, D.A. (2007). Optimization study of xanthan gum production using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 35 (3), 273–280.
113. Quinten, T., De Beer, T., Onofre, F.O., Mendez-Montealvo, G., Wang, Y.J., Remon, J.P. (2011). Sustained-release and swelling characteristics of xanthan gum/ethylcellulose-based injection moulded matrix tablets: in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100 (7), 2858-2870.
114. Quispe, C., Coronado, C., Carvalho, J. (2013). Glycerol - Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 475-493.
115. Ramirez, M.E., Fucikovsky, L., Garcia-Jimanez, F., Quintero, R., Galindo, E. (1998). Xanthan gum production by altered pathogenicity variants of *Xanthomonas campestris*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29, 5-10.
116. Ranjani, P., Gowthami, Y., Gnanamanickam, S.S., Palani, P.V. (2018). Bacteriophages: A New Weapon for the Control of Bacterial Blight Disease in Rice Caused by *Xanthomonas oryzae*. *Microbiology and Biotechnology Letters*, 46 (4), 346-359.
117. Reis, E., Almelda, M., Cardoso, J. (2010). Biopolymer Synthesized by Strains of *Xanthomonas* sp. Isolate from Brazil Using Biodiesel-Waste. *Modern trends in polymer science*, 296, 347-353.
118. Rodrigues, C., Santana, K.O., Nespeca, M.G., Oliveira, J.E., Maintinguer, S.I. (2016). Crude glycerol by transesterification process from used cooking oils: Characterization and potentialities on hydrogen bioproduction. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41, 14641-14651.
119. Rogovin, S.P., Anderson, R.F., Cadmus, M.C. (1961). Production of polysaccharides with *Xanthomonas campestris*. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, 3, 51-63.
120. Rončević, Z., Bajić, B., Grahovac, J. (2014). Effects of the initial glycerol concentration in the medium on the xanthan biosynthesis, *Acta periodica technologica*, 45, 234-246.
121. Rončević, Z. (2016). *Optimizacija proizvodnje ksantana u laboratorijskom bioreaktoru na otpadnim vodama vinarije* [Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu]. Tehnološki fakultet Novi Sad, Novi Sad, Srbija.
122. Rončević, Z., Zahović, I., Pajčin, I., Grahovac, M., Dodić, S., Grahovac, J., Dodić, J. (2019). Effect of carbon sources on xanthan production by *Xanthomonas* spp. isolated from pepper leaves. *Food and Feed Research*, 46 (1), 11-21.
123. Rončević, Z., Bajić, B., Vlajkov, V., Dodić, S., Grahovac, J., Jokić, A., Dodić, J. (2020a). Optimisation of xanthan production on glycerol-based medium using response surface methodology. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 37, 617 - 627.
124. Rončević, Z., Zahović, I., Danilović, N., Dodić, S., Grahovac, J., Dodić, J. (2020b). Potential of different *Xanthomonas campestris* strains for xanthan biosynthesis on waste glycerol from biodiesel production. *Journal on Processing and Energy in Agriculture*, 24(2), 62-66.
125. Rosalam, S., England, R. (2006). Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas comprestis* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 197-207.

126. Roseiro, J.C., Esgalhado, M.E., Amaral Collaço, M. T., Emery, A. N. (1992). Medium development for xanthan production. *Process Biochemistry*, 27, 167-175.
127. Rottava, I., Batesini, G., Fernandes Silva, M., Lerin, L., de Oliveira, D., Ferreira Padilha, F., Toniazzo, G., Mossi, A., Cansian, R.L., Di Luccio, M., Treichel, H. (2009). Xanthan gum production and rheological behavior using different strains of *Xanthomonas* sp. *Carbohydrate Polymers*, 77 (1), 65–71.
128. Rye, A.J., Drozd, J.W., Jones, C.W., Linton, J.D. (1988). Growth Efficiency of *Xanthomonas campestris* in Continuous Culture. *Journal of General Microbiology*, 134 (4), 1055-1061.
129. Rymowicz, W., Rywinska, A., Marcinkiewicz, M. (2009). High-yield production of erythritol from raw glycerol in fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters*, 31(3), 377-380.
130. Saddler, G.S., Bradbury, J.F. (2005). *Xanthomonas* Dalesord. nov. In *Bergey's manual<sup>®</sup> of systematic bacteriology*, Springer.
131. Salah, R.B., Ktari, N., Chaari, K., Besbes, S., Blecker, C., Deroanne, C., Attia, H. (2010) Optimization of xanthan gum production by palm date (*Phoenix dactylifera* L.) juice by-products using response surface methodology. *Food Chemistry*, 121,627-633.
132. Sarma, S., Brar, S., Sydney, E.B., Bihan, Y., Buelna, G., Soccol, C. (2012). Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37, 6473-6490.
133. Savić, D. (2007). *Industrijska mikrobiologija I - koncepti i anaerobni mikrobiološki procesi*, Tehnološki fakultet u Leskovcu, Leskovac.
134. Sdrula, N. (2010). A study using classical or membrane separation in the biodiesel process. *Desalination*, 250, 1070–1072.
135. Sharma, B.R., Naresh, L., Dhuldhoya, N.C., Merchant, S.U., Merchant, U.C. (2006). Xanthan gum-a boon to food industry. *Food Promotion Chronicle*, 1, 27-30.
136. Sherley, K.I., Priyadarshini, R.D. (2015). Review on production of Xanthan gum in batch and continuous reactors. *International Journal of ChemTech Research*, 8(2), 711-717.
137. Shimada, K., Okada, H., Matsuo, K., Yoshioka, S. (1996). Involvement of Chelating Action and Viscosity in the Antioxidative Effect of Xanthan in Oil/WaterEmulsion. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 60, 125-127.
138. Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M., Tripathi, C.K.M. (2017). Strategies for fermentation medium optimization: An in-depth review. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2087.
139. Soriano, N.U., Venditti, R., Argyropoulos, D.S. (2009). Biodiesel synthesis via homogeneous Lewis acid-catalyzed transesterification. *Fuel*, 88, 560–565.
140. Souw, P., Demain, A.L. (1989). Nutritional Studies on Xanthan Production by *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. *Applied and Environmental Microbiology*, 37, 1186-1192.
141. Sriram, G., Suraishkumar, G.K. (2000). Mechanism of oxygen availability from hydrogen peroxide to aerobic cultures of *Xanthomonas campestris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 67, 487-492.
142. Stamenković, I., Banković-Ilić, I., Stamenković, O., Veljković, V., Skala, D. (2009). Kontinualni postupci dobijanja biodizela. *Hemijaska industrija*, 63 (1), 1–10.



143. Sujithra, B., Deepika, S., Akshaya, K. Ponnusami, V. (2019). Production and optimization of xanthan gum from three-step sequential enzyme treated cassava bagasse hydrolysate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, 101294.
144. Sutherland, I.W., (1998). Novel and established application of microbial polysaccharides. *Trends in Biotechnology*, 16, 41-46.
145. Taccari, M., Canonico, L., Comitini, F., Mannazzu, I., Ciani, M. (2012). Screening of yeasts for growth on crude glycerol and optimization of biomass production. *Bioresource technology*, 110, 488-495.
146. Tešić, M., Kiss, F, Marinković, R. (2009). Mogućnost proizvodnje sirovina za biodizel u poljoprivredi Vojvodine/Srbije. *Časopis za procesnu tehniku i energetiku u poljoprivredi PTEP*, 13 (1), 31-34.
147. Thompson, J.C., He, B.B. (2006). Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feed stocks. *Applied Engineering in Agriculture*, 22(2), 261–265.
148. Trindade, R.A., Munhoz, A.P., Burket, C.A.V. (2015). Raw Glycerol as an Alternative Carbon Source for Cultivation of Exopolysaccharide-Producing Bacteria. *Journal of Applied Biotechnology*, 3(2), 61-73.
149. Ueoka, H., Katayama, T. (2001). *Process for preparing glycerol* (US 2001/0014763 A1). United States Patent 6288287.
150. Umesha, S., Avinash, P. (2014). Multiplex PCR for simultaneous identification of *Ralstonia solanacearum* and *Xanthomonas perforans*. *3 Biotech*, 5, 245 - 252.
151. Valerio, O., Horvath, T., Pond, C., Misra, M., Mohanty, A. (2015). Improved utilization of crude glycerol from biodiesel industries: Synthesis and characterization of sustainable biobased polyesters. *Industrial Crops and Products*, 78, 141-147.
152. Verniere, C., Pruvost, O., Civerolo, E. L., Gambin, O., Jacquemoud-Collet, J. P., Luisetti, J. (1993). Evaluation of the Biolog Substrate Utilization System To Identify and Assess Metabolic Variation among Strains of *Xanthomonas campestris* pv. *Citri*. *Applied And Environmental Microbiology*, 59(1), 243-249.
153. Vrbaški, Lj., Markov, S. (1992). *Praktikum iz mikrobiologije*, Prometej, Novi Sad.
154. Wadhai, V., Dixit, A. (2011). Production of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* and comparative study of *Xanthomonas campestris* isolates for the selection of potential xanthan producers. *Indian Streams Research Journal*, 1(11), 1- 4.
155. Wang, Z., Wu, J., Zhu, L., Zhan, X. (2016). Activation of glycerol metabolism in *Xanthomonas campestris* by adaptive evolution to produce a high-transparency and low-viscosity xanthan gum from glycerol. *Bioresource Technology*, 211, 390–397.
156. Wang, Z., Wu, J., Zhu, Li. (2017). Caracteization of xanthan gum produced from glycerol by a mutant stain *Xanthomonas campestris* CCTCC M2015714, *Carbohydrate Polymers*, 157, 521-526.
157. Wani, S., Sayyed, R. (2014). Biopolymers of microbial origins. *International journal of biotechnology and biosciences*, 4, 271-3.
158. Wolde-Georgis, T., Glantz, M.H. (2010). Biofuels in Africa: A pathway to development? *International Research Center for Energy and Economic Development Occasional Papers*, 43, 1-23.
159. Yang, F., Hanna, M., Sun, R. (2012). Value-added uses for crude glycerol - a byproduct of biodiesel production. *Biotechnology for Biofuels*, 5, 13 - 13.

160. Zahović, I., Rončević, Z., Dodić, S., Grahovac, J., Dodić, J. (2019). Ispitivanje mogućnosti iskorišćenja otpadnog glicerola u biotehnološkoj proizvodnji ksantana. *Knjiga radova, VII Memorijalni naučni skup iz zaštite životne sredine „Docent dr Milena Dalmacija“*, Novi Sad, Srbija, UO-04.
161. Zahović, I., Trivunović, Z. (2020). Potential of crude glycerol utilization in biotechnological production of xanthan: A mini review. *Proceedings, 26th International Symposium on Analytical and Environmental Problems*, Segedin, 361-365.
162. Zahović, I., Trivunović, Z. (2021). Valorizacija otpadnog glicerola u biotehnološkoj proizvodnji ksantana: Odabir proizvodnog soja. *Knjiga radova, VIII Memorijalni naučni skup iz zaštite životne sredine „Docent dr Milena Dalmacija“*, Novi Sad, Srbija, UO-02.
163. Zahović, I., Dodić, J., Markov, S., Grahovac, J., Grahovac, M., Trivunović, Z. (2021a). Screening of local wild-type *Xanthomonas* spp. for xanthan biosynthesis using media with different carbon sources. *Romanian Biotechnological Letters*, 26(4), 2800-2807.
164. Zahović, I., Dodić, J., Grahovac, J., Grahovac, M., Trivunović, Z. (2021b). The effect of cultivation time on xanthan production by *Xanthomonas* spp. on glycerol containing medium. *Acta periodica technologica*, In press.
165. Zhang, Z., Chen, H. (2010). Fermentation Performance and Structure Characteristics of Xanthan Produced by *Xanthomonas campestris* with a Glucose/Xylose Mixture. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160, 1653-1663.
166. Zhong, L., Ostrom, M., Truex, M. J., Vermeul, V.R., Szecsody, J.E. (2013). Rheological behavior of xanthan gum solution related to shear thinning fluid delivery for subsurface remediation. *Journal of Hazardous Materials*, 244–245, 160-170.
167. Zoecklein, B.W., Fugelsang, K.C., Gump, B.H., Nury, F. (1999). *Wine Analysis and Production*, Kluwer Academic, New York.

## 8. PRILOZI

## 8.1. Prilog 1

Tabela 8.1. Vrednost pH medijuma sa različitim izvorima ugljenika po završetku kultivacije sojeva *Xanthomonas* spp.

<i>Xanthomonas</i> sojevi		Medijum sa glukozom	Medijum sa komercijalnim glicerolom
		pH (1)	pH (1)
Izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača	ATCC 13951	6,25±0,04	7,18±0,03
	Am	5,26±0,02	7,09±0,04
	KARFIOL	5,48±0,02	6,96±0,05
	KUPUS	5,92±0,05	5,11±0,04
	KELJ	5,82±0,03	7,52±0,04
	Xp 3-1	6,36±0,04	7,39±0,03
	Xp 7-2	5,92±0,01	6,94±0,02
	Mn 7-2	5,83±0,07	6,77±0,03
	12-2	6,23±0,02	6,76±0,03
Izolati sa listova paprika	PAP LIST 1	4,72±0,02	6,76±0,04
	PAP LIST 2	4,75±0,07	6,94±0,03
	PAP LIST 3	4,78±0,03	6,67±0,03
	PAP LIST 4	4,72±0,02	6,63±0,02
	PAP LIST 5	4,77±0,01	6,62±0,04

Tabela 8.2. Sadržaj TDS u medijumima sa različitim izvorima ugljenika po završetku kultivacije sojeva *Xanthomonas* spp.

<i>Xanthomonas</i> sojevi		Medijum sa glukozom	Medijum sa komercijalnim glicerolom
		TDS (g/l)	TDS (g/l)
Izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača	ATCC 13951	2,68±0,05	2,80±0,06
	Am	2,64±0,06	2,77±0,02
	KARFIOL	2,66±0,06	2,70±0,06
	KUPUS	2,65±0,07	2,69±0,05
	KELJ	2,62±0,08	2,66±0,04
	Xp 3-1	2,58±0,06	2,66±0,04
	Xp 7-2	2,54±0,05	2,61±0,05
	Mn 7-2	2,60±0,05	2,79±0,04
	12-2	2,65±0,05	2,72±0,03
Izolati sa listova paprika	PAP LIST 1	2,64±0,07	2,67±0,04
	PAP LIST 2	2,61±0,05	2,68±0,03
	PAP LIST 3	2,63±0,07	2,73±0,04
	PAP LIST 4	2,67±0,05	2,77±0,03
	PAP LIST 5	2,64±0,04	2,74±0,05

Tabela 8.3. Jednofaktorijalna analiza varijanse uticaja odabranih sojeva *Xanthomonas* spp. na sadržaj ksantana u medijumu sa komercijalnim glicerolom

Odziv	Izvor varijabiliteta	SS	DF	MS	F-odnos	p-vrednost
P (g/l)	Proizvodni soj	2,982	3	0,994	2,974	0,096778
	Greška	2,674	8	0,334		

SS – suma kvadrata; DF – stepen slobode; MS – srednja vrednost kvadrata.

Tabela 8.4. Dankanov test višestrukih poređenja: sadržaj ksantana u medijumima sa komercijalnim glicerolom po završetku kultivacije odabranih sojeva *Xanthomonas* spp.

Proizvodni soj	P (g/l)
PAP LIST 5	9,73±0,56 <sup>a</sup>
PAP LIST 2	9,86±0,51 <sup>a</sup>
PAP LIST 4	10,22±0,63 <sup>ab</sup>
KUPUS	11,01±0,61 <sup>b</sup>

P-sadržaj biosintetisanog ksantana.

Tabela 8.5. Vrednost pH medijuma sa komercijalnim glicerolom po završetku kultivacije sojeva *Xanthomonas* spp. u trajanju od 168 h i 240 h

<i>Xanthomonas</i> sojevi	Kultivacija u trajanju od 168 h	Kultivacija u trajanju od 240 h
	pH (1)	pH (1)
Izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača	ATCC 13951	6,83±0,03
	Am	6,88±0,03
	KARFIOL	7,21±0,02
	KUPUS	5,08±0,02
	KELJ	7,46±0,05
	Xp 3-1	7,18±0,02
	Xp 7-2	5,51±0,02
	Mn 7-2	6,55±0,05
	12-2	6,39±0,03
	Izolati sa listova paprika	PAP LIST 1
PAP LIST 2		6,48±0,04
PAP LIST 3		6,32±0,10
PAP LIST 4		6,28±0,04
PAP LIST 5		6,41±0,05

Tabela 8.6. Sadržaj TDS u medijumima sa komercijalnim glicerolom po završetku kultivacije sojeva *Xanthomonas* spp. u trajanju od 168 h i 240 h

<i>Xanthomonas</i> sojevi	Kultivacija u trajanju	Kultivacija u trajanju	
	od 168 h	od 240 h	
	TDS (g/l)	TDS (g/l)	
Izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača	ATCC 13951	2,80±0,06	2,79±0,03
	Am	2,77±0,02	2,80±0,04
	KARFIOL	2,70±0,06	3,02±0,07
	KUPUS	2,69±0,05	2,93±0,04
	KELJ	2,66±0,04	3,09±0,03
	Xp 3-1	2,66±0,04	3,00±0,04
	Xp 7-2	2,61±0,05	3,15±0,05
	Mn 7-2	2,79±0,04	3,05±0,05
	12-2	2,72±0,03	3,06±0,05
Izolati sa listova paprika	PAP LIST 1	2,67±0,04	2,69±0,02
	PAP LIST 2	2,68±0,03	2,68±0,02
	PAP LIST 3	2,73±0,04	2,72±0,03
	PAP LIST 4	2,77±0,03	2,75±0,03
	PAP LIST 5	2,74±0,05	2,74±0,04

Tabela 8.7. Vrednost pH medijuma sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije sojeva *Xanthomonas* spp. u trajanju od 168 h i 240 h

<i>Xanthomonas</i> sojevi	Kultivacija u trajanju	Kultivacija u trajanju	
	od 168 h	od 240 h	
	pH (1)	pH (1)	
Izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača	ATCC 13951	6,52±0,04	6,08±0,03
	Am	6,98±0,04	6,90±0,02
	KARFIOL	7,19±0,04	7,16±0,06
	KUPUS	7,29±0,04	6,89±0,09
	KELJ	7,48±0,03	7,37±0,06
	Xp 3-1	7,19±0,07	7,16±0,06
	Xp 7-2	5,55±0,04	5,54±0,05
	Mn 7-2	7,32±0,03	7,20±0,05
	12-2	7,41±0,03	7,33±0,03
Izolati sa listova paprika	PAP LIST 1	6,35±0,05	5,68±0,04
	PAP LIST 2	6,41±0,03	5,67±0,03
	PAP LIST 3	6,35±0,05	5,71±0,03
	PAP LIST 4	6,39±0,03	5,66±0,03
	PAP LIST 5	6,44±0,03	5,72±0,03

Tabela 8.8. Sadržaj TDS u medijumima sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije sojeva *Xanthomonas* spp. u trajanju od 168 h i 240 h

		Kultivacija u trajanju od 168 h	Kultivacija u trajanju od 240 h
<i>Xanthomonas</i> sojevi		TDS (g/l)	TDS (g/l)
Izolati sa listova biljaka iz porodice kupusnjača	ATCC 13951	2,94±0,04	2,97±0,04
	Am	3,03±0,03	3,06±0,05
	KARFIOL	2,94±0,03	3,01±0,03
	KUPUS	3,03±0,03	2,96±0,05
	KELJ	3,14±0,06	3,03±0,03
	Xp 3-1	3,01±0,01	3,00±0,02
	Xp 7-2	3,05±0,05	3,13±0,03
	Mn 7-2	2,97±0,02	3,03±0,03
	12-2	2,99±0,03	3,09±0,02
Izolati sa listova paprika	PAP LIST 1	2,86±0,03	2,89±0,03
	PAP LIST 2	2,92±0,03	2,88±0,02
	PAP LIST 3	2,88±0,03	2,81±0,02
	PAP LIST 4	2,90±0,02	2,86±0,01
	PAP LIST 5	2,88±0,03	2,73±0,02

Tabela 8.9. Vrednost pH i sadržaj TDS u medijumima sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije odabranih sojeva *Xanthomonas* spp.

<i>Xanthomonas</i> sojevi	pH (1)	TDS (g/l)
ATCC 13951	7,37±0,07	2,96±0,08
KUPUS	6,77±0,06	3,16±0,04
KARFIOL	7,22±0,03	3,00±0,02
PAP LIST 3	6,95±0,04	2,93±0,05
PAP LIST 4	6,91±0,02	2,91±0,03

Tabela 8.10. Jednofaktorijska analiza varijanse uticaja odabranih sojeva *Xanthomonas* spp. na pokazatelje uspešnosti biosinteze ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom

Odziv	Izvor varijabiliteta	SS	DF	MS	F-odnos	p-vrednost
<b>P (g/l)</b>	Proizvodni soj	16,788	4	4,197	87,330	< 0,000001
	Greška	0,481	10	0,048	-	-
<b>K<sub>S</sub> (%)</b>	Proizvodni soj	1218,860	4	304,720	1027,100	< 0,000001
	Greška	2,970	10	0,300	-	-
<b>K<sub>P/S</sub> (%)</b>	Proizvodni soj	3836,130	4	959,030	12103,900	< 0,000001
	Greška	0,790	10	0,080	-	-
<b>K<sub>Nuk</sub> (%)</b>	Proizvodni soj	202,220	4	50,550	791,500	< 0,000001
	Greška	0,640	10	0,060	-	-
<b>K<sub>Puk</sub> (%)</b>	Proizvodni soj	300,704	4,000	75,176	712,520	< 0,000001
	Greška	1,055	10	0,106	-	-

SS – suma kvadrata; DF – stepen slobode; MS – srednja vrednost kvadrata; P-sadržaj biosintetisanog ksantana; K<sub>P/S</sub>-stepen konverzije izvora ugljenika u ksantan; K<sub>S</sub>-stepen konverzije izvora ugljenika; K<sub>Nuk</sub>-stepen konverzije ukupnog azota; K<sub>Puk</sub>-stepen konverzije ukupnog fosfora.

Tabela 8.11. Vrednost pH i sadržaj TDS u medijumu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima sa različitim odnosima izvora ugljenika

Redni broj oglada	pH (1)	TDS (g/l)
1	5,93	3,90
2	6,07	4,10
3	4,68	3,78
4	5,94	4,01
5	6,06	4,26
6	6,04	3,87
7	5,92	4,30
8	5,92	4,50
9	5,99	3,85
10	6,12	3,89
11	5,89	4,17
12	6,08	3,80
13	6,09	4,05

Tabela 8.12. Vrednost pH i sadržaj TDS u medijumu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima sa različitim odnosima izvora azota

Redni broj ogleđa	pH (1)	TDS (g/l)
1	6,58	4,14
2	6,35	3,77
3	6,68	4,07
4	6,26	3,95
5	6,72	4,26
6	6,19	3,85
7	6,58	4,20
8	4,50	4,56
9	5,93	3,75
10	6,62	3,97
11	6,58	4,47
12	5,85	3,77
13	6,74	4,17

Tabela 8.13. Vrednost pH i sadržaj TDS u medijumu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima sa različitim početnim sadržajem nutrijenata i dodatog u različitim koncentracijama

Redni broj ogleđa	pH (1)	TDS (g/l)
1	6,04	3,93
2	6,02	3,97
3	6,00	3,87
4	6,01	3,90
5	6,03	3,87
6	6,06	4,01
7	6,11	3,65
8	6,06	3,68
9	6,00	3,92
10	6,01	3,93
11	5,90	3,49
12	6,02	3,54
13	6,07	3,79
14	6,02	3,76
15	5,99	3,64



Tabela 8.14. Vrednost pH i sadržaj TDS u medijumu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumu optimizovane formulacije u različitom trajanju

Redni broj ogleđa	pH (1)	TDS (g/l)
1	6,35	4,37
2	6,33	4,32
3	6,62	4,35
4	6,44	4,53
5	6,74	4,43
6	6,56	4,32
7	6,75	4,48
8	6,68	4,40
9	6,43	4,52
10	6,65	4,40
11	6,59	4,31

Tabela 8.15. Vrednost pH i sadržaj TDS u medijumima na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota po završetku kultivacije soja PAP LIST 4

Redni broj ogleđa	pH (1)	TDS (g/l)
1	6,76	1,86
2	7,21	3,62
3	8,18	2,42
4	7,54	3,99
5	8,48	1,17
6	7,55	2,88
7	7,60	3,82
8	7,35	4,73
9	7,59	1,77
10	7,83	2,08
11	7,02	4,03
12	7,56	3,98
13	7,56	2,94
14	7,62	2,91
15	7,59	2,86

Tabela 8.16. Vrednost pH i sadržaj TDS u medijumima na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem izvora fosfora po završetku kultivacije soja PAP LIST 4

Redni broj ogleđa	pH (1)	TDS (g/l)
1	5,42±0,03	2,80±0,06
2	5,32±0,02	3,13±0,02
3	5,34±0,05	3,17±0,17
4	5,42±0,02	3,41±0,08
5	5,67±0,30	3,42±0,08
6	5,44±0,04	3,62±0,07
7	5,59±0,04	3,87±0,03

Tabela 8.17. Reološke karakteristike medijuma sa sirovim glicerolom tokom kultivacije soja PAP LIST 4 u laboratorijskom bioreaktoru ukupne zapremine 3 l

<b>t (h)</b>	<b>K [Pa·s<sup>n</sup>]</b>	<b>n [1]</b>
0	0,0368	0,5665
12	0,0427	0,5499
24	0,0426	0,5462
36	0,0447	0,5458
48	0,0522	0,5305
72	0,1039	0,5079
96	0,2295	0,4826
120	0,2973	0,4797
144	0,408	0,4684
168	0,4081	0,4683

*K* – faktor konzistencije;

*n* – indeks toka;

$\eta_a$  – prividni viskozitet.

Tabela 8.18. Reološke karakteristike medijuma sa sirovim glicerolom tokom kultivacije soja PAP LIST 4 u laboratorijskom bioreaktoru ukupne zapremine 14 l

<b>t (h)</b>	<b>K [Pa·s<sup>n</sup>]</b>	<b>n [1]</b>
0	0,0336	0,5868
6	0,0411	0,5648
12	0,0395	0,5749
18	0,0366	0,5929
24	0,0618	0,4922
30	0,0501	0,5406
36	0,0566	0,5128
42	0,0565	0,5125
48	0,0861	0,4407
60	0,1483	0,5339
72	0,4639	0,4517
84	0,5742	0,4248
96	0,741	0,3841
108	0,7198	0,3923
120	0,7696	0,3871
132	0,7748	0,3851
144	0,7638	0,3939
168	0,7882	0,3875

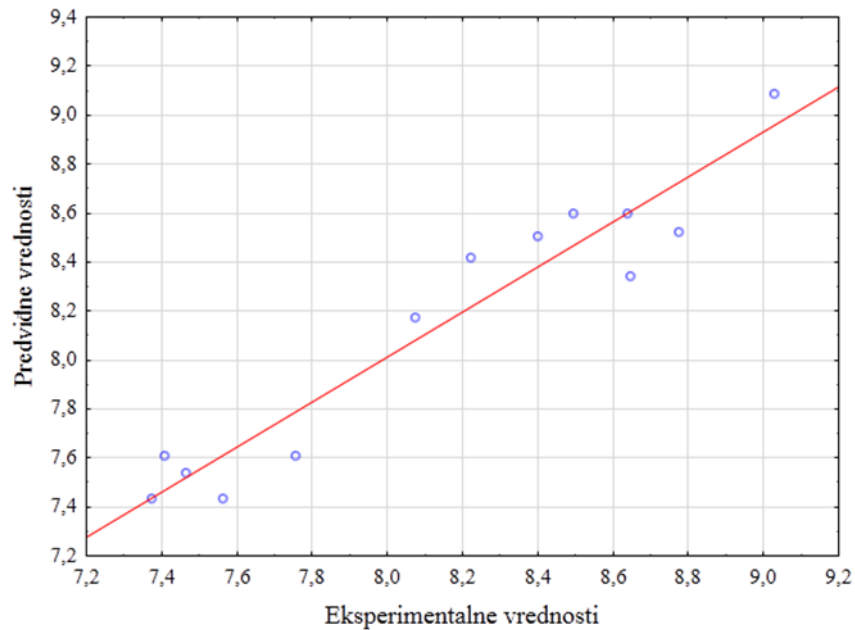
*K* – faktor konzistencije;

*n* – indeks toka;

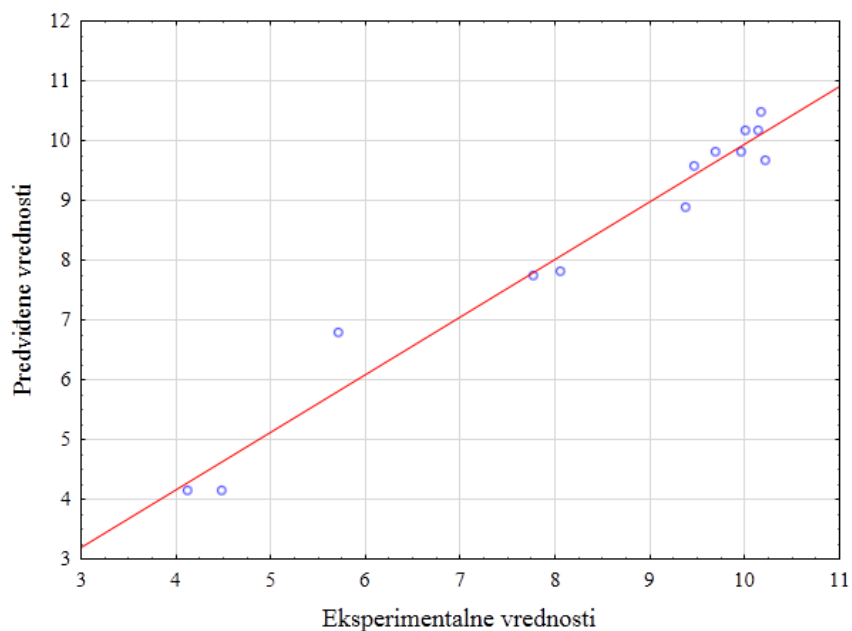
$\eta_a$  – prividni viskozitet;

*t* – vreme trajanja bioprocesa.

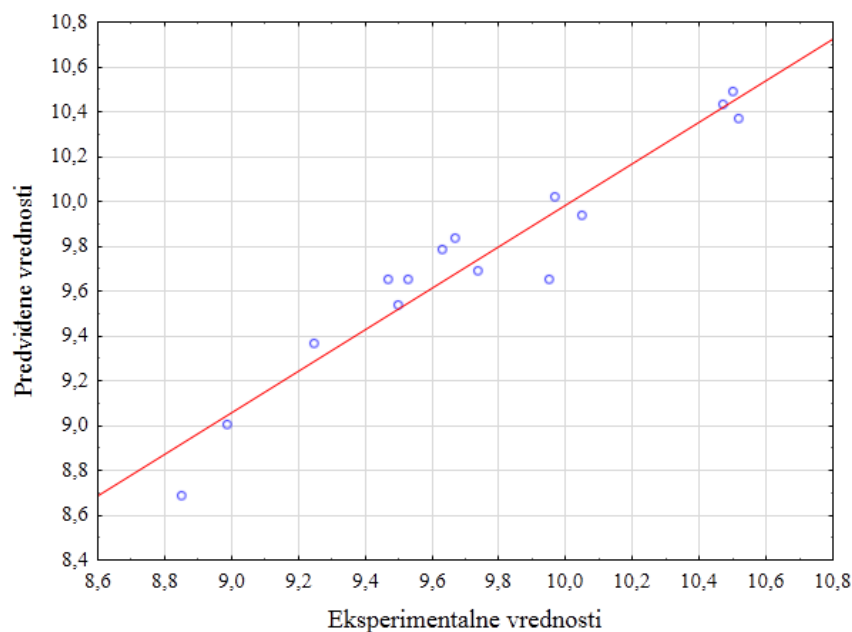
## 8.2. Prilog 2



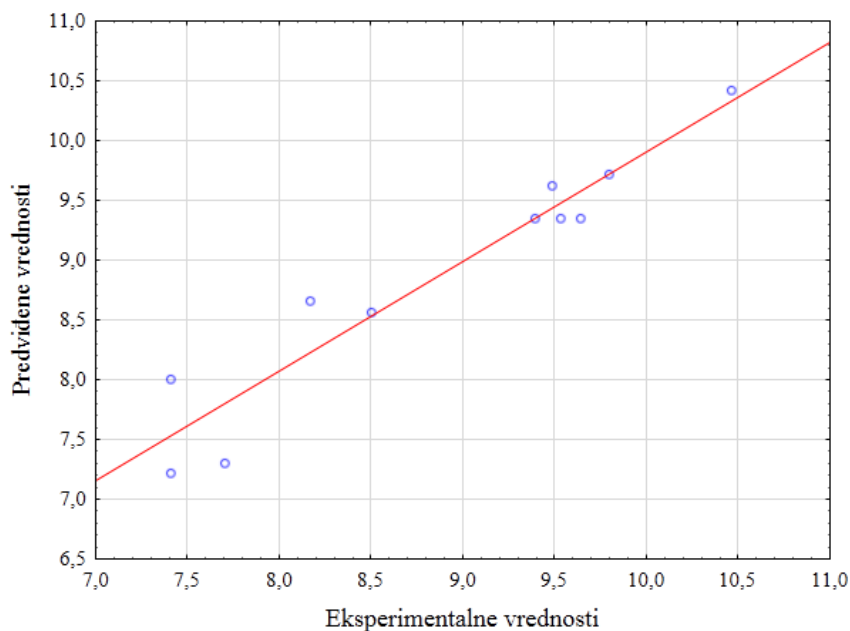
Slika 8.1. Poređenje eksperimentalno dobijenih i modelom predviđenih vrednosti za sadržaj ksantana u medijumu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima sa različitim odnosima izvora ugljenika



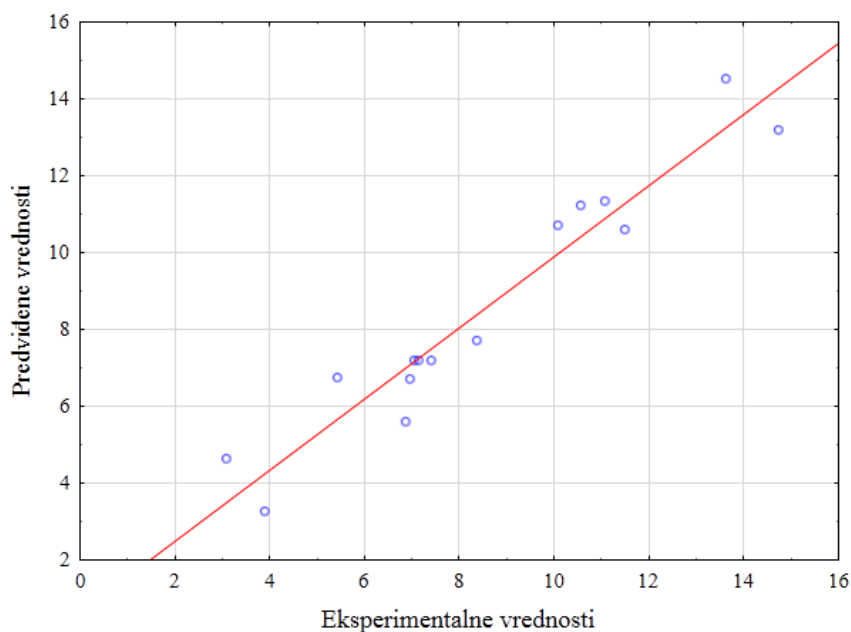
Slika 8.2. Poređenje eksperimentalno dobijenih i modelom predviđenih vrednosti za sadržaj ksantana u medijumu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima sa različitim odnosima izvora azota



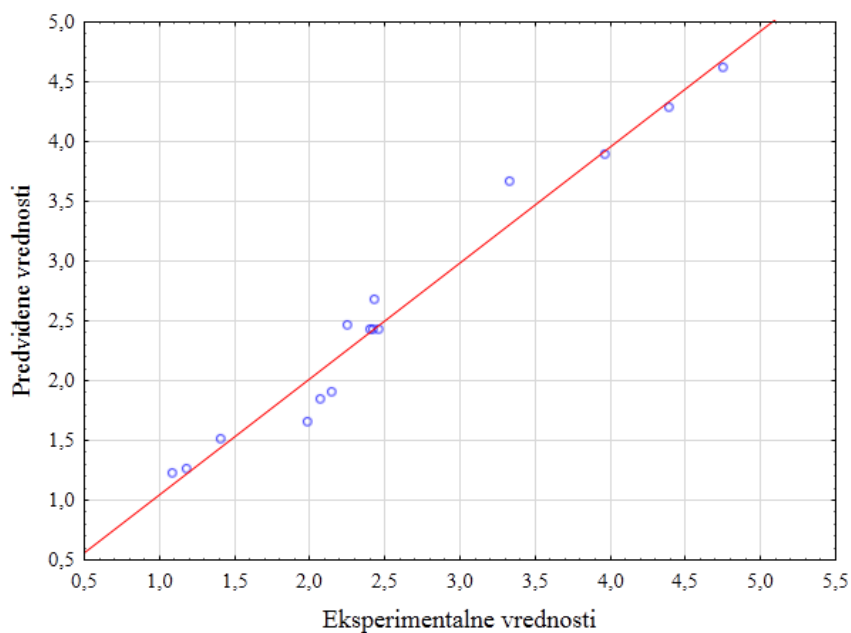
Slika 8.3. Poređenje eksperimentalno dobijenih i modelom predviđenih vrednosti za sadržaj ksantana u medijumu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumima sa različitim početnim sadržajem nutrijenata i dodatog u različitim koncentracijama



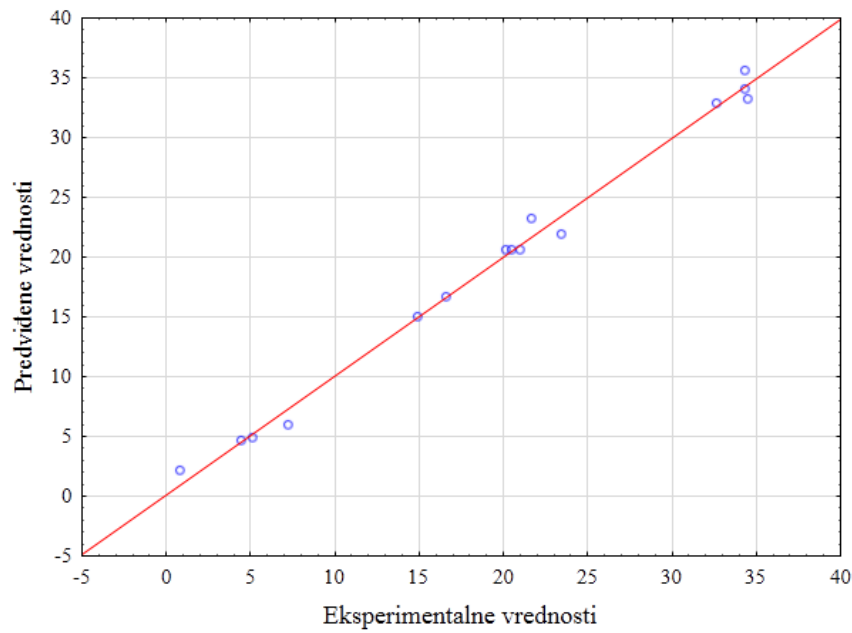
Slika 8.4. Poređenje eksperimentalno dobijenih i modelom predviđenih vrednosti za sadržaj ksantana u medijumu sa sirovim glicerolom po završetku kultivacije soja PAP LIST 4 prethodno umnoženog na medijumu optimizovane formulacije u različitim trajanju



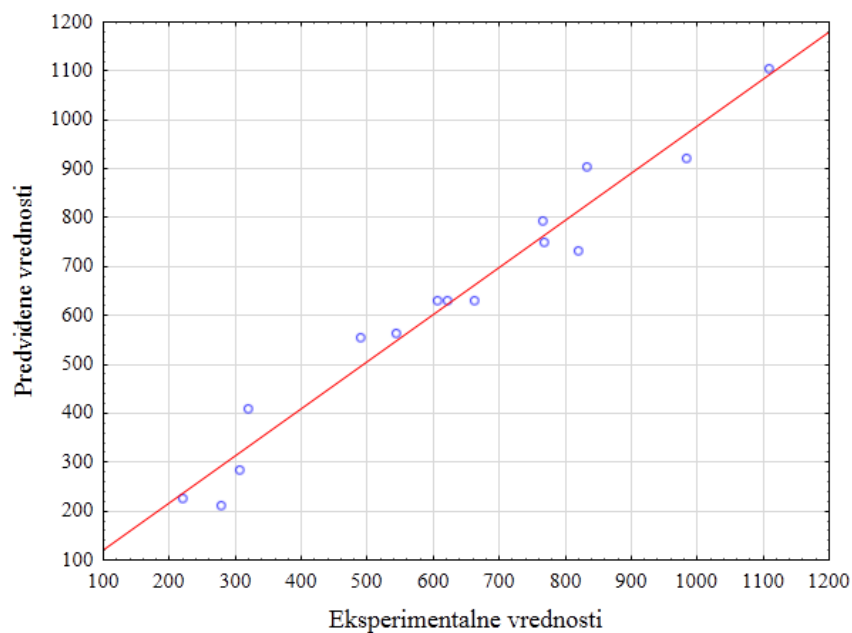
Slika 8.5. Poređenje eksperimentalno dobijenih i modelom predviđenih vrednosti za sadržaj ksantana u medijumima za biosintezu na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota po završetku kultivacije soja PAP LIST 4



Slika 8.6. Poređenje eksperimentalno dobijenih i modelom predviđenih vrednosti za molekulska masu ksantana koje na medijumima na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota biosintetiše soj PAP LIST 4



Slika 8.7. Poređenje eksperimentalno dobijenih i modelom predviđenih vrednosti za rezidualni sadržaj glicerola u medijumima na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota po završetku kultivacije soja PAP LIST 4



Slika 8.8. Poređenje eksperimentalno dobijenih i modelom predviđenih vrednosti za rezidualni sadržaj ukupnog azota u medijumima na bazi sirovog glicerola sa različitim početnim sadržajem glicerola i izvora azota po završetku kultivacije soja PAP LIST 4

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA<sup>1</sup>

Vrsta rada:	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora:	Ida Zahović
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje, institucija)	Dr Zorana Trivunović, docent, Tehnološki fakultet Novi Sad
Naslov rada:	Optimizacija proizvodnje ksantana na sirovom glicerolu primenom lokalnog izolata <i>Xanthomonas</i> sp.
Jezik publikacije (pismo):	Srpski (latinica)
Fizički opis rada:	Uneti broj: Stranica: 209 Poglavlja: 8 Referenci: 167 Tabela: 73 Slika: 67 Priloga: 2
Naučna oblast:	Tehnološko inženjerstvo
Uža naučna oblast (naučna disciplina):	Biotehnologija
Ključne reči / predmetna odrednica:	Ksantan, <i>Xanthomonas campestris</i> , biotehnološka proizvodnja, sirovi glicerol, optimizacija
Rezime na jeziku rada:	<p>Ksantan predstavlja netoksičan, biokompatibilan i biorazgradiv polisaharid mikrobiološkog porekla, koji se na industrijskom nivou uobičajeno dobija delovanjem referentnog soja <i>Xanthomonas campestris</i> ATCC 13951 na kultivacionom medijumu odgovarajućeg sastava, u optimalnim uslovima, diskontinualno, submerznom aerobnom biosintezom u bioreaktorima zapremine 100000 l. Glukoza i saharoza su najčešće korišćeni izvori ugljenika u medijumima za biosintezu. Međutim, porast cene i sve veća potražnja za pomenutim šećerima ukazuju na potrebu primene alternativnih supstrata niže tržišne vrednosti. Naučna istraživanja ukazuju na mogućnost iskorišćenja otpadnog glicerola kao sirovine za dobijanje ksantana zadovoljavajućeg kvaliteta. Istraživanja koja se odnose na razvoj biotehnološkog postupka proizvodnje ksantana na sirovom glicerolu još uvek su u početnim fazama, a uzrok tome je otežana metabolička aktivnost primenjenog proizvodnog mikroorganizma, ali i heterogen sastav same sirovine. Uzimajući u obzir sve navedeno, javila se potreba za pronalaskom proizvodnog soja koji uspešno metaboliše glicerol i biosintetiše ksantan, kao i za optimizacijom postupka njegovog dobijanja, a sve sa ciljem postizanja najveće efikasnosti bioprocasa</p> <p>Osnovni cilj istraživanja ove doktorske disertacije bio je optimizacija proizvodnje ksantana metaboličkom aktivnošću lokalnog izolata <i>Xanthomonas</i></p>

<sup>1</sup> Autor doktorske disertacije potpisao je i priložio sledeće:

5b – Izjava o autorstvu;

5v – Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije i o ličnim podacima;

5g – Izjava o korišćenju.

Ove Izjave se čuvaju na fakultetu u štampanom i elektronskom obliku i ne koriče se sa tezom.

	<p>sp. na kultivacionom medijumu sa sirovim glicerolom kojeg generiše industrija biodizela na teritoriji Republike Srbije.</p> <p>U okviru istraživanja obuhvaćenih ovom doktorskom disertacijom izvršen je skrining mogućnosti biosinteze ksantana referentnim sojem <i>Xanthomonas campestris</i> ATCC 13951 i izolatima roda <i>Xanthomonas</i> na polusintetičkim medijumima sa glukozom i komercijalnim glicerolom. Nakon toga prikupljen je reprezentativni uzorak sirovog glicerola iz industrije biodizela u Republici Srbiji i analiziran je njegov sastav, što je praćeno skriningom mogućnosti biosinteze ksantana pomenutim sojevima roda <i>Xanthomonas</i> na medijumu sa prethodno okarakterisanim sirovim glicerolom. Najproduktivniji i najefikasniji proizvodni soj, u pogledu konverzije važnih nutrijenata prilikom kultivacije na medijumu sa sirovim glicerolom, primenjen je u daljim istraživanjima kao proizvodni mikroorganizam. Standardizacija pripreme inokuluma za biosintezu ksantana odabranim proizvodnim sojem na medijumu sa sirovim glicerolom, a potom i formulacija sastava medijuma sa sirovim glicerolom za biosintezu ksantana izvršena je primenom statističkog planiranja eksperimenata u kombinaciji sa savremenim metodama modelovanja i optimizacije bioprocasa. Poslednja faza ispitivanja iz okvira ove doktorske disertacije podrazumevala je uvećanje razmera razvijenog laboratorijskog biotehnološkog postupka proizvodnje ksantana na medijumu sa sirovim glicerolom. Na osnovu dobijenih rezultata konstatovano je da je veća uspešnost bioprocasa ostvarena prilikom biosinteze u u laboratorijskom bioreaktoru ukupne zapremine 14 l. U navedenom ogledu biosintetisan je ksantan u koncentraciji od 13,95 g/l, molekulske mase <math>3,42 \cdot 10^5</math> g/mol, prilikom čega je ostvarena značajna konverzija glicerola u ksantan, od 98,44%. Vrednosti konverzije glicerola, ukupnog azota i ukupnog fosfora ostvarene u ovoj fazi istraživanja iznosile su 85,39%, 69,01% i 43,72%, redom.</p> <p>Rezultati ostvareni u svim fazama istraživanja iz okvira ove doktorske disertacije potvrđuju da se sirovi glicerol može primeniti kao sirovina u ekonomski isplativijoj biotehnološkoj proizvodnji ksantana primenom soja <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> PAP LIST 4.</p>
Datum prihvatanja teme od strane nadležnog veća:	25.10.2018.
Datum odbrane: (Popunjavanje odgovarajuća služba)	
Članovi komisije: (titula, ime, prezime, zvanje, institucija)	<p>Predsednik: dr Jelena Dodić, redovni profesor Tehnološkog fakulteta Novi Sad, Univerziteta u Novom Sadu</p> <p>Član: dr Zorana Trivunović, docent Tehnološkog fakulteta Novi Sad, Univerziteta u Novom Sadu</p> <p>Član: dr Bojana Danilović, vanredni profesor Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, Univerziteta u Nišu</p>
Napomena:	-



KEY WORD DOCUMENTATION<sup>2</sup>

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Ida Zahović
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Zorana Trivunović, PhD, Assistant Professor, Faculty of Technology Novi Sad
Thesis title:	Optimization of xanthan production on crude glycerol by local isolates <i>Xanthomonas</i> sp.
Language of text (script):	Serbian language (latin)
Physical description:	Number of: Pages: 209 Chapters: 8 References: 167 Tables: 73 Illustrations: 67 Appendices: 2
Scientific field:	Technological engineering
Scientific subfield (scientific discipline):	Biotechnology
Subject, Key words:	Xanthan, <i>Xanthomonas campestris</i> , biotechnological production, crude glycerol, optimization
Abstract in English language:	<p>Xanthan is a non-toxic, biocompatible and biodegradable polysaccharide of microbial origin, industrially produced using the reference strain <i>Xanthomonas campestris</i> ATCC 13951 under optimal conditions, discontinuously, by submerged aerobic biosynthesis in bioreactors with a volume of 100000 L. Glucose and sucrose have been used for decades as the most suitable carbon sources in cultivation media for xanthan production. However, rising prices and increasing demand for these sugars indicate the necessary exploitation of alternative substrates of lower market value. Results from several researches indicate the possibility of using crude glycerol as a raw material for production of xanthan of satisfactory quality. Research related to the development of a biotechnological process of the production of xanthan on glycerol is still in initial stages, due to impaired metabolic activity of the applied production microorganism and complex content of crude glycerol. Considering all aforementioned, there is a need for isolation of new strains able to metabolize glycerol and produce xanthan, as well as to optimize the process of production, with the aim of achieving the highest efficiency of bioprocess.</p> <p>Within the research of this PhD thesis, screening of reference strain <i>Xanthomonas campestris</i> ATCC 13951 and local wild-type <i>Xanthomonas</i> spp. for xanthan biosynthesis using media with glucose and commercial glycerol.</p>

<sup>2</sup> The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

5a – Statement on the authority,

5b – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5r – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included into the printed thesis.

	<p>Aftwards, a representative sample of crude glycerol from the biodiesel industry in the Republic of Serbia was collected and its composition was analyzed, followed by screening of aforementioned <i>Xanthomonas</i> strains for xanthan biosynthesis using media with previously characterized crude glycerol. The most productive and most efficient <i>Xanthomonas</i> strain, in terms of conversion of important nutrients during cultivation on medium containing crude glycerol, was used in further research as a producing microorganism. Standardization of inoculum preparation for xanthan biosynthesis by selected producing strain on medium containing crude glycerol, and formulation of crude glycerol-based medium composition for xanthan biosynthesis was performed by applying statistical planning of experiments in combination with modern methods of modeling and optimization of bioprocesses. The final phase of research within the framework of this PhD thesis involved increasing the size of the developed laboratory biotechnological procedure for the production of xanthan on a crude glycerol-based medium. Based on the obtained results, it was concluded that the higher success of the bioprocess was achieved during the biosynthesis in the laboratory bioreactor with a total volume of 14 l, which resulted with production of xanthan of molecular weight of <math>3.42 \cdot 10^5</math> g/mol in a concentration of 13.95 g/L and conversion rate of carbon source into product of 98.44%. The conversion rates of glycerol, total nitrogen and total phosphorus achieved in this phase of the study were 85.39%, 69.01% and 43.72%, respectively.</p> <p>the results arising from the research performed in the framework of this PhD thesis indicate that crude glycerol has strong potential for the efficient and cost-effective biotechnological production of xanthan by strain <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> PAP LIST 4.</p>
Accepted on Scientific Board on:	25.10.2018.
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	<p>President: Jelena Dodić, PhD, Full Professor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad</p> <p>Member: Zorana Trivunović, PhD, Assistant Profesor, Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad</p> <p>Member: Bojana Danilović, PhD, Associate Professor, Faculty of Taechnology in Leskovac, University of Niš</p>
Note:	-

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

## План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Оптимизација производње ксантана на сировом глицеролу применом локалног изолата <i>Xanthomonas</i> sp.
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Технолошки факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
1. Опис података
<p>1.1 Врста студије</p> <p><i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i> <u>Докторска дисертација</u></p> <p>1.2 Врсте података</p> <p>а) квантитативни б) квалитативни</p> <p>1.3. Начин прикупљања података</p> <p>а) анкете, упитници, тестови б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи в) генотипови: навести врсту _____ г) административни подаци: навести врсту _____ д) узорци ткива: навести врсту _____ ђ) снимци, фотографије: навести врсту _____ е) текст, навести врсту: <u>литература</u> ж) мапа, навести врсту: <u>Google map</u> з) остало: описати: <u>web садржај</u></p> <p>1.3 Формат података, употребљене скале, количина података</p> <p>1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:</p> <p>а) Excel фајл, датотека: <u>.xlsx</u> б) SPSS фајл, датотека _____ в) PDF фајл, датотека: <u>.pdf</u> г) Текст фајл, датотека <u>.docx</u> д) JPG фајл, датотека <u>.jpg, .jpeg, .tiff</u> е) Остало, датотека: <u>документи из софтверског пакета Statistica 13 и Design-Expert 8.1</u></p>

### 1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

- а) број варијабли: различит у различитим експериментима (дефинисано према експерименталном плану)  
б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) \_\_\_\_\_

### 1.3.3. Поновљена мерења

- а) да  
б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) временски размак између поновљених мера је: од неколико минута до неколико дана  
б) варијабле које се више пута мере односе се на: одређене експерименталне анализе  
в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као \_\_\_\_\_

Напомене: \_\_\_\_\_

*Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?*

- а) Да  
б) Не

*Ако је одговор не, образложити \_\_\_\_\_*

## 2. Прикупљање података

### 2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

#### 2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

- а) експеримент, навести тип: хемијска анализа, статистичка анализа, карактеризација сировог глицерола, оптимизација  
б) корелационо истраживање, навести тип: моделовање, оптимизација, брада података (ANOVA, RSM )  
ц) анализа текста, навести тип: преглед доступне научне литературе, дефинисање начина извођења истраживања, дискусија резултата и поређење са литературним подацима, извођење закључака  
д) остало, навести шта \_\_\_\_\_

#### 2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

лабораторијска тресилица - KS 4000i control, IKA® Werke, Немачка,  
Вулфове (Woulff) боце запремине 2 l,  
Лабораторијски биореактор запремине 3 l (Biostat® Aplus, Sartorius AG, Göttingen, Немачка),  
Лабораторијски биореактор запремине 14 l (CH-8708, Chemap AG, Швајцарска),  
Центрифуга (Rotina 380 R, Hettich, Немачка),  
Центрифуга (Tehtnica LC-321, Словенија),  
Мултипараметарски лабораторијски анализатор (Consort C863, Белгија) и  
HPLC (Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 series)

### 2.2 Квалитет података и стандарди

#### 2.2.1. Третман недостајућих података

- а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да **Не**

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) Колики је број недостајућих података? \_\_\_\_\_  
б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да **Не**  
в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података  
\_\_\_\_\_

#### 2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података контролисан је извођењем вишеструких мерења и применом статистичких алата за евалуацију њиховог квалитета.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Контрола уноса података је извршена упоређивањем добијених података са експерименталним резултатима и литературним подацима.

### 3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у репозиторијум: Националном репозиторијуму дисертација у Србији и у репозиторијуму Информационог система научне делатности Универзитета у Новом Саду.

3.1.2. URL адреса: <https://nardus.mpn.gov.rs/>

3.1.3. DOI \_\_\_\_\_

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

а)  Да

б)  Да, али после ембарга који ће трајати до \_\_\_\_\_

в)  Не

Ако је одговор не, навести разлог \_\_\_\_\_

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

\_\_\_\_\_

3.2. Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? \_\_\_\_\_

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

\_\_\_\_\_

3.3. Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? \_\_\_\_\_

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром?  Да  Не

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача?  Да  Не

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да  Не

Образложити

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### 4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1. Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности ([https://www.paragraf.rs/propisi/zakon\\_o\\_zastiti\\_podataka\\_o\\_licnosti.html](https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html)) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије?  Да  Не

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

\_\_\_\_\_

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да **Не**

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- а) Подаци нису у отвореном приступу
- б) Подаци су анонимизирани
- ц) Остало, навести шта

---

---

## 5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

- а)** јавно доступни
- б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области
- ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

---

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима: \_\_\_\_\_

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

---

## 6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Ида Заховић, ida.zahovic@uns.ac.rs

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Ида Заховић, ida.zahovic@uns.ac.rs

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Ида Заховић, ida.zahovic@uns.ac.rs